

Funktionsanalysen der PfEMP1 Proteinfamilie  
von *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Department Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Sabine Predehl  
aus München

Hamburg, Juli 2010

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. E. TANNICH  
Tag der Disputation: 02. Juli 2010

Hamburg, den 17. Juni 2010



*A. Temming*  
Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Departments Biologie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Klassifizierung . . . . .	6
1.2 Der Entwicklungszyklus von <i>P. falciparum</i> . . . . .	6
1.3 Das Krankheitsbild der Malaria tropica . . . . .	7
1.4 Die Formen der Adhäsion infizierter Erythrozyten . . . . .	8
1.5 Adhäsionsrezeptoren . . . . .	8
1.5.1 CD36 . . . . .	9
1.5.2 ICAM-1 . . . . .	9
1.6 Definierte und potenzielle Adhäsionsliganden: Variable Oberflächenproteine . . . . .	10
1.6.1 Die PfEMP1-Proteinfamilie . . . . .	11
1.6.1.1 Bindungseigenschaften . . . . .	11
1.6.1.2 <i>var</i> Gene . . . . .	11
1.6.2 Die 2TM-Superfamilie . . . . .	12
1.7 Antigene Variation . . . . .	13
1.8 Zielsetzung . . . . .	14
<b>2 Material und Methodik</b>	<b>15</b>
2.1 Material . . . . .	15
2.1.1 Geräte und Software . . . . .	15
2.1.1.1 Geräte . . . . .	15
2.1.1.2 Software . . . . .	16
2.1.2 Chemikalien . . . . .	17
2.1.3 Enzyme und Kits . . . . .	18
2.1.4 Puffer und Medien . . . . .	18
2.1.4.1 Puffer . . . . .	18
2.1.4.2 Medien . . . . .	21
2.1.5 Antikörper . . . . .	22

2.1.6	Marker . . . . .	22
2.1.7	Verbrauchsmaterial . . . . .	23
2.1.8	Oligonukleotide . . . . .	24
2.2	Methodik . . . . .	27
2.2.1	Plasmodienkultur . . . . .	27
2.2.1.1	Reinigung . . . . .	27
2.2.1.2	Kultivierung . . . . .	27
2.2.1.3	Mikroskopie . . . . .	27
2.2.1.4	Synchronisation der Plasmodienkultur . . . . .	28
2.2.1.5	Ernte . . . . .	28
2.2.2	CHO-Zellkultur . . . . .	29
2.2.3	Bindungsexperimente mit infizierten Erythrozyten: <i>Panning</i> . . . . .	29
2.2.3.1	Vorbereitung . . . . .	30
2.2.3.2	<i>Panning</i> . . . . .	31
2.2.3.3	Kultivierung zur RNA-Analyse . . . . .	31
2.2.3.4	Auszählung . . . . .	31
2.2.4	Isolierung von Nukleinsäuren . . . . .	32
2.2.4.1	RNA- Isolierung . . . . .	32
2.2.4.2	DNA-Isolierung mit QIAmp DNA Mini Kit . . . . .	32
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	32
2.2.6	DNase Verdau . . . . .	33
2.2.7	Reverse Transkription . . . . .	33
2.2.7.1	Reverse Transkription der <i>var</i> -mRNA . . . . .	33
2.2.7.2	Reverse Transkription der <i>2TM</i> -Superfamilien-mRNA . . . . .	33
2.2.8	Polymerasekettenreaktion . . . . .	34
2.2.8.1	DNA-Persistenz-Kontrollen . . . . .	34
2.2.8.2	Amplifikation von <i>cDNA</i> . . . . .	35
2.2.8.3	Amplifikation von PfEMP1-Dömanen aus genomischer 3D7-DNA . . . . .	36
2.2.8.4	<i>Long Range PCR</i> . . . . .	37
2.2.9	Agarosegelelektrophorese . . . . .	38
2.2.10	DNA-Präparation aus Agarosegelen . . . . .	38
2.2.11	Standardklonierungen . . . . .	38
2.2.11.1	<i>TOPO TA Cloning</i> . . . . .	38
2.2.11.2	Klonierung in das Expressionsplasmid pJC45 . . . . .	38
2.2.11.3	Plasmid-Präparation . . . . .	39
2.2.11.4	Restriktionsverdau . . . . .	39
2.2.11.5	Ligation . . . . .	39
2.2.12	Klonierung zweier Gene des Patientenisolates 19 . . . . .	40
2.2.13	Sequenzauswertung . . . . .	41
2.2.14	Herstellung kompetenter Zellen . . . . .	41

2.2.15	Rekombinante Expression . . . . .	41
2.2.16	Proteinreinigung . . . . .	41
2.2.17	Renaturierung . . . . .	42
2.2.18	Konzentration . . . . .	42
2.2.19	Konzentrationsbestimmung . . . . .	42
2.2.20	Trizingele . . . . .	42
2.2.21	Bindungsexperimente mittels Schwingquarzsensoren . . . . .	43
2.2.21.1	Quarzpräparation . . . . .	43
2.2.21.2	Membranpräparation . . . . .	44
2.2.21.3	Messung . . . . .	45
2.2.22	Westernblot . . . . .	45
2.2.23	Immunfluoreszenzanalysen . . . . .	46
2.2.24	Immunisierung von Mäusen . . . . .	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	Untersuchungen zur Antigenen Variation . . . . .	47
3.1.1	<i>var</i> -Genexpressionsanalysen . . . . .	47
3.1.1.1	Validierung der Oligonukleotide zur Analyse der <i>var</i> -Genexpression unterschiedlicher Patientenisolate . . . . .	47
3.1.1.2	Expressionsprofil der Kulturisolate 3D7 und FCR3 . . . . .	48
3.1.1.3	Expressionsprofil der Patientenisolate . . . . .	50
3.1.1.4	Einfluss der Kultivierung auf die <i>var</i> -Expression . . . . .	55
3.1.2	Nachweis des <i>Switchings</i> auf Proteinebene . . . . .	57
3.2	Bindungsexperimente mit infizierten Erythrozyten . . . . .	61
3.2.1	Bindungsexperimente mit dem Kulturisolat 3D7 an <i>Rx</i> . . . . .	61
3.2.1.1	Expressionsprofile der Ringstadien nach Bindung an <i>Rx</i> . . . . .	61
3.2.1.2	Analyse der Expressionsmuster nach Bindung an <i>Rx</i> in adulten 3D7-Trophozoiten . . . . .	62
3.2.2	Bindungsexperimente mit dem Kulturisolat 3D7 an ICAM-1 . . . . .	70
3.2.2.1	Bindungsexperimente . . . . .	70
3.2.2.2	Expressionsanalysen . . . . .	73
3.2.2.3	Inhibition der Bindung . . . . .	81
3.2.3	Bindungsexperimente mit dem Patientenisolat BNI151209 an ICAM-1 . . . . .	82
3.2.4	Bindungsexperiment . . . . .	82
3.2.4.1	Expressionsanalysen . . . . .	83
3.3	Bindungsexperimente mit rekombinantem Protein . . . . .	87
3.3.1	PF07_0050_CIDR1 $\alpha$ bindet an CD36 . . . . .	87
3.3.2	Bindung an ICAM-1 . . . . .	89
3.3.2.1	DBL1 $\alpha$ bindet nicht an ICAM-1 . . . . .	89
3.3.2.2	DBL1 $\epsilon$ bindet nicht an ICAM-1 . . . . .	89

3.3.2.3	Wenige rekombinante DBL $\beta$ C2-Domänen binden ICAM-1 . . . . .	90
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1	Antigene Variation . . . . .	97
4.1.1	Innerhalb einer Parasitenpopulation wird ein Gen dominant exprimiert . . .	97
4.1.2	Gruppe <i>A</i> <i>var</i> -Gene <i>switchen</i> schneller als solche der Gruppen <i>B</i> und <i>C</i> . . . .	98
4.1.3	<i>Switching</i> der Genexpression führt zum Präsentationswechsel vom PfEMP1 .	98
4.1.4	Modell . . . . .	99
4.2	Zytoadhärenz . . . . .	99
4.2.1	Bindungsexperimente mit infizierten Erythrozyten . . . . .	99
4.2.1.1	Bindung an <i>Rx</i> . . . . .	100
4.2.1.2	Bindungsexperimente an ICAM-1 . . . . .	101
4.2.2	Regulation der VSA-Multigenfamilien . . . . .	103
4.2.3	Bindungsexperimente mit rekombinantem Protein . . . . .	104
4.2.3.1	CIDR1 $\alpha$ bindet CD36 . . . . .	104
4.2.3.2	Wenige rekombinante DBL $\beta$ C2-Domänen binden ICAM-1 . . . . .	104
4.3	Klinische Relevanz . . . . .	106
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>107</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>111</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>119</b>

# Abkürzungen und Symbole

## Molekularbiologische und proteinchemische Abkürzungen

A	Adenosin
ATS	<i>acidic terminal segment</i>
bp	Basenpaare
C	Cytidin
C2	<i>Constant 2</i>
CD	<i>Cluster Determinant</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CIDR	<i>Cysteine-Rich Interdomain Region</i>
CSA	Chondroitin Sulfat
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
dNTP	Desoxyriboneukleosidtriphosphat
DBL	<i>Duffy-Binding-Like</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ER	Endoplasmatisches Reticulum
G	Guanosin
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ICAM-1	<i>Intracellular Adhesion Molecule 1</i>
Ig G	Immunglobulin G
KAHRP	<i>Knob Associated Histidine Rich Protein</i>
Kb	Kilobasen
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function associated antigen</i>
MAP	<i>mytogen activated protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSP	<i>Merozoite Surface Protein</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrozyte Membrane Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
T	Thymidin
TM	Transmembrandomäne
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
UTR	untranslatierte Region
VSA	<i>Variant Surface Antigens</i>

## Physikalische und technische Einheiten

A	Absorption
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
$\Delta$	Differenz
E	Extinktion
F	Frequenz
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hz	Herz
kDa	Kilodalton
L	Liter
mL	Milliliter
$\mu$ L	Mikroliter
M	Molar
mm	Millimeter
mM	Millimolar
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromolar
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
rpm	<i>rotations per minute</i>
U	Unit
UV	Ultraviolett

## Chemikalien und Lösungen

Bromphenolblau	Tetrabromphenolsulfonphthalein
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>fetal calf serum</i>
HEPES	4-2-Hydroxyethyl-1- Piperazinethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HT-PBS	<i>Human Tonicity Phosphate-buffered Saline</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani
NaAc	Natriumacetat
Pen/Strep	Penicillin/Streptavidin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium-dodecyl-Sulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

## Sonstige

Abb.	Abbildung
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BNI	Bernhard Nocht Institut
ca.	circa
et al.	et altera
Exp.	Experiment
Gen.	Generation
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization



# Zusammenfassung

Durch seine Fähigkeit zur Sequestrierung ist das parasitische Protozoon *Plasmodium falciparum* hoch pathogen. Vermittelt wird diese Bindung ans Wirtsendothel unter anderem durch das variable Erythrozytenoberflächenprotein PfEMP1. Die zerebrale Malaria, eine der schwersten Verlaufsformen, die die Malaria tropica annehmen kann, ist unter anderem die Folge der Bindung infizierter Erythrozyten an Endothelrezeptoren des Gehirns. Um dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen, nutzt der Parasit die Strategie der Antigenen Variation; der Wechsel des präsentierten PfEMP1-Moleküls wird durch einen Transkriptionswechsel der *var*-Gene vollzogen (*Switching*). Im haploiden Genom von *P. falciparum* unterteilen sich die ca. 60 Mitglieder der *var*-Gene in die Gruppen A, B und C, von denen aber pro Zeitpunkt immer nur eines aktiv vorliegt.

Der erste Teil der Arbeit widmete sich der Analyse der *Switching*raten von 20 *P. falciparum*-Isolaten aus nicht-immunen Patienten. Hierzu wurde die *var*-Genexpression der *ex vivo*- und sukzessiver *in vitro*-Generationen auf die Frage nach der Quantität der exprimierten Gene und den Änderungsraten der Expression hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass fast alle Parasiten einer Population das gleiche Gen exprimieren, selbst wenn die Expression mit der Generation wechselt; Gene der Gruppe A *switchen* mit Wechselraten von bis zu 100 % hierbei schneller als solche der Gruppen B und C. Im Laufe der Kultivierung geht eine disperser werdende Expression aller Gengruppen mit einer sinkenden *Switching*rate einher. Der *var*-Transkriptionswechsel steht in unmittelbarem Zusammenhang zu einem Präsentationswechsel des PfEMP1-Proteins. Durch den Einsatz von spezifischen Peptidantikörpern gegen die PfEMP1-Moleküle, die von den in häufigster Frequenz exprimierten Transkripten der *ex vivo*- sowie der ersten *in vitro*-Generation abgeleitet wurden, konnte durch Immunfluoreszenzanalysen das *Switching* auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Dem schier unendlichen Repertoire an Antigenen innerhalb des Genpools aller *P. falciparum*-Klone steht eine begrenzte Anzahl an Endothelrezeptoren des Wirtes gegenüber; offensichtlich können unterschiedliche PfEMP1-Sequenzen gleiche Epitopstrukturen aufweisen. Die Kenntnis über die Bindungspartner der Interaktion zwischen parasitärem Protein und Wirtsendothelrezeptor ist die Voraussetzung dafür, diese Bindung blockieren zu können. Die Bindung infizierter Erythrozyten an zwei Rezeptoren des Hirnendothels wurde in Bezug auf Expression der neben PfEMP1 als variable Oberflächenantigene bekannten STEVOR-, PfMC2TM- und RIFIN-Familie untersucht. Dabei wurde eine Methode etabliert, in der infizierte Erythrozyten über zwei Parasitengenerationen an den Endothelrezeptor gebunden wurden, um die Bindungscharakteristika mit der Genexpressi-

---

on variabler Oberflächenantigene innerhalb einer Parasitengeneration über zwei erythrozytäre Zyklen hinweg miteinander vergleichen zu können. Der neu als Interaktionspartner für infizierte Erythrozyten beschriebene *Rx*-Rezeptor<sup>1</sup> wurde erstmals näher charakterisiert. Die Ergebnisse der Expressionsstudien sprechen dafür, dass nicht PfEMP1-, möglicherweise aber PfMC2TM-Proteine für die Bindung an *Rx* verantwortlich sind.

Die Bindung infizierter Erythrozyten an ICAM-1 gilt als entscheidender Prozess im Ausbruch wie in der Schwere des Verlaufs einer zerebralen Malaria. Das Produkt des der Gruppe A zugehörigen PF13\_0003-Gens scheint für die Bindung des Kulturoisolates 3D7 an den Endothelrezeptor ICAM-1 verantwortlich zu sein; in Parasitenpopulationen, die Bindungskapazität an ICAM-1 aufweisen, ist PF13\_0003 in häufigster Frequenz exprimiert. Ein gegen die von PF13\_0003 abgeleitete DBL2βC2-Domäne gerichteter Antikörper inhibiert die Bindung an ICAM-1 konzentrationsabhängig. Die Beteiligung der Gruppe A-Genprodukte konnte neben dem Kulturoisolat für ein Patientenisolat nachgewiesen werden. Daneben spielen möglicherweise auch PfMC2TM- oder STEVOR-Proteine an der ICAM-1-Bindung eine Rolle.

Da jedes *Plasmodium falciparum*-Isolat über die gleichen PfEMP1-Domänentypen verfügt, die aber innerhalb eines Isolates sowie zwischen den Isolaten hochgradig variieren, wurde die Bindung 24 rekombinant exprimierter, renaturierter PfEMP1-Domänen an ICAM-1 mit Schwingquarzsensoren untersucht. Nur einzelne Domänen des Typs DBLβC2 verfügen über Bindungskapazität an ICAM-1; sie enthalten im Vergleich zu den Domänen ohne Bindungskapazität das cysteinreiche Sequenzmotiv GX<sub>2</sub>CX<sub>4-14</sub>ECX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>Y.

Mit der Kristallisation der stark an ICAM-1-bindenden Domäne wurde begonnen; bestätigt sich das Sequenzmotiv als ICAM-1-bindendes Epitop stellt dies die Grundlage dar, die Bindung infizierter Erythrozyten an ICAM-1 inhibieren und somit die schweren Komplikationen einer zerebralen Malaria beseitigen zu können.

---

<sup>1</sup>Diese Daten wurden noch nicht publiziert; daher wird in dieser Arbeit der Name des Rezeptors nicht genannt und mit *Rx* bezeichnet.

# Kapitel 1

## Einleitung

Malaria ist eine der am weitesten verbreiteten tropischen Infektionskrankheiten, mit 3,3 Milliarden Menschen lebt die Hälfte der Weltbevölkerung in malariaendemischen Gebieten. Hauptsächlich betroffen sind weite Teile der südlichen Hämisphere, Afrika südlich der Sahara, Südostasien sowie Latein- und Mittelamerika (siehe Abbildung 1.1). Die Inzidenz wird von der WHO auf 250 Millionen Fälle jährlich geschätzt [1]. Das Gros der über eine Million Todesopfer, die die Krankheit in jedem Jahr fordert, sind afrikanische Kinder unter fünf Jahren, die mit dem humanpathogenen Erreger *Plasmodium falciparum* infiziert sind.

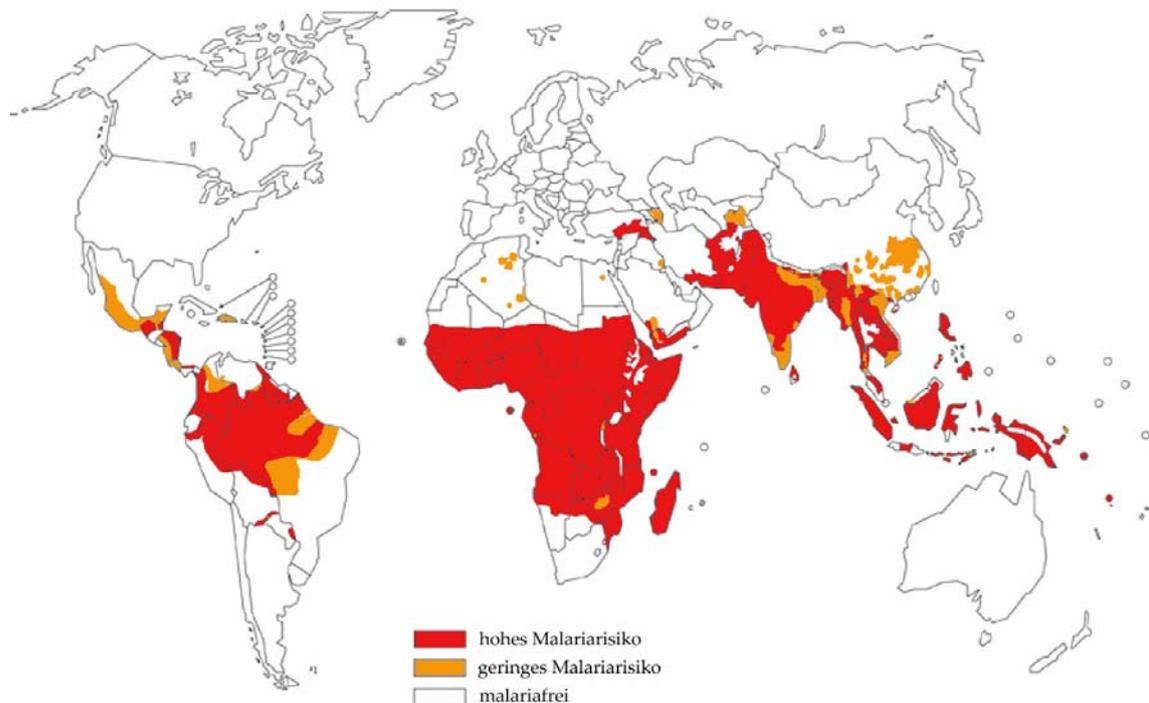


Abbildung 1.1: Verbreitungskarte der Malaria. verändert nach WHO, 2008 [1].

## 1.1 Klassifizierung

Plasmodien sind obligat parasitäre Protisten, die unter den Stamm der Apicomplexa, mit einem apikalen Organellenkomplex als namensgebendes Alleinstellungsmerkmal, unter die Klasse der Haematozoa und darunter unter die Ordnung der Hemosporida subsumiert werden [2]. Zu den Plasmodien zählen mehr als 170 Arten, vier davon sind humanpathogen: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*. Sie unterscheiden sich neben ihrer Morphologie und ihrer geographischen Verbreitung durch die Qualität der Malaria Erkrankung, die sie verursachen, wobei die Infektion mit *P. falciparum* als Erreger der Malaria tropica zu den schwersten Komplikationen führen kann. Sie alle werden durch Stiche weiblicher Mücken der Gattung Anopheles übertragen.

## 1.2 Der Entwicklungszyklus von *P. falciparum*

Der Entwicklungszyklus von Plasmodien ist durch einen Wirts- und einen damit verbundenen Generationswechsel gekennzeichnet. Endwirt ist die weibliche Anopheles-Mücke, in der die sexuellen Vermehrungsvorgänge stattfinden. Mit ihrer Blutmahlzeit nimmt die Mücke das erste sexuelle Stadium, die Gametozyten auf, die sich zu Makro- durch Mikrogameten fortentwickeln. Diese verschmelzen zu einer motilen Zygote, dem Ookineten, dem einzig diploiden Stadium im Lebenszyklus von Plasmodium. Nach Durchwanderung der Epithelzellen des Mückenmagens entwickelt sich der Ookinet zur Oozyste, in der durch asexuelle Reduktionsteilungen tausende Sporozoiten entstehen. Die Sporozoiten gelangen in die Speicheldrüsen der Mücke und können so mit dem nächsten Stich in den menschlichen Zwischenwirt injiziert werden. Bereits zwei Minuten nach Inokulation können Sporozoiten in den Hepatozyten gefunden werden, in die sie nach Transmission durch Makrophagen, die Kupfferschen Sternzellen, eingedrungen sind [3]. Dort wachsen sie in einer parasitophoren Vakuole zu bis zu 10000 Merozoiten heran, die sich sackartig als Merosom ins Blut abschnüren. Der Merozoit, das dritte der invasiven Stadien von Plasmodium invadiert rote Blutzellen, in denen sich der Parasit innerhalb von 48 Stunden vom jungen Trophozoiten, der aufgrund seiner Morphologie als Ringstadium bezeichnet wird, zum adulten entwickelt, der sich durch in der Regel drei bis fünf Schizogonien zum Schizonten differenziert. Nach Ruption der Erythrozyten werden bis zu 32 Merozoiten ins Blut entlassen, die ihrerseits neue rote Blutzellen invadieren können. Ein Teil der Merozoiten differenziert sich nach wenigen Generationen zu Gametozyten, die nach Aufnahme in die Anopheles-Mücke den Zyklus von Neuem beginnen lassen.

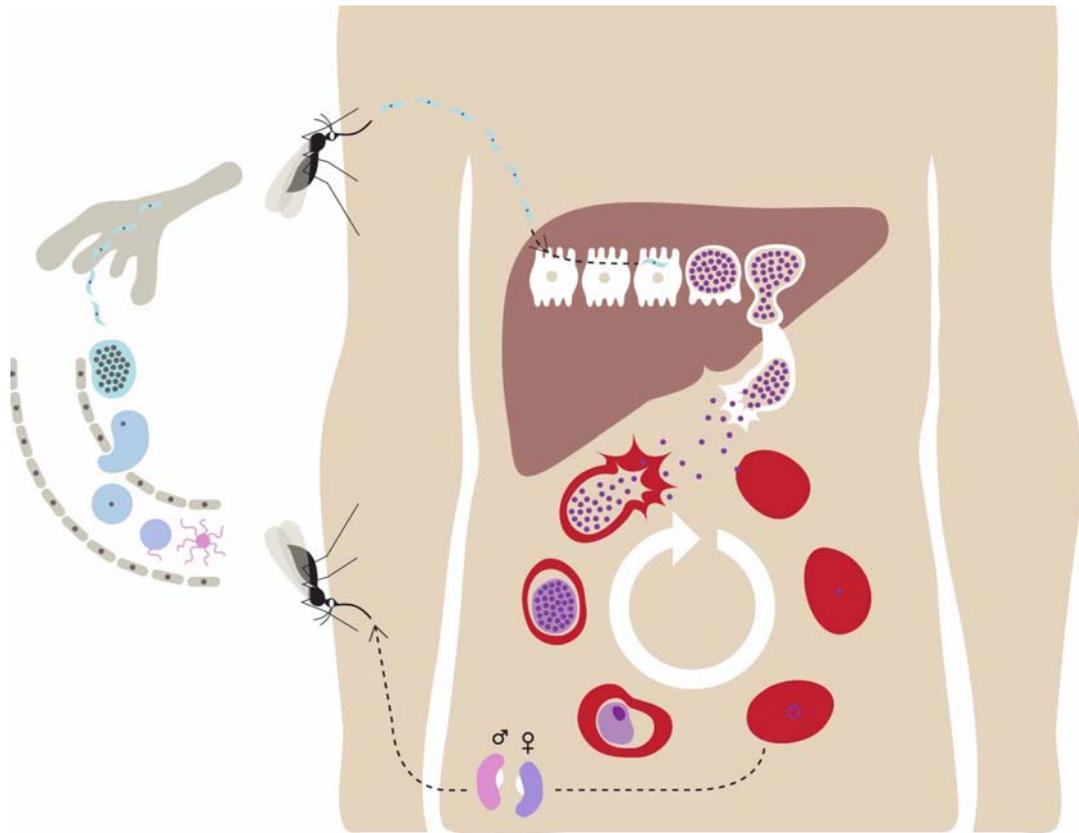


Abbildung 1.2: Der Entwicklungszyklus von Plasmodien. Erläuterungen stehen im Text.

### 1.3 Das Krankheitsbild der *Malaria tropica*

*P. falciparum* wächst im Wirt unsynchronisiert, weshalb das Fieber, eine Folge der Freisetzung der Merozoiten in die Blutbahn, kontinuierlich besteht. Die Symptome der Krankheit treten erst nach Befall der Erythrozyten auf. Diese sind neben dem Fieber Azidosen, Hypoglykämien und zum Teil schwere Anämien, deren Ursache einerseits der mit dem Befall einhergehende Funktionsverlust der Erythrozyten, hauptsächlich aber die spontane Hämolyse uninfizierter roter Blutkörperchen darstellt [4]. Schwere Organschäden von Niere, Leber, Herz und Gehirn sind die Folge von durch zytoadhärente infizierte Erythrozyten verstopfte Kapillaren, die zu einer Unterversorgung der Organe mit Sauerstoff führen [5]. Bei der zerebralen Malaria, eine der schwersten Verlaufsformen der *Malaria tropica*, bewirken infizierte rote Blutzellen mittelbar und unmittelbar starke Beeinträchtigungen der Gehirnfunktionen wie Koordinationsstörungen und Verwirrheitszustände, die in schweren Fällen bis zu Koma und Tod führen können [2]. Diese Symptome werden einerseits direkt durch die adhären den parasitierten Erythrozyten, andererseits durch metabolischen Stress und die physiologischen Reaktionen des Wirts (siehe 1.5.2) auf Adhäsion an Endothelrezeptoren des Gehirns hervorgerufen [6, 7].

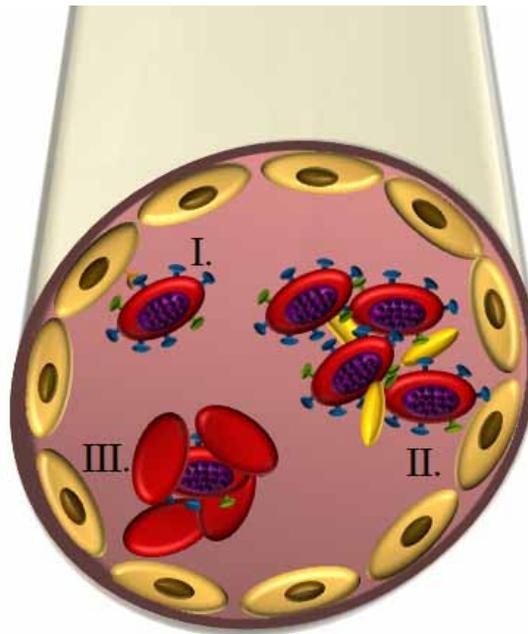


Abbildung 1.3: Die Hauptformen der Adhäsion infizierter Erythrozyten.

I: Sequestrierung an Wirtsendothelzellen; II: thrombozytenvermittelte Verklumpung; III: *Rosetting*. Erläuterungen stehen im Text.

## 1.4 Die Formen der Adhäsion infizierter Erythrozyten

Neben der Zytoadhäsion an Wirtsendothelzellen gibt es zwei weitere Hauptformen der Adhäsion parasitierter roter Blutzellen, das sogenannte *Rosetting*, die Bindung an nicht infizierte Erythrozyten [8] und die Interaktion mit Thrombozyten. Diese führt zur Aggregation beider Zelltypen; dieses Phänomen wird daher auch als thrombozytenvermittelte Verklumpung bezeichnet [9]. Durch die Adhäsion in peripheren Gefäßsystemen und Organen entgeht der Parasit dem Blutstrom durch die Milz, die alte und infizierte Erythrozyten erkennt und eliminiert.

## 1.5 Adhäsionsrezeptoren

Die Fähigkeit mit *P. falciparum*-Trophozoiten infizierter roter Blutzellen, an Endothelrezeptoren in Wirtskapillaren zu binden, steht mit vielen Symptomen der Malaria tropica in direktem Zusammenhang. Im Jahre 1989 wurde mit CD36, auch als Glykoprotein IV bezeichnet, der erste Endothelrezeptor bekannt [10], der mit infizierten Erythrozyten interagiert. Inzwischen kennt man weiterhin Thrombospondin [11], das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 [12], VCAM-1, PECAM-1 und NCAM [13, 14, 15], die Selektine P-Selektin und E-Selektin [13], Chondroitinsulfat A [16], Hämagglutinin [17, 18] und Hyaluronsäure [19]. Die Interaktion der Endothelrezeptoren CD36 und ICAM-1 mit infizierten Erythrozyten sind im Folgenden näher beschrieben; über die Bindung an die übrigen

genannten Rezeptoren liegen bis zum heutigen Tag kaum Informationen vor.

### 1.5.1 CD36

Fast alle *P. falciparum*-Isolate sind in der Lage, an das auf den meisten Endothelzellen präsentierte 88 Kilodalton große, glykosilierte Oberflächenmolekül CD36 zu binden [20]. Obwohl CD36 auf Endothelzellen des Gehirns vorkommt, konnte kein Zusammenhang mit den Komplikationen einer zerebralen Malaria gezeigt werden [7], und die Rolle, die die CD36-Bindung in der Pathogenität der *Malaria tropica* überhaupt spielt, ist unklar [21]. Die Liganden seitens der parasitierten Blutzellen sind bekannt, es sind Varianten des *Plasmodium falciparum* Erythrozyten Membran Protein 1 (PfEMP1, siehe 1.6.1). Daneben können die Erythrozytenoberflächenproteine Spektrin und Bande 3-Protein an CD36 binden, nachdem sie durch die Infektion der Erythrozyten mit *P. falciparum* durch einen nicht bekannten Mechanismus verändert wurden [22, 23].

### 1.5.2 ICAM-1

ICAM-1, oder CD54, zählt zur Superfamilie der Immunglobuline G und wird auf Endothelzellen und Leukozyten präsentiert [24]. Sein natürlicher Ligand ist das T-zellproliferierende LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen*). Die Bindung infizierter Erythrozyten an ICAM-1 gilt als entscheidender Prozess im Ausbruch wie in der Schwere des Verlaufs einer zerebralen Malaria. Einerseits hat sie einen synergistischen Effekt auf die verstärkte Präsentation des Rezeptors selbst [7], andererseits bewirkt sie unter anderem die Aktivierung von MAP-Kinasen, Transkriptionsfaktoren sowie des Tumor Nekrose Faktors TNF- $\alpha$  und Interleukinen [25, 6, 24]. Auch für die Bindung an ICAM-1 sind PfEMP1-Moleküle verantwortlich [26, 27, 28], die Details werden, sofern bekannt, unter 1.6.1 erläutert.

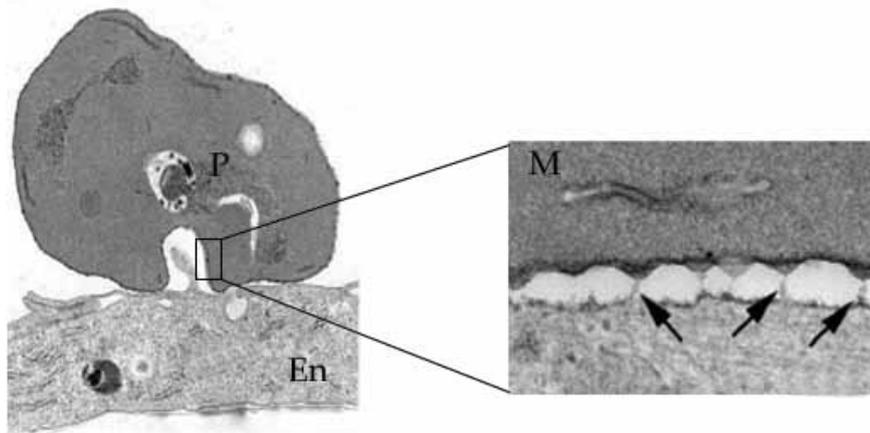


Abbildung 1.5: Sequestrierung von Plasmodium am Wirtsendothel.

P: Parasit; En: Wirtsendothel; M: Maurersche Spalten. Die Maurerschen Spalten sind ein parasitäres Kanalsystem, das Teil der Proteintransport- und Sortierungsmaschinerie ist [30]; nach [31].

## 1.6 Definierte und potenzielle Adhäsionsliganden: Variable Oberflächenproteine

Der parasitierte Erythrozyt weist erhebliche Modifikationen seiner Oberfläche auf, die Verankerung von Plasmodien-Proteinen in seiner Membran führt zu lokalen, elektronendichten Ausstülpungen, die als *Knobs* bezeichnet werden (vgl. Abb. 1.4). Die in den *Knobs* verankerten Proteine interagieren mit Wirtsendothelrezeptoren; in Abbildung 1.5 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme dieser Interaktion gezeigt.

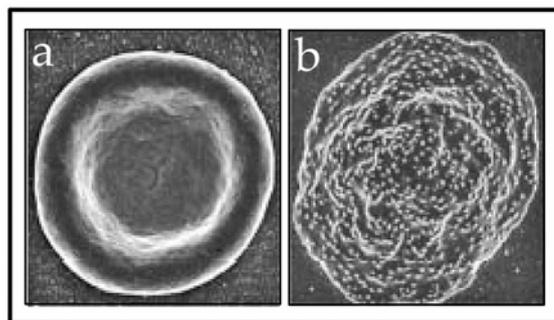


Abbildung 1.4: Modifikationen der Wirtszellmembran.

a: rote Blutzelle; b: mit *P. falciparum* infizierte rote Blutzelle. Die Präsentation von Parasitenprotein führt zu Ausstülpungen der Erythrozytenmembran; nach [29].

### 1.6.1 Die PfEMP1-Proteinfamilie

Das *Plasmodium falciparum* Erythrozyten Membranprotein 1 ist ein Vertreter der variablen Oberflächenantigene (VSAs). Die Proteine sind mit Molmassen zwischen 200 und 350 Kilodalton sehr groß und hochvariabel [32]. Da diese Proteine in der Erythrozytenmembran verankert sind, bestehen sie aus einem intrazellulären und einem extrazellulären Teil sowie einem Membrananker (siehe Abbildung 1.6). Die Aminosäuresequenz von PfEMP1 lässt auf das Vorhandensein einer Transmembrandomäne schließen, jedoch wird vermutet, dass die Verankerung über die Bindung des zytosolischen C-Terminus an KAHRP (*Knob associated histidine rich protein*) stattfindet.

Der extrazelluläre Teil des PfEMP1 weist neben einem variablen N-Segment immer Blöcke unterschiedlicher Domäentypen als Grundbausteine auf: *Duffy-Binding-Like* (DBL)-Domänen, *Cysteine-Rich Interdomain Regions* (CIDR)-Domänen und solche des Typs *Constant 2* (C2). DBL-Domänen sind als Adhärenzvermittler auch aus anderen Malariaspezies bekannt [33]. Sie werden in die fünf Subtypen  $\alpha$  bis  $\epsilon$  unterteilt. Die CIDR-Domänen, die ausschließlich bei *P. falciparum* vorkommen, gliedern sich in drei Typen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ). DBL- und CIDR-Domänen gemeinsam sind konservierte Cysteinreste innerhalb ihrer Gruppen [33, 34]. Zwischen diesen semikonservierten Blöcken liegen Sequenzabschnitte höchster Variabilität. Der intrazelluläre Abschnitt wird als ATS-Domäne (*acidic terminal segment*) bezeichnet; dieser ist hochkonserviert und vermittelt die Bindung an KAHRP. Die grundsätzliche Proteinstruktur ist der Abbildung 1.7 zu entnehmen.

#### 1.6.1.1 Bindungseigenschaften

Durch die Kombination aus verschiedenen Domänensubtypen werden unterschiedliche Bindungseigenschaften vermittelt; so bindet die N-terminal gelegene CIDR 1 $\alpha$ -Domäne an CD36 [35, 36, 37]. Die Kombination aus DBL $\beta$  und C2 vermittelt die Bindung an ICAM-1 [38, 26, 27, 28], jedoch können nicht alle DBL $\beta$ C2-Domänen an ICAM-1 binden, und es bestehen widersprüchliche Ergebnisse, welche Charakteristika für eine Interaktion gegeben sein müssen [39, 40].

#### 1.6.1.2 *var* Gene

PfEMP1 wird von der *var*-Genfamilie kodiert [32]. Im haploiden Genom des Kulturstammes 3D7 umfasst diese Gruppe 59 Gene [41]. Da bis zum heutigen Tag noch kein Wildisolat vollständig sequenziert wurde, können für den Umfang der *var*-Multigenfamilie in Wildisolaten lediglich Schätzungen angestellt werden.

*Var*-Gene bestehen aus einem Exon I von bis zu 15 Kb, das den extrazellulären Teil und die Transmembrandomäne des Proteins kodiert. Ein zweites, kleineres, Exon II kodiert für die ATS-Domäne und umfasst in etwa 1400 Basenpaare [41]. Zwischen ihnen liegt ein 1000 Basenpaare langes Intron. Aufgrund von Sequenzübereinstimmung ihres 5' untranslatierten Bereichs wurden *var*-Gene in verschiedene Gruppen eingeteilt [42, 43]. Die Unterteilung erfolgte in die Hauptgruppen A,B und C [42, 44]. Eines der 59 Gene besitzen keinerlei Übereinstimmungen mit einer der drei Hauptgruppen und wird daher separat als E bezeichnet. *Var*-Gene liegen auf allen 14 Chromosomen verteilt.

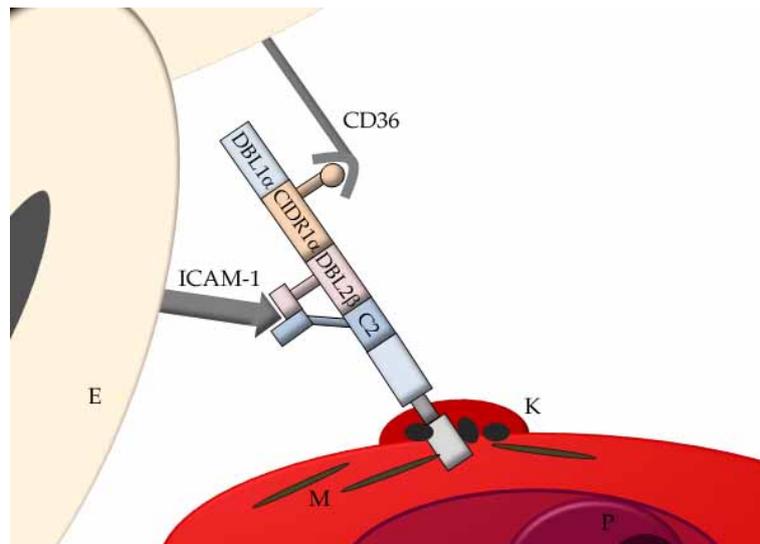


Abbildung 1.6: Sequestrierung von Plasmodium am Wirtsendothel.

E: Endothelzelle; K: Knob; M: Maurersche Spalten; P: Parasit.

Im 3D7 Isolat umfasst Gruppe A zehn Gene, die alle im subtelomeren Bereich liegen und in Telomerrichtung transkribiert werden. Sie besitzen eine komplexe Domänenstruktur vom Typ II, für den eine DBL $\alpha$ - und eine CIDR $\alpha$ -Domäne charakteristisch ist. Keines der von Gruppe A kodierten Proteine bindet an CD36 [42, 45].

35 Gene fallen in die Gruppe B; sie liegen zumeist telomernah und werden in Zentromerrichtung transkribiert.

Gene der Gruppe C liegen alle am Zentromer. Genen der Gruppe B und C ist eine Typ I-Kopfstruktur gemeinsam; für sie ist eine Domänenabfolge dieses Musters charakteristisch: DBL $\alpha$  und CIDR $\alpha$ , danach DBL $\delta$  und eine beliebige weitere CIDR-Domäne [45, 42].

### 1.6.2 Die 2TM-Superfamilie

*P. falciparum* besitzt weitere Multiproteinfamilien, deren Vertreter an den Maurerschen Spalten oder den Knobs lokalisiert wurden und somit an Sequestrierungsprozessen beteiligt sein könnten [46, 47, 48]. Die RIFIN-Familie besitzt 155 Vertreter, zu den STEVORs werden 39 und zur PfMC2TM-Familie 13 Proteine gezählt. Sie alle sind zwischen 20 und 45 Kilodalton groß und besitzen zwei Transmembrandomänen, was ihrer Superfamilie den Namen gegeben hat. Die Abbildung 1.7 zeigt den typischen Proteinaufbau der variablen Oberflächenantigene PfEMP1 und der 2TM-Familie.

Die Gene, die für die 2TM-Superfamilie kodieren, sind zwischen 1,8 und 2,4 Kilobasen groß und liegen zumeist subtelomer, in Einzelfällen zentromer [49]. Jedes der Gene enthält zwei Exons. Die Gene der *rif*-Familie werden aufgrund eines Sequenzmotivs, das nur in einigen *rif*-Genen vorhanden ist, in die Gruppen A und B unterteilt.

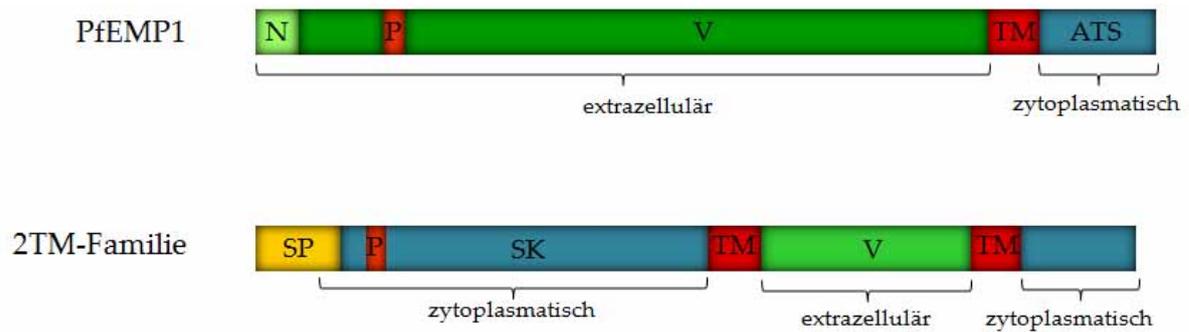


Abbildung 1.7: Der Proteinaufbau Variabler Oberflächenantigene.

ATS: *acidic terminal segment*; N: N-Terminus; P: PEXEL-Motiv; SK: semikonserviert; SP: Signalpeptid; TM: Transmembranregion; V: variabel.

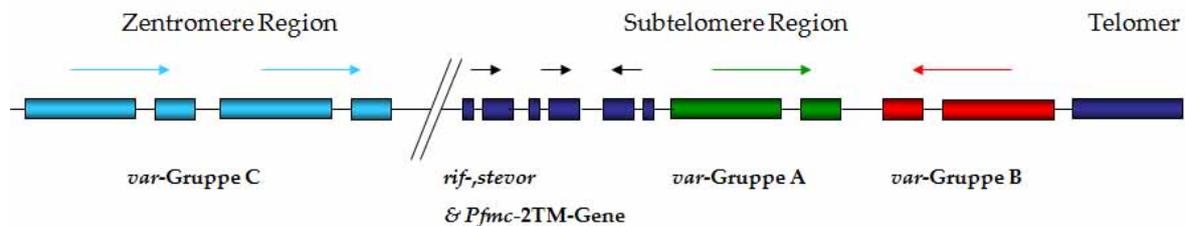


Abbildung 1.8: Die genomische Lokalisation variabler Multigenfamilien; verändert nach [49].

## 1.7 Antigene Variation

Der Wechsel der Genexpression von variablen Oberflächenantigenen führt zur Präsentation eines anderen Proteins auf der Erythrozytenoberfläche. So kann der Parasit der Immunantwort des Wirtes entgehen und erhöht die Wahrscheinlichkeit, die Zeit bis zur Transmission in die Mücke zu überdauern [50].

Es gilt als gesichert, dass jeweils nur PfEMP1-Moleküle eines einzigen Typus an der Erythrozytenoberfläche exprimiert werden, ein Phänomen, das als *mutually exclusive expression* bezeichnet wird [50, 51, 52, 53]. Auch die Gene der 2TM-Superfamilie scheinen an der antigenen Variation beteiligt zu sein [54, 55]. Die Regulation der *var*-Gene erfolgt auf Transkriptionsebene. Wie dieser Regulationsprozess abläuft, ist unklar, scheint aber einem epigenetischen Mechanismus zu folgen [56, 57], und es gibt Hinweise darauf, dass die Multigenfamilien zum Teil gemeinsam reguliert werden [58]. Bekannt ist, dass entscheidende Schritte der Regulation in der S-Phase des Zellzyklusses stattfinden. Das Intron, das selbst schwache Promotoraktivität besitzt, und ein Abschnitt des 5' untranslatierten Bereiches scheinen an der Inaktivierung der *var*-Gene maßgeblich beteiligt zu sein [59, 60, 61].

Die *Switchingrate* in Zellkulturen wurde mit 2,4 % pro Generation bestimmt [62]. Die Wachstumsbedingungen sind in der Kultur ideal und ein Selektionsdruck fehlt, weshalb grundsätzlich zwischen *Switchingraten in vitro* und *in vivo* unterschieden werden muss. Die Fragen nach dem molekularen Mechanismus und der Häufigkeit der Änderungsraten bleiben aber nach wie vor weitgehend unbeantwortet.

Für die Aktivierung eines neuen *var*-Gens und die Inaktivierung des bislang exprimierten sind grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen denkbar: Der Wechsel kann zufällig oder programmiert erfolgen. Mit Hilfe eines mathematischen Modells wurde versucht, sich dem Problem theoretisch zu nähern. Gemäß diesem Modell ist eine programmierte Abfolge der *var*-Genexpression wahrscheinlich [63]. Sowohl theoretische Überlegungen als auch empirische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Wechselraten für unterschiedliche *var*-Gene unterschiedlich sind; das heißt, im Genom von *P. falciparum* gibt es schnell und langsam *switchende* Gengruppen [63, 31], wobei gezeigt werden konnte, dass Gene der Gruppe A schneller aktiviert und deaktiviert werden als solche der Gruppen B und C [51, 64, 65].

Grundelemente in der Strategie des Parasiten zur Immunevasion sind demnach ein großes Repertoire an variablen Oberflächenantigenen, deren Gene so lange stumm vorliegen, bis die Genexpression vom aktivierten zu einem der still gelegten hin gewechselt wird [66].

## 1.8 Zielsetzung

Durch Sequestrierung mit an der Erythrozytenoberfläche präsentierten variablen Proteinen am Wirtsendothel wird die Infektion mit *P. falciparum* im Wirt etabliert. Das Repertoire an Antigenen innerhalb eines Genoms ist groß, innerhalb des Genpools aller *P. falciparum*-Klone schier unendlich. Demgegenüber steht eine begrenzte Anzahl an Endothelrezeptoren des Wirtes und die schweren Komplikationen einer zerebralen Malaria, bei der infizierte Erythrozyten im Gehirn adhären, sind vergleichsweise selten [23]. Durch den regelmäßigen Wechsel der präsentierten Antigene entgeht der Parasit der Immunantwort des Wirtes; die Wechselraten *in vivo* sowie der zugrundeliegende molekulare Mechanismus sind weitgehend ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es daher erstens, die *Switching*raten von *P. falciparum*-Isolaten aus nicht-immunen Patienten zu analysieren. Hierzu wurde die *var*-Genexpression der *ex vivo* und sukzessiver *in vitro* Generationen auf die Frage nach der Quantität der exprimierten Gene und den Wechselraten der Expression hin untersucht. Mit Hilfe spezifischer Peptidantikörper sollte untersucht werden, ob der Wechsel des PfEMP1-Proteins analog zu dem der Genexpression stattfindet.

Zweitens wurde die Bindung infizierter Erythrozyten an zwei Rezeptoren des Hirnendothels auf Expression variabler Oberflächenantigene überprüft. Dabei wurde eine Methode etabliert, in der infizierte Erythrozyten über zwei Parasitengenerationen an den Endothelrezeptor gebunden wurden, um die Bindungscharakteristika mit der Genexpression variabler Oberflächenantigene innerhalb einer Parasitengeneration über zwei erythrozytäre Zyklen hinweg miteinander vergleichen zu können.

Da jedes *P. falciparum*-Isolat über die gleichen PfEMP1-Domärentypen verfügt, die aber innerhalb eines Isolates sowie zwischen den Isolaten hochgradig variieren, wurde drittens die Bindung 24 rekombinant exprimierter PfEMP1-Domänen an Endothelrezeptoren mit Schwingquarzsensoren untersucht. Dabei sollte ein Zusammenhang zwischen Bindungsstärke und Sequenz hergestellt werden.

# Kapitel 2

## Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Software

##### 2.1.1.1 Geräte

<i>Hersteller / Lieferant</i>	<i>Bezeichnung</i>
Bandelin	Sonorex Super Ultraschallbad
Beckmann	J2-21 Centrifuge J2-HS Centrifuge L8 70M Ultracentrifuge Optima TL Ultracentrifuge
Biometra	T3 Thermocycler
Carl Zeiss	Axioskop 2
Eppendorf	BioPhotometer
F. Gehring	<i>FidgeType FgT1</i>
Hassa	Gradientenmischer 500 ml
Leica	Fluoreszenzmikroskop
Marienfeld	Neubauer-Zählkammer
Miltenyi Biotec	Vario MACS
Olympus	IX 81, konfokales Mikroskop
PeqLab	Primus 25 advanced PCR Cycler PerfectBlue Tank-Elektroblotter
PerkinElmer	PerkinElmer Cetus DNA Thermal Cycler PCR
Wilke GmbH	Orbitalschüttler Rocky

**2.1.1.2 Software**

<i>Hersteller / Lieferant</i>	<i>Bezeichnung</i>
Accelrys	MacVektor 10.0
mekentosj	Enzyme X 3.1
PerkinElmer	Openlab 4.0.2
Swiss Institute of Bioinformatics	ProtParam
QCMLab	QCM-soft

## 2.1.2 Chemikalien

<i>Hersteller / Lieferant</i>	<i>Chemikalie</i>
Amersham Bioscience	Sephadex G-50 Superfine (20-80 $\mu\text{m}$ )
AppliChem	Acrylamid/Bisacrylamid Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
Biochrom	Ficoll Separating Solution
Biomol	IPTG Tris X-Gal
Carl Roth	Imidazol Lennox Broth Agar Lennox L Broth Base Natriumchlorid p.a. $\geq 99,5\%$ ( $\text{NaCl}$ ) Methanol p.a. $\geq 99,9\%$ Milchpulver blotting grade Tris-Hydrochlorid $\geq 99\%$ (Tris/HCl)
Gibco/Invitrogen	RMPI + <i>L</i> -Glutamin, + 25nM HEPES, - $\text{NaHCO}_3$ Albumax II
Hexal	Gentamicin 40
Invitrogen	Agarose Electrophoresis Grade
Merck	Borsäure p.a. Chloroform p.a. <i>D</i> (+)-Glucose-Monohydrat Ethanol p.a. Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ ) Natriumacetat-Trihydrat ( $\text{NaAc}$ )
PAA	G418-sulphate-solution HAMS F12 Penicillin/Streptavidin 100
Qiagen	Ni-NTA-Superflow
Roche	Ampicillin Protease Inhibitor Mix EDTA-free
Serva	Glutathion (reduced form) Xylene Cyanol FF
Sigma-Aldrich	Bromphenolblau DAPI DMSO EDTA p.a. Guanidinium-Hydrochlorid Hypoxanthine $\geq 99\%$ Kanamycinsulfat Luminol Parahydroxycoumarinsäure

### 2.1.3 Enzyme und Kits

<i>Hersteller / Lieferant</i>	<i>Produkt</i>
Eppendorf	Fast Plasmid Mini
Fermentas	<i>EcoRI</i> fast digest <i>EcoRV</i> fast digest <i>BamHI</i> fast digest <i>HindIII</i> fast digest <i>KpnI</i> fast digest <i>SpeI</i> fast digest T4-Ligase
Invitrogen	Random Hexamers Superscript III First-Strand Synthesis System TOPO TA Cloning Kit
Macherey-Nagel	NucleoSpin Extract II
PAA	Accutase
Promega	GoTaq Flexi DNA Polymerase DNase
Qiagen	QIAmp DNA Mini Kit
Roche	<i>Long Range PCR Kit</i>

### 2.1.4 Puffer und Medien

#### 2.1.4.1 Puffer

<i>HT-PBS-Puffer (1x)</i>	
NaCl	1,27 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	5,2 mM
<i>pH</i> von 7,2 mit NaOH einstellen	
<i>DNA-Ladepuffer (6x)</i>	
Brompenolblau	0,25 %
Xylene Cyanol FF	0,25 %
Sucrose in H <sub>2</sub> O	40 %
<i>TBE-Puffer (1x)</i>	
Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2,5 mM

<i>Puffer A</i>	
GuHCl	4 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM
Tris HCl	10 mM
red. Gluthation	10 mM, frisch zugeben
<i>pH 8</i>	

<i>Puffer B</i>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM
Tris HCl	10 mM
red. Gluthation	10 mM, frisch zugeben
<i>pH 8</i>	

<i>Puffer C</i>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM
Tris HCl	10 mM
Imidazol	200 bzw. 500 mM
red. Gluthation	10 mM, frisch zugeben
<i>pH 5,9</i>	

<i>Puffer D</i>	
NaCl	50 mM
Tris HCl	10 mM
GuHCl	20 mM
red. Gluthation	10 mM, frisch zugeben
Tween 20	0,05 %
<i>pH 5,9</i>	

<i>TBS-Puffer (1x)</i>	
Tris	1,21 g
NaCl	8,77 g
<i>pH 7,5 in 1 L A. bidest.</i>	

<i>Stammlösung S</i>	
Tris base	6,06 g
NaN <sub>3</sub>	0,01 g
SDS	0,4 g
<i>pH 6,8 in 100 mL A. bidest.</i>	

<i>Trizingel-Probenpuffer (2x)</i>	
Stammlösung S	2,5 mL
SDS	2,0 g
Glycine	20 mL
Orange G	40 mg
in 100 mL A. bidest.	

<i>Gelpuffer (3x)</i>	
Tris base	36,3 g
SDS	0,3 g
<i>pH 8,45 in 100 mL A. bidest.</i>	

<i>Kathodenpuffer (1x)</i>	
Tris	12,1 g
Trizin	17,9 g
SDS	1 g
<i>pH 8,25 in 1 L A. bidest.</i>	

<i>Anodenpuffer (1x)</i>	
Tris	24,28 g
<i>pH 8,9 in 1 L A. bidest.</i>	

<i>Transferpuffer (1x)</i>	
Glycine	14,4 g
Tris base	3,02 g
SDS	0,37g
Methanol	20 %
in 1 L A. bidest.	

<i>Fraktionierungspuffer (1x)</i>	
Tris-HCl	7,88 g
NaCl	8,77 g
EDTA	0,37g
<i>pH 8,0 in 1 L A. bidest.</i>	

## 2.1.4.2 Medien

<i>Plasmodien-Kulturmedium</i>	
RPMI 1640	31,8 g
Natriumhydrogencarbonat	2,0 g
D – (+)-Glucose-Monohydrat	4,0 g
in ca.1,6 L <i>aqua bidest.</i> lösen	
Albumax II	10 g
in ca.150 mL <i>aqua bidest.</i> lösen	
Hypoxanthin	54,4 mg
in 4 mL 1 M NaOH lösen	
Ansätze mischen	
<i>pH</i> mit NaOH auf 7,4 einstellen, mit <i>aqua bidest.</i> auf 2 L auffüllen +1 mL Gentamicin zum sterilfiltrierten Medium	
Lagerung maximal 4 Wochen bei 4 °C	

<i>CHO-Zellkulturmedium</i>	
Hams F12	500 mL
inakt. FCS	50 mL
Pen/Strep 100 x	5,5 mL
G418	7,7 mL
Lagerung maximal 2 Wochen bei 4 °C	

<i>CHO-Einfriermedium</i>
<i>CHO-Zellkulturmedium</i> + 10 % iFCS 10 % DMSO
Lagerung bei 4 °C

<i>Bindungsmedium</i>
RPMI + 2 % Glukose
pH 7,2, steril filtrieren

<i>LB-Agar</i>	
Lennox Broth Agar	32 g
mit <i>aqua dest.</i> auf 1 L auffüllen	
autoklavieren	

<i>LB-Medium</i>	
Lennox L Broth Base	20 g
mit <i>aqua dest.</i> auf 1 L auffüllen	
autoklavieren	

### 2.1.5 Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Organismus</i>	<i>Konjugation</i>	<i>Quelle</i>
anti CIDR1 $\alpha$	Maus	–	eigene Herstellung
anti DBL2 $\beta$	Maus	–	eigene Herstellung
anti His	Maus	–	Dako
anti Kaninchen	Ziege	Alexa 488	Fermentas
anti Maus	Ziege	Peroxidase	Dako
anti Maus	Ziege	Alexa 488	Fermentas
anti 1811-ev	Kaninchen	–	Pineda
anti 1811-1G	Kaninchen	–	Pineda

### 2.1.6 Marker

<i>Hersteller / Lieferant</i>	<i>Produkt</i>
Fermentas	GeneRuler 100 bp DNA Ladder GeneRuler 1 Kb DNA Ladder PageRuler Prestained Protein Standard PageRuler Unstained Protein Standard

**2.1.7 Verbrauchsmaterial**

<i>Hersteller / Lieferant</i>	<i>Produkt</i>
B. Braun Aesculab	Sterican Einmal-Injektions-Kanüle Cutfix Surgical Disposable Scalpel Discofix drei-Wege-Hahn Einmalspritzen, 10 mL, 25 mL
BD Bioscience	Centrifuge Tubes; 15 mL, 50 mL Pipettes Polystyrene Nonpyrogenic; 10 mL, 25 mL
Biozym	PCR-Softstrips; 0,2 mL Reaktionsgefäße; 1,5 mL; DNA-, DNase-, RNase-frei
Carl Roth	Einmal-Impfösen
Engelbrecht	Geschnittene Objektträger; Mattrand
Eppendorf	0,2 mL PCR-Tubes Safe-Lock-Tubes; 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL UVette
GE Healthcare	Amersham Hyperfilm ECL
Greiner Bio-One	Filter Tips Zellkulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> Pipette Tips; 1000 µL, 200 µL
Millipore	Amicon centrifugal filter device, CO 3kD, 5kD, 15kD
Miltenyi Biotec	MACS-Säulen
MoBiTec	10 mL Säulen, 90 µm Porengröße
Nunc	TC Dish 92 × 17 Vents Nunclon D SI
Sarstedt	96 Multiply PCR Platte Aluminiumfolie Biosphere Deckelketten Klebefolie, optisch klar Petrischale 92 × 16 mm Serologische Pipette; 5 mL Pipettenspitzen; 10 µL
Whatman	Optitran BA-S83 Nitrozellulosemembran

### 2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins synthetisiert. Alle Stocklösungen hatten eine Konzentration 100 mM und wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Angabe der Sequenzrichtung ist im Folgenden stets  $5' \rightarrow 3'$ .

*Verwendungszweck*    *Nukleotidsequenz*

#### *Reverse Transkription*

var2<sup>1</sup>                    GGTTCWARTACYACTTCWATYCCTGGTRCATATATAT  
                               CATTAATATCCAATTCTTAATAYTCACTTTCKGADGA  
 var4                     DCCAAAWARTTCATTTTCTTTWCKTTTWABTTCATC  
                               ATATATATC

#### *Spezifische Amplifizierung der cDNA*

UpsA\_for<sup>2</sup>              AACTTACCATAAATTATCATCAAA  
 UpsB\_for<sup>2</sup>              CTACTWTATAATTTTASAAAATAWAWAAAAC  
 UpsC\_for<sup>2</sup>              AATATTCATATCCCACATTRTCATATAT  
 UpsB/C\_for             TAKAWATATGATAGATAATATAGA  
 DBL\_FADall\_rev<sup>2</sup>      CCWATRKCDGCAAAACTBCKWGC  
 rifA\_for<sup>6</sup>                TGTAAGAWMAATGYGAHAARGA  
 rifA\_rev<sup>6</sup>                TTCGCAAAYRCAWGTDGGWAT  
 rifB\_for<sup>6</sup>                CGACAARCNTCACAAMGWTT  
 rifB\_rev<sup>6</sup>                CACYCCTARHSCAMACCCACA  
 stevor\_for              TCCRCATTATCAYAATGAYCCAG  
 stevor\_rev              AAATGTTTCTTGCATTCATGTTTC  
 PfmC2TM\_for            AGTAATAACGAAGAATGTAAAG  
 PfmC2TM\_rev            TCAGGAAARWAACGARC

#### *DNA Persistenz-Kontrolle*

Synthetase\_for<sup>4</sup>        AAGTAGCAGGTCATCGTGGTT  
 Synthetase\_rev<sup>4</sup>        TTCGGCACATTCTTCATAA  
 Aldolase\_for<sup>4</sup>            TGTACCACCAGCCTTACCAG  
 Aldolase\_rev<sup>4</sup>            TTCCTTGCCATGTGTTCAAT

Verwendungszweck Nukleotidsequenz

*Rekombinante Expression*

DBL1 $\alpha$ -short-fwd	GAATTCGAACAAATAAGGCCTGAACAA
CIDR1 $\alpha$ -short-fwd	GAATTCGAATGTAAAAAATATGTGTT
CIDR1 $\alpha$ -short-rev	GGATCCTTAATTCTGTTATTTCTTCTGTGGAA
DBL2 $\beta$ -fwd	GAATTCTGAGGTAAAGGATGGTTGGAAAAG
DBL2 $\beta$ -trunc-rev	GGATCCTTAGTTATGTACGGTACTTGCATA
C2-fwd	GAATTCCTCAAAGAATTACACCAACAA
C2-rev	GGATCCTTATCCCTGTATATCATCTGCTGC
A11-08-2g-f	GAGAATTCATGTGTGGCCATGGTGACAATGA
A11-08-2g-r	GAGGATCCTTAATATTTTCTACATTCTTCTTC
A11-08-4b-f	GAGAATTCGGGGATTAGAAAATTTGAA
A11-08-4b-r	GAGGATCCTTAGTTTTGACCATTAACGCAGG
A11-08-4b+c-f	GAGAATTCGGGGATTAGAAAATTTGAA
A11-08-4b+c-r	GAGGATCCTTATCCCTGCCGAGCACGAGGAAC
C07-48-1a-f	GAGAATTCGGTGATTTGAAAGGAAATTT
C07-48-1a-r	GAGGATCCTTACGTATTATCATATTTATTGAT
C07-48-2d-f	GAGAATTCTCTGTTCAAATTTGCAAATG
C07-48-2d-r	GAGGATCCTTAATTGATAGTTCCATGTGATG
B10-01-2d-f	GAGAATTCGTGCCGCAGTATCTTCGCTG
B10-01-2d-r	GAGGATCCTTAGTCTTTAACTTCTTGGCATG
A13-03-2b-f	GAGAATTCTATTTTAGAAAAGGTTTAG
A13-03-2b-r	GAGGATCCTTAACGTGGACATTCTAGATCC
A13-03-2b+c-f	GAGAATTCTATTTTAGAAAAGGTTTAGAT
A13-03-2b+c-r	GAGGATCCTTATTCGTATTTTTCTTTTGTTT
A13-03-5b-f	GAGAATTCGGCGATATATTTAAGGTTACA
A13-03-5b-r	GAGGATCCTTAGACTCTACTAACATCTAATT
A13-03-5b+c-f	GAGAATTCGGCGATATATTTAAGGTTACA
A13-03-5b+c-r	GAGGATCCTTAAGATACATAATGGTTCTTTG
BB0-10w-2g-f	GAGAATTCATATGTGACGCTTAGTAA
BB0-10w-2g-r	GAGGATCCTTATGCAAGAGAACATTTAGTAC
AD0-20c-1a-f	GAGAATTCGGATATACAAGTCAATTGAGA
AD0-20c-1a-r	GAGGATCCTTACCTTCGGAATGGTGCACATGC
AD0-20c-2b-f	GAGAATTCTCAGACGATACTATCGTTTT
AD0-20c-2b-r	GAGGATCCTTAACAGCCAGTACACTTATTTTC
AD0-20c-2b+c-f	GAGAATTCTCAGACGATACTATCGTTTTTAC
AD0-20c-2b+c-r	GAGGATCCTTAATTTACATATGTTTCTATTTTC
CF0-45-2b-f	GAGAATTCTCTGTTCAAATTTGCAAATG
CF0-45-2b-r	GAGGATCCTTACCAATGTACGAAAGGATCAC
CF0-45-2b+c-f	GAGAATTCTGCTCTGTTCAAATTTGCAAAT
CF0-45-2b+c-r	GAGGATCCTTAGATAGTTCCATGTGATGTTT
A11-20w-2e-f	GAGAATTCACCTTCTGATGTTTGTACTGC
A11-20w-2e-r	GAGGATCCTTAGTTCGCTGTCCACCAATCTT

---

*Verwendungszweck*    *Nukleotidsequenz*

*Amplifizierung der var-Gene aus Patientenisolat 19*

1811ev\_fwd            CGAAAGCAGTATTTTCGTCATCCAT  
 18111G\_fwd            GGAACGGTATGGCGAAGGTATAAT

*Sequenzierung*

M13F                    GTAAAACGACGGCCAG  
 M13R                    CAGGAAACAGCTATGAC  
 pJC45-fwd            GGATAACAATCCCCCTCTAG  
 1811evSeq1            TGGGGAATGCATCATCATCAG  
 1811evSeq2            GGTTACTAGTGGATCCGAGAGAAGTT

Die Nomenklatur für redundante Nukleotidpositionen lautet:

*Abkürzung*    *mögliche Nukleotide*

B                    G/T/C  
 D                    G/A/T  
 K                    G/T  
 R                    A/G  
 S                    G/C  
 W                    A/T  
 Y                    C/T

---

<sup>1</sup>aus [64]

<sup>2</sup>aus [67]

<sup>3</sup>aus [67]

<sup>4</sup>aus [68]

<sup>5</sup>aus [69]

<sup>6</sup>aus [46]

## 2.2 Methodik

Alle Arbeitsschritte, die das Führen von Zellkulturen sowie die mit ihnen durchgeführten Bindungsexperimente beinhaltet, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 2.2.1 Plasmodienkultur

Neben der Stammkultur 3D7 wurden Plasmodien infizierter Erythrozyten aus Patientenblut kultiviert. Diesen Patienten wurde in der Ambulanz des Bernhard-Nocht-Institutes der *Plasmodium falciparum*-Befall anhand eines Blutausstriches mikroskopisch diagnostiziert.

#### 2.2.1.1 Reinigung

Die notwendige Abtrennung der Erythrozyten von den übrigen Bestandteilen des Blutes erfolgte über ihre Dichteigenschaften. 1 mL des Patientenblutes wurde mit 5 mL HT-PBS vermischt und über 7 mL einer im Zentrifugenröhrchen vorgelegten Ficoll-Lösung geschichtet. Da die Dichte des Ficolls über der der weißen, aber unter der der roten Blutkörperchen liegt, führt eine Zentrifugation zum Absinken der Erythrozyten auf den Gefäßgrund sowie zur Bildung eines Überstandes der Leukozyten, dem sogenannten *Buffy-Coat*, und weiterer Blutbestandteile.

Die Zentrifugationsbedingungen waren hierbei 20 Minuten bei 4 °C und 1400 g ohne Bremse. Nach dem Verwerfen von *Buffy-Coat*, Plasma und Ficoll wurde das Erythrozytensediment zweimalig mit 10 ml HT-PBS gewaschen. Die Zentrifugationszeit wurde auf 5 Minuten verkürzt und die Bremse verwendet.

#### 2.2.1.2 Kultivierung

Die Erythrozyten wurden in Zellkulturschalen mit Kulturmedium auf ein Volumen von 10 mL gebracht. Prinzipiell sollte durch Zugabe von Blut aus der Blutbank der Gruppe 0<sup>+</sup> der Hämatokrit zwischen 3 % und 4 % eingestellt werden. Jedoch empfahl es sich, die erste Zugabe von frischen Erythrozyten erst zwei Tage nach Kulturnahme erfolgen zu lassen.

Es war erforderlich, die Zellkultur regelmäßig mit einem Gasgemisch folgender Zusammensetzung zu begasen: 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> sowie 94 % N<sub>2</sub>. Neben der nahezu anaeroben Umgebung ist eine Temperatur von 37 °C für das Wachstum unabdingbar. Die Zellkulturschalen wurden in luftdichten Plastikgehäusen verwahrt, um ein Eindiffundieren von Sauerstoff zu verhindern. Eine zweiminütige Begasung erfolgte immer nach Öffnen des Gehäuses.

An jedem zweiten Tag wurde das Medium gewechselt und die Kultur gegebenenfalls verdünnt. Der Bewachungsgrad wurde mikroskopisch bestimmt.

#### 2.2.1.3 Mikroskopie

Für einen Blutausstrich wurden ca. 8 µL der Plasmodienkultur auf einem Objektträger unter Zuhilfenahme eines zweiten gleichmäßig ausgestrichen. Der Ausstrich trocknete an der Luft, wurde

eine Minute lang in Methanol fixiert, für ca. 20 Minuten in einer 10%igen Giemsa- Lösung gefärbt, anschließend unter fließendem Wasser kurz gespült und getrocknet.

Durch Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs mit 100facher Vergrößerung konnte die Parasitämie der Kultur sowie das erythrozytäre Stadium bestimmt werden. Eine exakte Bestimmung beider Parameter war für das Gelingen der Versuche unerlässlich.

#### 2.2.1.4 Synchronisation der Plasmodienkultur

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mussten sich die Parasiten einer Population exakt im gleichen Entwicklungszustand befinden.

**Synchronisation der Ringstadien** Adulte Stadien werden durch Diffusion des Zuckeralkohols Sorbitol in das poröse Membransystem des Erythrozyten zum Platzen gebracht. Da in Ringstadien dieses parasitäre Kanal- und Porensystem noch nicht etabliert ist, können junge Ringstadien durch Zugabe von 10 mL einer 5 %igen Sorbitollösung synchronisiert werden. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur ab und an leicht geschwenkt, und das Sediment nach Zentrifugation zweimalig mit 10 mL mit HT-PBS gewaschen.

**Synchronisation der Trophozoiten** Adulte Stadien können synchronisiert werden, indem diese über eingelagertes Haemozoin und darin enthaltenem Fe(III) magnetisch an eine in einen Eisenring geklemmte MACS-Säule (*Magnetic Column*) haften. Diese wurde mit 1 % BSA enthaltendem PBS äquilibriert. Nachdem die Plasmodienkultur langsam durch das Säulenmaterial gedrungen war, wurde so lange mit PBS+BSA gewaschen, bis der Durchfluss klar erschien, bevor durch Entnahme der Säule aus dem Eisenring wiederum mit PBS+BSA die adulten Plasmodienstadien aus dem Säulenmaterial eluiert wurden. Der Aufbau der MACS-Apparatur kann den Herstellerangaben entnommen werden.

#### 2.2.1.5 Ernte

Die Patientenisolat und der Kulturstamm 3D7 wurden nach Kultivierung über distinkte Zeitintervalle geerntet. Hierzu wurde der Inhalt einer Kulturschale für 5 Minuten bei 1800 g zentrifugiert, um das Medium abnehmen zu können. Die verbleibenden Erythrozyten wurden mit dem 20fachen Volumen TRIzol vermengt, das auf 37 °C vorgewärmt worden war. Eine unmittelbare Inaktivierung von RNasen war für den Erfolg der weiteren Versuche unerlässlich; das denaturierende Trizol sollte also möglichst schnell und gleichmäßig verteilt werden. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die Probe bei -70 °C eingefroren. Für Immunfluoreszenzanalysen (siehe 2.2.23) wurden Blutausrichungen von Trophozoitenkulturen angefertigt, getrocknet und in eiskaltem Methanol respektive Aceton über Nacht bei -20 °C fixiert. Danach konnten die Ausrichungen in Alufolie gewickelt bei -20 °C gelagert werden.

### 2.2.2 CHO-Zellkultur

Für Bindungsexperimente wurden drei transfizierte CHO-pgsA-745-Zelllinien kultiviert: zwei davon tragen an ihrer Oberfläche ein Fusionsprodukt aus GFP und den Endothelrezeptoren ICAM-1, respektive  $Rx$ <sup>1</sup>, die Kontrollzelllinie wurde mit einem GFP-tragenden Plasmid transfiziert. Alle CHO-Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe 'Tropenmedizinische Grundlagenforschung' von Prof. Rolf Horstmann zur Verfügung gestellt. CHO-Zellen wachsen adhärent auf Polystyrolböden, je nach Bedarf wurden sie in 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> großen Flaschen, in einem Volumen von 5 mL respektive 15 mL, kultiviert. Bei optimalen Kulturbedingungen und einer Temperatur von 37 °C teilen sich CHO-Zellen alle 24 Stunden. Alle zwei Tage wurde das Medium erneuert und die Kultur verdünnt. Hierzu wurden die Zellen mit 400 µL Accutase vom Flaschenboden abgelöst, die Vollständigkeit der Ablösung mikroskopisch kontrolliert, und ein Bruchteil des Zellvolumens, je nach Bedarf 1/4 bis 1/24, in eine neue Zellkulturfläche mit darin vorgelegtem Hams F12 Medium gegeben.

Da die transfizierten Zellen die Endothelrezeptoren nur über ca. drei Wochen stabil an ihrer Oberfläche präsentieren, war es erforderlich, Teile der Zellkultur regelmäßig einzufrieren und bei Bedarf aufzutauen. Hierzu wurden die Zellen mit einer Neubauerzählkammer ausgezählt, mit Einfriermedium auf  $1 \times 10^6$  Zellen eingestellt und in Cryoröhrchen sukzessive auf -70 °C gekühlt. Die Zellen wurden im 37 °C-Wasserbad fast vollständig aufgetaut und hierauf in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt, in die Medium ohne Neomycin vorgelegt wurde. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium erneuert, das nun Selektionmarker enthielt.

### 2.2.3 Bindungsexperimente mit infizierten Erythrozyten: *Panning*

Die Bindung von Erythrozytenpopulationen, infiziert mit dem Kulturisolat 3D7 beziehungsweise dem Patientenisolat BNI151209, wurde an die Endothelrezeptoren ICAM-1 sowie  $Rx$  getestet. Ein solches Bindungsexperiment wird auch als *Panning* bezeichnet. Die Expression der Multigenfamilien, die für variable Oberflächenproteine kodieren, sollte in Abhängigkeit der Bindungseigenschaften untersucht werden. Da es die Fragestellung mit sich bringt, dass nur die Transkripte der Parasitengeneration nach der Bindung untersucht werden können, wurde ein Versuchsablauf etabliert, in dem das Bindungsexperiment über zwei aufeinanderfolgende Parasitengenerationen durchgeführt wurde. So konnten die Transkripte einer Parasitenpopulation, die in der vorhergehenden Generation an einen Endothelrezeptor gebunden hatte, untersucht sowie die Bindungseigenschaften dieser Parasitengeneration an den selben Rezeptor analysiert werden. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

---

<sup>1</sup>Mit  $Rx$  wurde kürzlich ein neuer, auf Endothelzellen des Gehirns exprimierter Rezeptor identifiziert, an den infizierte Erythrozyten binden können. Diese Daten wurden noch nicht publiziert; daher wird in dieser Arbeit der Name des Rezeptors nicht genannt und im Folgenden immer mit  $Rx$  bezeichnet.

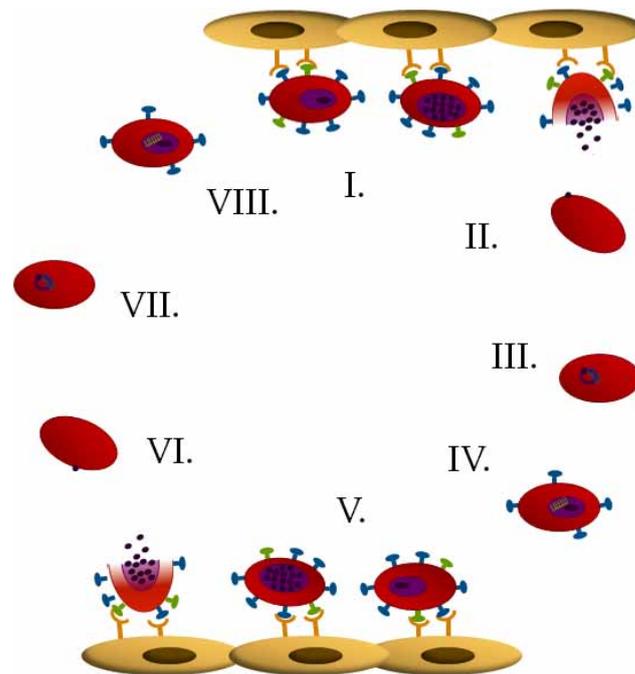


Abbildung 2.1: Versuchsablauf des Bindungsexperiments.

I: Mit 32 Stunden alten Trophozoiten infizierte Erythrozyten werden an eine CHO-Zelllinie gebunden (I). Die gebundenen Zellen entwickeln sich weiter zu Schizonten, der Erythrozyt platzt (II) und Merozoiten befallen neue Wirtszellen, in denen sie sich zu Ringstadien weiterentwickeln. Ein Teil dieser Ringstadien wird zur *var*-Genanalyse geerntet (III), die übrige Population entwickelt sich weiter zum Trophozoiten. 28 Stunden nach Infektion wird RNA zur Analyse der *rifA*- und *B*-, der *stevor*- und *pfmc2tm*-Transkriptionsmuster geerntet (IV), nach 32 Stunden wird das Bindungsexperiment wiederholt (V). Die gebundenen Zellen entwickeln sich wiederum zu Schizonten und Merozoiten, befallen neue Wirtszellen (VI), aus denen sowohl die Ringstadien (VII), als auch die 28 Stunden alten Trophozoiten (VIII) geerntet werden.

### 2.2.3.1 Vorbereitung

Für ein Bindungsexperiment über zwei Parasitengenerationen hinweg empfahl es sich, den einfachen Ansatz eines Experiments zu verzehnfachen. Daher wurden jeweils zwölf  $75\text{ cm}^2$  große Zellkulturflaschen mit ca. 80 %igem Bewuchs von einer den Endothelrezeptor exprimierenden Zelllinie sowie der GFP-exprimierenden Kontrollzelllinie für das Bindungsexperiment kultiviert und zusätzlich jeweils eine, um die CHO-Zellen auszählen zu können (siehe 2.2.3.4). Die Parasitenpopulation wurde mit 4 % humanem Serum so kultiviert, dass zum Zeitpunkt des Bindungsexperiments streng synchronisierte 32 Stunden alte Trophozoiten mit einer Parasitämie von 20 % und einem Volumen von  $50\ \mu\text{L}$  bis  $100\ \mu\text{L}$  pro Ansatz zur Verfügung standen. Hierzu wurden die Ringstadien der Plasmodienkultur über drei bis vier vorhergehende Generation mit Sorbitol synchronisiert, unmittelbar vor dem Bindungsexperiment über die MACS-Säule gegeben (siehe 2.2.1.4) und die entsprechende Parasitenkonzentration nach mikroskopischer Kontrolle eingestellt (siehe 2.2.1.3).

### 2.2.3.2 Panning

Das Erythrozytensediment wurde hierauf in auf 37 °C erwärmtem Bindungsmedium auf 2 % Hämatokrit eingestellt und im Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Ein Milliliter des Gemischs wurde separiert und verblieb während des Experiments im Wasserbad als Kontrolle derer Zellen, die dem Versuch nicht unterzogen wurden (im Folgenden als Kulturkontrolle bezeichnet). Nachdem die Kontrollzelllinie mit 5 mL warmem Bindungsmedium pro Zellkulturflasche gewaschen wurde, wurden die infizierten Erythrozyten zugegeben und adhärten für eine Stunde im Brutschrank auf dem Orbitalschüttler bei 12 Umdrehungen pro Minute an die CHO-Zellen. Im Anschluss wurden die nicht gebundenen Zellen zu den CHO-Zellen gegeben, die an ihrer Oberfläche den Endothelrezeptor trugen, wobei die Wasch- und Inkubationsparameter die gleichen blieben. In einigen Versuchen wurde 1/4 der Parasitenpopulation nach der Präabsorption nochmal an GFP-exprimierende CHO-Zellen gebunden, um den Grad der Abnahme der unspezifischen Bindung untersuchen zu können. Nach jeder Absorption, der Präabsorption wie der spezifischen, wurden 500 CHO-Zellen aus fünf Gesichtsfeldern mit den an sie gebundenen infizierten Erythrozyten unter dem Mikroskop ausgezählt, nachdem die ungebundenen Zellen nach Bedarf in zwei bis fünf Waschschritten vollständig entfernt wurden. Dabei war darauf zu achten, dass das Prozedere sanft genug verlief, um nicht die gebundenen Zellen wieder abzulösen. Die ungebundenen Zellen einer Kulturflasche wurden als Kontrolle weiterkultiviert, der Rest wurde verworfen. Die Bindung der infizierten Erythrozyten wurde auf 100 CHO-Zellen berechnet (vgl. 2.2.3.4).

### 2.2.3.3 Kultivierung zur RNA-Analyse

Nach dem spezifischen Bindungsexperiment wurde zu den gebundenen Erythrozyten 10 mL Plasmodienmedium sowie 250 µL Blutbankblut zugegeben, und die Flaschen unter für Plasmodien optimalen Bedingungen kultiviert (vgl. 2.2.1.2). Aus den beiden Kontrollzellpopulationen wurden jeweils zwei Petrischalen Plasmodienkultur angelegt und diese zusammen mit den anderen kultiviert. Ungefähr 28 Stunden nach dem Bindungsexperiment, also acht Stunden nach Reinfektion der Erythrozyten, wurde ein Ansatz zur *var*-Genanalyse sowie je eine der beiden Kontrollen geerntet. Die übrigen infizierten Erythrozyten wurden aus den Zellkulturflaschen in Petrischalen umgesetzt, um eine erneute Adhärenz der adulten Stadien an den Endothelrezeptor zu vermeiden. Nach weiteren 20 Stunden, 28 Stunden nach Reinfektion, wurde ein weiterer Ansatz sowie die beiden verbliebenen Kontrollen zur RNA-Analyse der *rifA*- und *B*-, der *stevor*- und *pfmc2tm*-Gene geerntet. Weitere vier Stunden später, also ca. 52 Stunden nach dem ersten Bindungsexperiment, wurden die Ansätze gemischt, über die MACS-Säule gegeben und das Bindungsexperiment unter den beschriebenen Bedingungen wiederholt (siehe 2.2.3.2).

### 2.2.3.4 Auszählung

Da die Anzahl der gebundenen infizierten Erythrozyten nicht nur in Relation zu den ausgezählten CHO-Zellen, sondern auf die Gesamtmenge der eingesetzten Parasiten bezogen werden sollte,

mussten sowohl die Plasmodien als auch die CHO-Zellen der Kontroll- wie der Rezeptorzelllinie im Giemsa-Ausstrich respektive in der Neubauerzählkammer exakt ausgezählt werden. So konnte aus der Gesamtzahl an CHO-Zellen die Gesamtzahl der gebundenen Parasiten bestimmt, und dieser Wert wiederum ins Verhältnis zur Anzahl der eingesetzten Parasiten gesetzt werden. Dabei war zu beachten, dass sich in einem  $\mu\text{L}$  Erythrozytensediment  $5 \times 10^6$  Zellen befinden.

## 2.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.2.4.1 RNA- Isolierung

Plasmodien-RNA wurde mit dem *TRIzol Plus Purification* Kit der Firma Invitrogen isoliert. In TRIzol ist neben Phenol Guanidiniumisothiocyanat enthalten, durch das die RNA stabilisiert wird. Die Zugabe von Chloroform bewirkt eine Phasentrennung der lysierten Zellbestandteile, wobei sich die RNA im wässrigen Überstand löst und somit von Proteinen und DNA in der Phenolphase abgetrennt werden kann. Große DNA-Fragmente verbleiben in der milchigen Interphase. Die RNA wurde mit Ethanol gefällt und über eine Säule aufgereinigt. Die Arbeitsschritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.4.2 DNA-Isolierung mit QIAmp DNA Mini Kit

Das Protokoll zur Isolierung der genomischen DNA mittels QIAmp DNA Mini Kit der Firma Qiagen ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

## 2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei der photometrischen Quantifizierung von Nukleinsäuren wird deren Absorptionsspektrum zwischen 230 nm und 280 nm gemessen, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Die Photometrie erfolgte in einer sterilen Einweg-Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Unter Berücksichtigung folgender Faktoren kann die Konzentration unterschiedlicher Nukleinsäuretypen bestimmt werden:

$$\text{Einzelsträngige RNA}_{260\text{nm}} : OD\ 1 \cong 40\ \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Doppelsträngige DNA}_{260\text{nm}} : OD\ 1 \cong 50\ \mu\text{g/mL}.$$

OD bezeichnet die Optische Dichte. Bei einer Wellenlänge von 280 nm haben Peptidbindungen ihr Absorptionsmaximum, bei 230 nm liegt das von Phenolen sowie aromatischer Verbindungen. Durch die Quotienten  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  sowie  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  kann somit der Reinheitsgrad einer Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Eine Probe gilt als rein, wenn

$$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} \geq 1,85$$

und

$$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \geq 2,0.$$

### 2.2.6 DNase Verdau

Die RNA-Lösung wurde nach ihrer Reinigung (siehe 2.2.4.1) mit Desoxyribonukleasen verdaut. Die Menge an Enzym richtete sich nach der in der Lösung enthaltenen RNA-Menge (siehe 2.2.5), wobei eine Lösung mit einem bis zu 3  $\mu\text{g}$  enthaltenden RNA-Gehalt mit 20 *Units* DNase (20  $\mu\text{L}$ ), Lösungen mit darüber liegenden Werten mit 30 *Units* DNase (30  $\mu\text{L}$ ) versetzt wurden. Die Reaktion lief in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{L}$  für 40 Minuten bei 37 °C und wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 65 °C abgebrochen.

### 2.2.7 Reverse Transkription

Die cDNA wird durch Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase erstellt. Mit Hilfe des Enzyms *SuperScript III* der Firma Invitrogen ist es laut Herstellerangaben möglich, mRNA einer Länge von 12 Kb und größer zu transkribieren. Falls möglich, wurde 1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA in der Reaktion verwendet. Anderenfalls limitierte sich die RNA-Zugabe durch das einzusetzende Maximalvolumen. Die reversen Transkriptionen für die *var*-Genanalyse und die der 2TM-Superfamilie wurden nach unterschiedlichen Protokollen durchgeführt.

#### 2.2.7.1 Reverse Transkription der *var*-mRNA

Der Reaktionsansatz für RNA zur *var*-Genanalyse inkubierte zwei Stunden bei 42 °C und lautete wie folgt:

5 x <i>First-Strand Buffer</i>	4 $\mu\text{L}$
<i>dNTPs</i> [10 mM]	2 $\mu\text{L}$
Oligonukleotide [10 mM]	2 $\mu\text{L}$
<i>RNaseOut</i> [20 U]	0,5 $\mu\text{L}$
<i>SuperScript III</i> [200 U]	0,5 $\mu\text{L}$
$\text{MgCl}_2$ [25 mM]	0,4 $\mu\text{L}$
RNA	$\times \mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	$\times \mu\text{L}$
Gesamtvolumen	20 $\mu\text{L}$ .

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Enzym durch zehnminütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert und der Reaktionsansatz auf Eis gestellt.

#### 2.2.7.2 Reverse Transkription der 2TM-Superfamilien-mRNA

Die mRNA zur Analyse der *rifA*- und B-, der *steVor*- und der *pfmc2tm*-Genexpression wurde mit *random hexamers* transkribiert. Zunächst wurden die Nukleinsäuren mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 11  $\mu\text{L}$  gebracht, zum Aufbrechen der Sekundärstrukturen für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und danach auf Eis gestellt.

RNA	1 $\mu$ g
dNTPs [10 mM]	2 $\mu$ L
random hexamers [10 mM]	2 $\mu$ L

Danach wurde der folgende cDNA-Synthese-Mix angesetzt, zugegeben, und die Reaktion lief für zwei Stunden bei 42 °C.

5 x First-Strand Buffer	4 $\mu$ L
RNaseOut [20 U]	0,5 $\mu$ L
SuperScript III [200 U]	0,5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	2 $\mu$ L
DTT [100mM]	2 $\mu$ L
Gesamtvolumen	20 $\mu$ L.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Enzym durch zehnmütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert und der Reaktionsansatz auf Eis gestellt.

## 2.2.8 Polymerasekettenreaktion

Eine PCR dient der spezifischen exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten.

### 2.2.8.1 DNA-Persistenz-Kontrollen

Zwei Kontrollen um den Verbleib von DNA in der RNA-Lösung wurden nach der Resuspension der gefällten RNA durchgeführt. Die Oligonukleotide waren jeweils komplementär zu Sequenzen der *house-keeping*-Gene der Fructose-Bisphosphat Aldolase sowie der *seryl-tRNA*-Synthetase und umspannten ein Fragment einer Größe von ca. 200 Bp.

Da nur mit DNA-freien RNA-Lösungen weitergearbeitet werden konnte, war das erwartete Ergebnis ein negatives. Der Reaktionsansatz wurde folgendem Schema gemäß pipettiert:

Template	1 $\mu$ L
dNTPs [10 mM]	2 $\mu$ L
Oligonukleotide <i>forward</i> [10 mM]	2 $\mu$ L
Oligonukleotide <i>reverse</i> [10 mM]	2 $\mu$ L
5 x Green Go Taq Flexi Buffer	4 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1,2 $\mu$ L
Go Taq DNA Polymerase [5 U/ $\mu$ l]	0,2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	7,6 $\mu$ L
Gesamtvolumen	20 $\mu$ L.

Einer 15-minütigen anfänglichen Denaturierung bei 94 °C folgte eine 40fache zyklische Wiederholung folgender Schritte:

Denaturierung: 30 Sekunden bei 94 °C  
*Annealing*: 40 Sekunden bei 54 °C  
*Elongation*: 50 Sekunden bei 68 °C.

Den Abschluss der Reaktion bildete ein 10-minütiger *Elongations*-Schritt bei wiederum 68 °C.

### 2.2.8.2 Amplifikation von cDNA

***var*-Genanalyse** Die cDNA wurde für die *var*-Genanalyse mit Hilfe dreier Oligonukleotidpaare, die jeweils spezifisch für die der Gruppen A, B und C zugehörigen Gene waren, vervielfältigt. Die erwarteten Fragmente wiesen Größen zwischen ca. 750 Bp und 1100 Bp auf. Der Reaktionsansatz wurde folgendem Schema gemäß pipettiert:

<i>Template</i>	2 µL
dNTPs [10 mM]	2 µL
Oligonukleotide_forward [10 mM]	2 µL
Oligonukleotide_reverse [10 mM]	2 µL
5 × <i>Green Go Taq Flexi Buffer</i>	4 µL
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	3 µL
<i>Go Taq DNA Polymerase</i> [5 U/µl]	0,2 µL
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	4,8 µL
Gesamtvolumen	20 µL.

Die Reaktion durchlief 40 Zyklen dieser Abfolge:

Denaturierung: 60 Sekunden bei 94 °C  
*Annealing*: 60 Sekunden bei 46 °C  
*Elongation*: 120 Sekunden bei 62 °C.

Auch hier schloss die Reaktion mit einem 10-minütigen *Elongations*-Schritt bei 68 °C ab.

**Genanalyse 2TM-Superfamilie** Für die Analyse der *rifA*- und B-, der *stevor*- und der *pfmc2tm*-Genexpression wurde die cDNA mit für die jeweilige Genfamilie spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert; dabei wurden für *rifA*- ca. 130 bp große Fragmente, für *rifB*- 180 bp, für *stevor*- ca. 700 bp und für *pfmc2tm*-Transkripte ca. 240 bp große Fragmente erwartet. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

<i>Template</i>	0,1 $\mu$ L
dNTPs [10 mM]	2 $\mu$ L
Oligonukleotide_forward [10 mM]	2 $\mu$ L
Oligonukleotide_reverse [10 mM]	2 $\mu$ L
5 $\times$ <i>Green Go Taq Flexi Buffer</i>	4 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	2 $\mu$ L
<i>Go Taq DNA Polymerase</i> [5 U/ $\mu$ l]	0,2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	7,7 $\mu$ L
Gesamtvolumen	20 $\mu$ L.

Die Reaktionen zur *rifA* und zur *stevor*-Genanalyse liefen unter den *var*-Bedingungen (s.o.), die *cDNA* zur Analyse der anderen Genfamilien wurde in 35 Zyklen mit folgenden Parametern amplifiziert:

Denaturierung: 60 Sekunden bei 94 °C

*Annealing*: 30 Sekunden bei 47 °C

*Elongation*: 40 Sekunden bei 62 °C.

Auch hier schloss die Reaktion mit einem 10-minütigen *Elongations*-Schritt bei 68 °C ab.

### 2.2.8.3 Amplifikation von PfEMP1-Dömanen aus genomischer 3D7-DNA

Für die rekombinante Expression wurden 24 verschiedenen PfEMP-Dömanen aus dem Genom von 3D7 amplifiziert und in einen Expressionsvektor subkloniert (siehe 2.2.11).

Der Reaktionsansatz wurde folgendem Schema gemäß pipettiert:

3D7 <i>gDNA</i>	1 $\mu$ L
dNTPs [10 mM]	2 $\mu$ L
Oligonukleotide_forward [10 mM]	2 $\mu$ L
Oligonukleotide_reverse [10 mM]	2 $\mu$ L
5 $\times$ <i>Green Go Taq Flexi Buffer</i>	4 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	2 $\mu$ L
<i>Go Taq DNA Polymerase</i> [5 U/ $\mu$ l]	0,2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	6,8 $\mu$ L
Gesamtvolumen	20 $\mu$ L.

Es wurden verschiedene *Touch-Down*-PCRs durchgeführt, in denen die *Annealing*temperatur für acht Zyklen sukzessiv auf zwischen 51 °C und 48 °C gesenkt wurde. Im Anschluss liefen 35 Zyklen mit der gewünschten *Annealing*temperatur:

Denaturierung: 30 Sekunden bei 94 °C

*Annealing*: 60 Sekunden bei 51 bis 48 °C

*Elongation*: 60 Sekunden bei 62 °C.

Auch hier schloss die Reaktion mit einem 10-minütigen *Elongations*-Schritt bei 68 °C ab.

#### 2.2.8.4 Long Range PCR

Die *var*-Gene aus Patientenisolaten wurden mit dem *Long Range PCR*-Kit der Firma Roche amplifiziert. Für Puffer 1 wurde der folgende Ansatz pipettiert:

3D7 <i>gDNA</i>	1 µL
dATPs [2,5 mM]	2,6 µL
dTTPs [2,5 mM]	2,6 µL
dCTPs [2,5 mM]	0,9 µL
dGTPs [2,5 mM]	0,9 µL
Oligonukleotide_forward [10 mM]	5 µL
var4_reverse [10 mM]	5 µL
Puffer 1	5 µL
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	2 µL
<i>Expand Long DNA Polymerase</i> [5 U/µL]	1 µL
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	23 µL
Gesamtvolumen	50 µL.

Für die Puffer 2 und 3 wurden folgende Reaktionsansätze pipettiert:

3D7 <i>gDNA</i>	1 µL
dATPs [2,5 mM]	3,7 µL
dTTPs [2,5 mM]	3,7 µL
dCTPs [2,5 mM]	1,3 µL
dGTPs [2,5 mM]	1,3 µL
Oligonukleotide_forward [10 mM]	5 µL
var4_reverse [10 mM]	5 µL
Puffer 1	5 µL
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	2 µL
<i>Expand Long DNA Polymerase</i> [5 U/µl]	1 µL
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	26 µL
Gesamtvolumen	50 µL.

In einer *Touch-Down*-PCR wurde die *Annealing*temperatur für acht Zyklen sukzessiv von 53 °C auf 49 °C gesenkt. Im Anschluss liefen 35 Zyklen:

Denaturierung: 30 Sekunden bei 95 °C

*Annealing*: 30 Sekunden bei 49 °C

*Elongation*: 180 Sekunden bei 68 °C.

Die *Elongations*zeit wurde in jedem Zyklus um 0,5 Sekunden verlängert. Auch hier schloss die

Reaktion mit einem 10-minütigen *Elongations*-Schritt bei 68 °C ab.

### 2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid konnten unterschiedliche Fragmentgrößen einer DNA-Lösung unter kurzzeitigem UV-Licht von 254 nm sichtbar gemacht sowie deren Menge abgeschätzt werden. Der Mengen- und Größenabschätzung diente ein DNA-Standard (siehe 2.1.6). Agarosegele wurden je nach erwarteter Fragmentgröße in Konzentrationen von 1 % bis 2 % mit TBE-Puffer angesetzt; jener diente auch als Puffer für den Gellauf.

### 2.2.10 DNA-Präparation aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente für weitere Versuche verwenden zu können, wurden sie mit einem sterilen Skalpell bei Betrachtung unter langwelligem UV-Licht von 366 nm aus dem Gel ausgeschnitten. Das Auflösen der Gelstruktur durch Pufferzugabe und Temperaturerhöhung sowie die Reinigung der DNA über eine Silikatsäule richteten sich nach den Herstellerangaben des *Nucleo Spin II Kits* der Firma Macherey-Nagel.

### 2.2.11 Standardklonierungen

Mit Hilfe von Klonierungstechniken können Fragmente aus einem DNA-Gemisch voneinander separiert und vervielfältigt werden.

#### 2.2.11.1 *TOPO TA Cloning*

Einzelne DNA-Sequenzen wurden in einen Plasmidvektor kloniert, der durch Transformation in eine Bakterienzelle aufgenommen und mit ihr vermehrt werden konnte. Alle benötigten Komponenten stammten aus dem *TOPO TA Cloning Kit* der Firma Invitrogen. Die Arbeitsschritte entsprachen den Herstellerangaben, bis auf dass sich die Hälfte der zu verwendenden *TOP-10*-Bakterienzellen als ausreichend erwies. Transformierte Bakterienzellen wuchsen über Nacht im Brutschrank bei 37 °C auf LB-Agar-Platten mit dem Selektionsmarker Ampicillin. Weiße Kolonien wurden mit Hilfe eines Zahnstochers von der Platte in LB-Selektionsmedium, wiederum mit Ampicillinzugabe, übertragen und wuchsen ca. 16 Stunden lang bei 37 °C.

#### 2.2.11.2 Klonierung in das Expressionsplasmid pJC45

Für die rekombinante Expression wurden die DNA-Fragmente in den Expressionsvektor pJC45, der einen N-terminalen His-Tag trägt, über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *EcoRI* subkloniert (siehe 2.2.11.4). Die Transformation in kompetente pApLac-Zellen (siehe 2.2.14) erforderte einen 90-sekündigen Hitzeschock. Da das pJC45 Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen trägt, die pApLac-Zellen ein Kanamycin-Resistenzgen, konnte mit beiden Antibiotika auf transformierte Bakterienzellen selektioniert werden.

### 2.2.11.3 Plasmid-Präparation

Plasmid-DNA konnte gezielt unter Verwendung des *Fast Plasmid Mini Kits* der Firma Eppendorf aus den Bakterienzellen isoliert werden. In allen Arbeitsschritten wurde dem Herstellerprotokoll gefolgt.

### 2.2.11.4 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wird zu analytischen oder präparativen Zwecken durchgeführt.

**Analytischer Verdau** Durch einen analytischen Restriktionsverdau kann die Größe eines integrierten DNA-Fragments überprüft werden.

Der Ansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Plasmid-DNA	3 $\mu\text{L}$
Enzym	0,5 $\mu\text{L}$
10× <i>fast digest buffer</i>	2 $\mu\text{L}$
HPLC-H <sub>2</sub> O	14,5 $\mu\text{L}$
Gesamtvolumen	20 $\mu\text{L}$ .

Der Ansatz inkubierte 10 Minuten bei 37 °C und wurde durch Zugabe von 4  $\mu\text{L}$  6 ×-DNA-Ladepuffer abgebrochen.

**Präparativer Verdau** Der präparative Verdau wurde mit 2  $\mu\text{L}$  Restriktionsenzym in einem Volumen von 50  $\mu\text{L}$  angesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.11.5 Ligation

Bei einer Ligation sollten das zu integrierende DNA-Fragment und der Vektor, die beide zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut wurden, in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt werden. Die Ligation wurde nach folgendem Ansatz pipettiert und lief über Nacht bei 14 °C:

Vektor	$x \mu\text{L}$
DNA-Fragment	$x \mu\text{L}$
<i>T4-Ligase</i>	1 $\mu\text{L}$
10× <i>ligase buffer</i>	1,5 $\mu\text{L}$
ATP [10mM]	1,5 $\mu\text{l}$
HPLC-H <sub>2</sub> O	$x \mu\text{L}$
Gesamtvolumen	15 $\mu\text{L}$ .

Am nächsten Tag wurden 3  $\mu\text{L}$  des Ligationsansatzes in kompetente Bakterienzellen transformiert.

### 2.2.12 Klonierung zweier Gene des Patientenisolates 19

Für das Patientenisolat 19 sollten spezifische Peptidantikörper gegen zwei PfEMP1-Varianten synthetisiert werden; hierzu wurden die entsprechenden Gene kloniert und sequenziert, da über die Nukleotidsequenzen keine Informationen vorlagen. Die *var*-gruppenspezifischen Amplifikate umspannten ein Fragment der 5' untranslatierten Region bis zur ersten DBL-Domäne (vgl. 1.6.1.2), und somit war nach Sequenzierung der PCR-Produkte der Genanfang bekannt. Für die dominierend exprimierten Transkripte der *ex vivo*- und der ersten *in vitro*-Generation des Patientenisolates 19 wurden spezifische Oligonukleotide komplementär zum Beginn des jeweiligen Gens erstellt. Mit diesen Oligonukleotiden und solchen komplementär zur hoch konservierten ATS-Domäne am 3' Ende des Gens gelang es, die entsprechenden Gene aus genomischer DNA des Patientenisolates zu amplifizieren (siehe 2.2.8.4). Das Gen abgeleitet vom Haupttranskript der *ex vivo*-Generation war mit 5,5 kb klein genug, um es im Ganzen in den TOPO TA Vektor klonieren zu können (siehe 2.2.11.1). Hier konnte durch sukzessives Sequenzieren mit Oligonukleotiden komplementär zum 3' Ende der erhaltenen Sequenz, dem sogenannten *primer walking*, die Nukleotidsequenz des Gens herausgearbeitet werden. Das amplifizierte Gen, das vom Haupttranskript der ersten *in vitro*-Generation abgeleitet war, wies eine Größe von 12 kb auf. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *EcoRV*, *KpnI*, *HindIII* und *SpeI* in überlappende Fragmente mit Größen zwischen 500 bp und 1000 bp zerlegt (siehe 2.2.11.4), und diese in den TOPO TA-Vektor kloniert. Die Fragmente wurde sequenziert und an ihren überlappenden Sequenzen zusammengefügt (siehe 2.2.13).

Anhand der Nukleotidsequenzen beider Gene wurde die Synthese zweier spezifischer Peptide sowie die Antikörpergenerierung in Kaninchen in Auftrag gegeben. Abbildung 2.2 zeigt den Versuchsablauf im Schema.

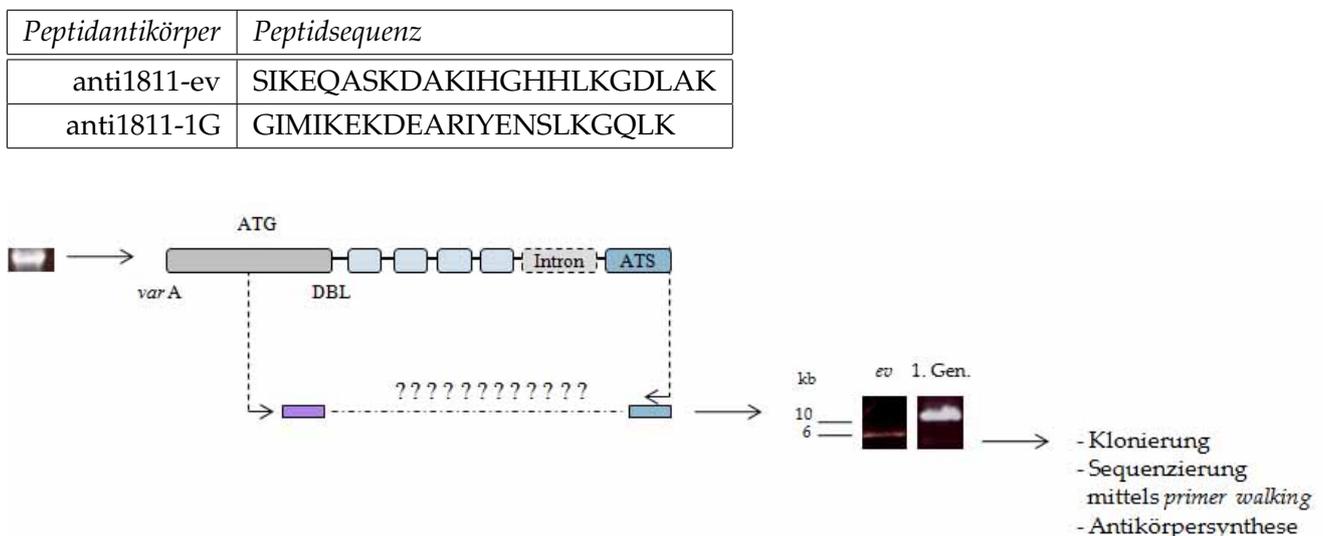


Abbildung 2.2: Klonierungsschema zweier *var*-Gene des Patientenisolates 19. Erläuterungen stehen im Text.

### 2.2.13 Sequenzauswertung

Jede DNA-Sequenz wurde je nach Länge von einer oder von beiden Seiten her abgelesen. Die Überlagerung zu einer Gesamtsequenz sowie der Vergleich der Sequenzen untereinander wurden mit dem Programm *MacVektor 10.0* durchgeführt. Sequenzübereinstimmungen wurden über den Algorithmus *ClustalW Alignment* berechnet. Die Parameter lauteten: Open Gap Penalty: 10.0; Extend Gap Penalty: 5.0. Sequenzen, die untereinander zu mindestens 98 % übereinstimmten, wurden als gleich gewertet.

### 2.2.14 Herstellung kompetenter Zellen

400  $\mu\text{L}$  einer pApLac-Übernachtskultur wurden für 90 Minuten in 40 mL LB-Medium unter Zugabe von jeweils 40  $\mu\text{L}$  Ampicillin 100 sowie Kanamycin 50 bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden hierauf auf Eis gekühlt, bei 3000 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, und das Sediment in 10 mL eiskaltem 80 mM  $\text{CaCl}_2$  gelöst. Nach 40-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Sediment wiederum für 5 Minuten bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert und danach in 5 mL 80 mM  $\text{CaCl}_2$  gelöst. Die kompetenten Zellen konnten bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden.

### 2.2.15 Rekombinante Expression

Von den in pApLac-Zellen transformierten *multicopy* pJC45 Plasmiden (siehe 2.2.11) wurden fünf mal 30 mL Übernachtskulturen in LB Medium mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin angesetzt. Mit diesen wurden insgesamt 5 Liter LB Medium mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin sowie 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin, aufgeteilt auf je 500 mL Medium pro 2 Liter Weithalslerlenmeyerkolben, angeimpft und bis zu einer OD von 0,6 für ca. 1,5 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Die Expression wurde mit 1 mM Endkonzentration IPTG induziert und die Kulturen für weitere vier bis fünf Stunden inkubiert. Danach wurden die Bakteriensedimente bei 4 °C und 5000 g für 20 Minuten zentrifugiert und bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert. Pro exprimierter Proteindomäne wurde an drei Versuchstagen so verfahren, bei Bedarf auch länger.

### 2.2.16 Proteinreinigung

Die Bakteriensedimente wurden in Puffer A aufgenommen, für 15 Minuten im Ultraschallbad beschallt, für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und hierauf für 30 Minuten bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit mit Puffer A äquilibrierter Ni-Agarose vermengt und 30 Minuten auf dem Rollschüttler bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Gemisch auf die Säule aufgetragen, der Durchfluss aufbewahrt und mit 50 mL Puffer A gewaschen wurde. Rekombinantes Protein band über die basischen Histidinreste an Nickel-Ionen an der Säule, übriges Protein konnte herausgewaschen werden.

### 2.2.17 Renaturierung

Da die Proteindomänen für die Bindungsexperimente in ihrer natürlichen Konformation vorliegen mussten, wurden sie auf der Säule renaturiert. Hierzu lief ein 500 mL Puffergradient, an den eine Schlauchpumpe angeschlossen war, 20 Stunden lang über die Säule, in dem das Guanidiniumhydrochlorid sukzessive austitriert wurde. Am nächsten Tag wurde mit 100 mL Puffer B und mit Puffer B nach Zugabe von 50 mM Imidazol gewaschen und mit den Puffern C mit 200 mM und 500 mM Imidazol eluiert. Alle Elutionsfraktionen wurden für eine Stunde bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert, um eventuelle Mikroaggregate zu sedimentieren.

### 2.2.18 Konzentration

Mit Amicon-Ultrazentrifugationsfiltern konnten die Proteinlösungen eingeeengt und durch schrittweise Verdünnung mit Puffer D das Imidazol aus der Lösung entfernt werden. Die Zentrifugationsbedingungen sind den Herstellerangaben zu entnehmen. Im Anschluss wurden die Proben für zwei Stunden bei 55000 g und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

### 2.2.19 Konzentrationsbestimmung

Ist eine Proteinlösung rein, kann ihre Konzentration über die Extinktion bei 280 nm photometrisch bestimmt werden, sofern der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  und das Molekulargewicht des Proteins bekannt sind. Es gilt:

$$C = \frac{E_{280nm} \times M}{\epsilon} \quad (2.1)$$

C ist die Proteinkonzentration in mg/mL, E die Extinktion, M das Molekulargewicht und  $\epsilon$  der Extinktionskoeffizient. Dieser kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\epsilon(M^{-1}cm^{-1}) = (\#Trp) \times 5500 + (\#Tyr) \times 1490 + (\#Cys) \times 125 \quad (2.2)$$

[70].

### 2.2.20 Trizingele

In Trizingelen wurde das Sammelgel unmittelbar über das Trenngel geschichtet; die vollständige Polymerisation dauerte ungefähr zwei Stunden. Trenn- und Sammelgel setzten sich wie folgt zusammen:

*Trenngel:*

Glycerin (87 %)	3 mL
Acrylamid/Bisacrylamid (30:2)	6,5 mL
3 × Gelpuffer	4,5 mL
H <sub>2</sub> O	1 mL
TEMED (100 %)	7,5 µL
APS (25 %)	25,6 µL

*Sammelgel:*

Glycerin (87 %)	3 mL
Acrylamid/Bisacrylamid (30:3)	1,3 mL
3 × Gelpuffer	2,25 mL
H <sub>2</sub> O	6,45 mL
TEMED (100 %)	7,5 µL
APS (25 %)	24,0 µL

Das Gel lief in Anoden- und Kathodenpuffer bei 35 mA für das Sammelgel, bei 50 mA für das Trenngel. Im Anschluss wurde es nach Bedarf in Coomassie-Lösung gefärbt oder auf eine Membran transferiert.

### 2.2.21 Bindungsexperimente mittels Schwingquarzsensoren

Gemäß dem piezoelektrischen Effekt reagiert kristallines  $SiO_2$  auf eine angelegte Wechselspannung mit einer Resonanzfrequenz, die bei den in dieser Arbeit verwendeten Quarzen ca. 10 MHz betrug. Der Interaktionsnachweis zweier Bindungspartner in der Schwingquarzsensoren beruht darauf, dass eine Massen- oder Viskositätsänderung zu einer Änderung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes führt, die mit einer Messelektronik aufgezeichnet werden kann. Einer der Bindungspartner, hier ein Endothelrezeptor auf CHO-Zellmembranen, wurde an den Quarz gekoppelt, der Analyt, hier rekombinante PfEMP1-Domänen, über den Quarz geleitet. Die Messungen wurden mit der Analyseplattform *FidgeType FgT1* durchgeführt, die aus einer thermoregulierbaren Sensoreinheit mit zwei integrierten Messkammern für den Schwingquarzsensoren und einer elektronischen Steuereinheit bestand. Die Analyseplattform war mit einer Oszillatorschaltung verbunden, die Software *QCM-soft* regulierte Temperatur-, Resonanzfrequenz- und Pumpendaten und zeichnete die Messdaten auf; der Aufbau der Analyseplattform ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

#### 2.2.21.1 Quarzpräparation

Die Quarze wurden vor jeder Messung neu präpariert und beschichtet. Hierfür wurden die Quarze für 5 Minuten in Aceton entfettet, für 2 Minuten in frisch angesetzter Peroxomonoschwefelsäure (Piranha-Lösung) inkubiert, danach mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen, unter einem N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und die Quarze zentriert in die Haltevorrichtung geklebt. Im Anschluss wurden 20 µL Poly-L-Lysin (0,5 mg/mL) mit N<sub>2</sub> kreisförmig eingetrocknet und die Quarze für 15 Minuten bei 37 °C

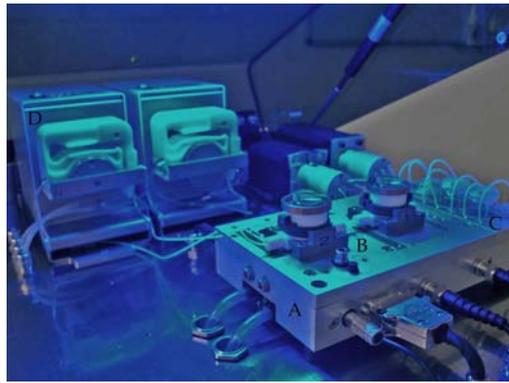


Abbildung 2.3: Schwingquarz-Analyseplattform *FidgeType FgT1*.

A: thermoregulierbarer Sensorblock; B: Messkammer für Schwingquarzsensoren; C: Probengefäße; D: Pumpen.



Abbildung 2.4: Schwingquarzsensoren im Größenvergleich zu einem 1-Centstück.

gelagert. Es folgten ein Wasch- und Trockenschritt, bevor 80  $\mu\text{L}$  der CHO-Membranensuspension (2.2.21.2), die im Verhältnis 1:1 mit PBS-Tween gemischt wurden, auf den Quarz aufgebracht wurden und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die überschüssigen Membranen wurden gründlich mit PBS abgespült, die Membranen auf dem Quarz mit 4 % Polyformaldehyd (PFA) für 7 Minuten auf Eis fixiert und nochmals mit PBS gewaschen.

#### 2.2.21.2 Membranpräparation

Die CHO-Zellmembranen wurden durch fraktionelle Zentrifugation gereinigt. Hierzu wurden CHO-Zellen aus vier 75  $\text{cm}^2$  großen Kulturflaschen mit Accutase abgelöst (siehe 2.2.2), in Fraktionierungspuffer aufgenommen und im Zellhomogenisator durch Pottern auf Eis aufgeschlossen. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde mikroskopisch kontrolliert. Eine Zentrifugation bei 540 g und 4 °C für 10 Minuten sedimentierte ganze Zellen und Zellkerne. Der Überstand wurde zur Abtrennung von Zellorganellen wie Mitochondrien und ER bei 2500 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Die Membranen wurden in einem Ultrazentrifugationsschritt von 55000 g und 4 °C für 90 Minuten sedimentiert und in 500  $\mu\text{L}$  Fraktionierungspuffer aufgenommen, Proteaseinhibitor zugegeben und bei -20 °C für maximal eine Woche gelagert.

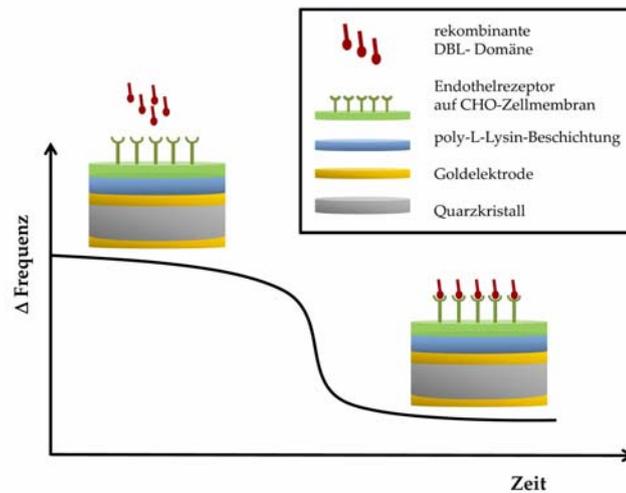


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Schwingquarzsensoren.

### 2.2.21.3 Messung

Über den Quarz mit einer stabilen Resonanzfrequenz wurden so oft jeweils  $30 \mu\text{L}$  BSA ( $1 \text{ mg/mL}$ ) zur Präabsorption der Membran geleitet, bis alle Bindungen abgesättigt waren. Die Bindung der rekombinanten PfEMP1-Domänen wurde in Konzentrationen zwischen  $25 \mu\text{g/mL}$  und  $1000 \mu\text{g/mL}$  getestet. Wenn nicht gesondert angegeben, wurde für jede Messung ein neuer Quarz verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug  $25 \mu\text{L/min}$ , nach jeder Probenzugabe folgte ein Spülschritt mit einer Fließgeschwindigkeit von  $100 \mu\text{L/min}$ . Die Bindung von rekombinatem Protein an den Endothelrezeptor auf der CHO-Zellmembran führt zu einer Massenlagerung an den Schwingquarzsensoren, die über einen Abfall der Resonanzfrequenz detektiert werden kann (siehe Abbildung 2.5).

### 2.2.22 Westernblot

Die Proteine wurden aus dem Gel (siehe 2.2.20) nach Herstellerangaben im Nassblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Anschluss mit einer TBS-Lösung mit 5 % Milchpulver für 30 Minuten auf dem Rollschüttler blockiert. Der primäre Antikörper, in der Regel in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt, inkubierte über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$ , der sekundäre Antikörper, der 1:5000 eingesetzt wurde, für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Ungebundene Antikörper wurden nach beiden Schritten durch mehrmaliges waschen mit TBS+Tween entfernt. Die Proteine wurden mit dem ECL-System detektiert. Hierfür wurde die Entwicklerlösung aus 5 mL Lösung A,  $500 \mu\text{L}$  Lösung B und  $1,5 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  erstellt und die Membran für zwei Minuten darin inkubiert. Ein Film wurde je nach Signalstärke zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten aufgelegt und entwickelt.

### 2.2.23 Immunfluoreszenzanalysen

Für Immunfluoreszenzanalysen wurden auf den fixierten Blutaussstrichen (siehe 2.2.1.5) nach Bedarf mit einem Silikonstift sechs bis acht Felder abgegrenzt. Der Objektträger wurde für 5 Minuten in PBS inkubiert, und hierauf 60  $\mu\text{L}$  des ersten Antikörpers, in PBS mit 1 % BSA in gewünschter Verdünnung gelöst, aufgetragen. Dieser inkubierte zwei Stunden bei Raumtemperatur, wurde mit einer Pipette abgenommen, und der Objektträger dreimal in PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit 1 % BSA gelöst und der Kernfluoreszenzfarbstoff DAPI in einer Verdünnung von 1:400 zugegeben. Von dieser Lösung wurden wiederum 60  $\mu\text{L}$  auf die Felder des Objektträgers aufgetragen und dieser zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde dreimal mit PBS gewaschen, pro Feld ein Tropfen Mowiol aufgetragen und ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Nach einer Trocknungszeit von mindestens einer Stunde konnten die Fluoreszenzanalysen durchgeführt werden. Hierzu wurden die Blutaussstriche in einer 100fachen Vergrößerung eines Ölimmersionsobjektives am Leica Fluoreszenzmikroskop oder am konfokalen Mikroskop Olympus IX 81 betrachtet und die *deconvolution* mit der Software Openlab 4.0.2 berechnet. Schnittbilder durch die Zelle wurden in Abständen von 0,1  $\mu\text{m}$  aufgezeichnet.

### 2.2.24 Immunisierung von Mäusen

Zur Gewinnung von Antiseren wurden BALB/c Mäuse mit rekombinantem Protein immunisiert. 50  $\mu\text{g}$  des Proteins wurden 1:1 mit Freundschem Adjuvant vermischt und die Emulsion subcutan injiziert. Die Injektion wurde zweimalig im Zweiwochentakt wiederholt, bevor der Maus maximal 2 mL Blut entnommen wurden. Dieses agglutinierte für 20 Minuten auf Eis, wurde bei 1200 rpm zentrifugiert und das überstehende Serum abgenommen.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

Das *Plasmodium falciparum* Oberflächenprotein PfEMP1 erfüllt elementare Funktionen bei der Etablierung der Infektion und der Überdauerung im Wirt und gilt daher als entscheidender Pathogenitätsfaktor. Zwei wichtige Funktionen von PfEMP1 wurden in dieser Arbeit untersucht: die Antigenvariation und die Zytoadhärenz an Endothelrezeptoren.

### 3.1 Untersuchungen zur Antigenen Variation

#### 3.1.1 *var*-Genexpressionsanalysen

Durch das sukzessive An- und Abschalten der *var*-Gene werden die auf der Erythrozytenoberfläche präsentierten PfEMP1-Proteine regelmäßig verändert, und der Parasit entgeht so der Immunantwort des Wirtes. Der Turnus dieses *switchings* ist ein wichtiger Parameter in der Pathogenität von *P. falciparum*. Untersuchungen zum *switching* der *var*-Gene wurden bisher nur an kulturadaptierten Isolaten durchgeführt oder solchen, die aus chronisch infizierten Patienten isoliert wurden, und deren Immunstatus einen starken Einfluss auf das *switching*-Verhalten der Plasmodien zu haben scheint. Im Folgenden sind die Ergebnisse einer Studie dargestellt, in der das *var*-Gen*switching* von 20 aus Patienten mit Erstinfektion klinischer *falciparum*-Malaria isolierten Parasitenpopulationen in den jungen Ringstadien der *ex vivo*- und den ersten *in vitro*-Generationen analysiert wurde. Es wurden Isolate mit maximal zwei genetischen MSP1-Varianten untersucht [71]. In dieser Studie sollte aufgezeigt werden, wieviele *var*-Gene ein Isolat aus seinem mehr als 60 Gene umfassenden Repertoire exprimiert, und wie sich die Expression im Laufe der Kultivierung ändert. Die Arbeiten wurden gemeinsam mit Anna Bachmann durchgeführt.

##### 3.1.1.1 Validierung der Oligonukleotide zur Analyse der *var*-Genexpression unterschiedlicher Patientenisolat

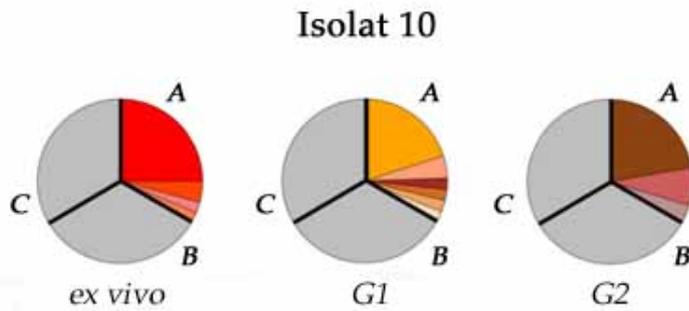
Die *var*-Transkriptionsprofile unterschiedlicher Patientenisolat wurden mit einer für die Gengruppen A, B und C spezifischen RT-PCR analysiert. Die verwendeten Oligonukleotide wurden auf ihre Spezifität und Effizienz getestet, indem genomische DNA der Kulturisolate 3D7 und FCR3 sowie

zweier Patientenisolat amplifiziert und zwischen 13 und 24 Klone jedes PCR-Produkts sequenziert wurden. In 3D7 wurden acht von zehn Genen der Gruppe A, 16 von 35 der Gruppe B und acht von 13 Genen der Gruppe C amplifiziert. Im Isolat FCR3 konnten vier, 16 respektive sechs Gene der Gruppen A, B und C identifiziert werden (siehe Tabelle 3.1). Im Patientenisolat 1 wurden fünf Gene der Gruppe A, elf der Gruppe B und acht der Gruppe C amplifiziert, in Patientenisolat 10 zehn, 19 und fünf Gene der jeweiligen Gruppen A, B und C. Die Oligonukleotidpaare erlauben somit eine gute Abdeckung der *var*-Multigenfamilie.

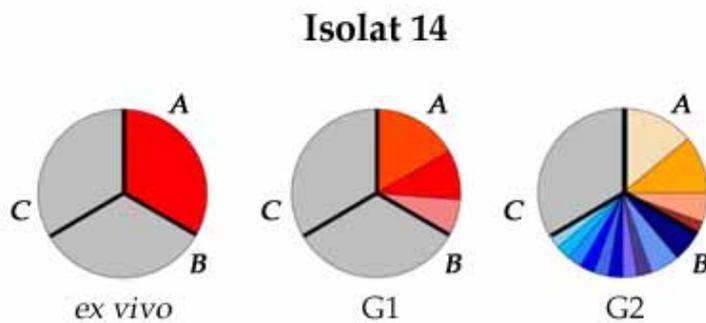
### 3.1.1.2 Expressionsprofil der Kulturoisolate 3D7 und FCR3

In streng synchronisierten Ringstadien der Kulturoisolate 3D7 und FCR3 wurden jeweils Transkripte aller drei *var*-Gengruppen identifiziert. 3D7 exprimiert je ein dominierendes und mehrere weitere Transkripte jeder Gengruppe, wobei dieses Profil über die untersuchten Generation hinweg weitgehend stabil blieb (siehe Tabelle 3.1). Auch im Isolat FCR3 änderte sich die Expression der *var*-Gene innerhalb von drei Generationen kaum; ein dominierendes Transkript war innerhalb der Gruppe A und insbesondere innerhalb der Gruppe C zu finden.



Abbildung 3.1: *var*-Genexpressionsprofil des Patientenisolates 10

*A*, *B* und *C* bezeichnen die *var*-Gengruppen; gleiche Farben stehen für gleiche Sequenzen; grau sind Bereiche einer Gengruppe, innerhalb derer kein Transkript zu detektieren war; G1: erste *in vitro*-Generation; G2: zweite *in vitro*-Generation.

Abbildung 3.2: *var*-Genexpressionsprofil des Patientenisolates 14

*A*, *B* und *C* bezeichnen die *var*-Gengruppen; gleiche Farben stehen für gleiche Sequenzen; grau sind Bereiche einer Gengruppe, innerhalb derer kein Transkript zu detektieren war; G1: erste *in vitro*-Generation; G2: zweite *in vitro*-Generation.

### 3.1.1.3 Expressionsprofil der Patientenisolat

Aus Patientenblut isolierte Parasitenpopulationen exprimierten in erster Linie Gene der Gruppe *A*, Transkripte der beiden anderen Gengruppen konnten nicht in allen Fällen gefunden werden (siehe Tabelle 3.2 und 3.3). Gemäß der Veränderlichkeit oder Konstanz ihres Expressionsprofils der Gene der Gruppe *A* können die Patientenisolat in zwei Klassen eingeteilt werden, die der schnell, und die der langsam *switchenden* Isolate.

**Schnelle Switcher besitzen Wechselraten von annähernd 100 %** In zehn von 20 untersuchten Isolaten änderte sich das dominierende *A*-Transkript mit jeder Generation der jungen Ringstadien, wobei das Transkript jeweils zwischen 30 % und 100 % der Gesamtsequenzen ausmachte (siehe Abbildung 3.1 und 3.2).

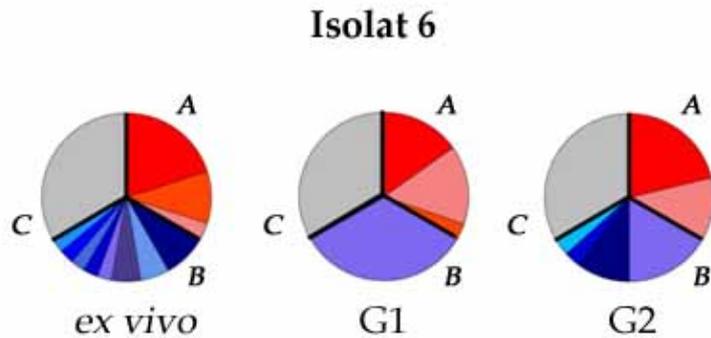


Abbildung 3.3: *var*-Genexpressionsprofil des Patientenisolates 6

*A*, *B* und *C* bezeichnen die *var*-Gengruppen; gleiche Farben stehen für gleiche Sequenzen; grau sind Bereiche einer Gengruppe, innerhalb derer kein Transkript zu detektieren war; G1: erste *in vitro*-Generation; G2: zweite *in vitro*-Generation.

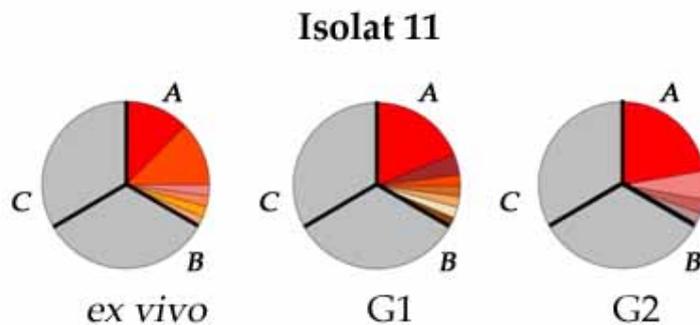


Abbildung 3.4: *var*-Genexpressionsprofil des Patientenisolates 11

*A*, *B* und *C* bezeichnen die *var*-Gengruppen; gleiche Farben stehen für gleiche Sequenzen; grau sind Bereiche einer Gengruppe, innerhalb derer kein Transkript zu detektieren war; G1: erste *in vitro*-Generation; G2: zweite *in vitro*-Generation.

Die Switchingrate liegt somit innerhalb dieser Klasse bei annähernd 100 %. In der Hälfte dieser Isolate wurden ausschließlich Transkripte der Gruppe *A* gefunden, detektierte Sequenzen der Gruppen *B* und *C* blieben über die untersuchten Generationen weitgehend konstant.

**Langsame Switcher haben niedrige und unregelmäßige Wechselraten** Die zweite Klasse der Isolate zeichnete sich durch eine niedrige *Switchingrate* aus, die Transkriptionsprofile waren vergleichsweise stabil und oftmals waren Gene aller drei Gruppen exprimiert (siehe Tabelle 3.3). Veränderungen der dominierenden Transkripte traten unregelmäßig auf und waren nicht auf Gruppe *A* beschränkt. So wechselte beispielsweise das dominierende *B*-Transkript aus Isolat 6 von der *ex vivo*- zur ersten *in vitro*-Generation, das aber wiederum stabil über die weiter untersuchten Generationen exprimiert wurde, in Isolat 7 konnte ein Expressionswechsel innerhalb der Gruppe *C* von der zweiten zur dritten *in vitro*-Generation beobachtet werden. In den Abbildungen 3.3 und 3.4 sind beispielhaft die Expressionsprofile zweier langsam *switchender* Isolate gezeigt.

3.1. UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIGENEN VARIATION

Patientennummer	Parasitämie	Generation	var-Sequenzen														
			Gruppe A			Gruppe B			Gruppe C								
			Anzahl (n)	Nummer	Verteilung	Anzahl (n)	Nummer	Verteilung	Anzahl (n)	Nummer	Verteilung						
1	1%	DNA	18	12	38.9	13	8	23.1	22	1	31.8						
				13	33.3							1. 3. 4. 9-15	2. 3	18.2*			
		Ex vivo	11	3	16.7	x	x	x	x	4. 5	9.1*						
				14. 15	5.6*							6-8	4.6*				
G1	10	5	30	12	1	33.3	x	x	x	x							
		6	20								2. 3	16.7*					
5	0.25%	Ex vivo	18	7-11	10*	x	x	x	x	x	x						
				1	50							2	22.2				
		G1	18	2	11.1*	x	x	x	x	x	x	x					
				3	16.7								4	22.2			
8	1%	Ex vivo	20	4. 5	5.6*	x	x	x	x	x	x						
				7	44.4							5	22.1				
		G1	9	5	11.1*	x	x	x	x	x	x	x					
				3. 4. 8	11.1*								3. 4. 8	11.1*			
9	1%	Ex vivo	9	1	44.4	9	1	33.3	9	1	22.2						
				2-6	11.1*							2-7	11.1*	2-8	11.1*		
		G1	10	7	40	9	1	33.3	9	2	22.2	11.1*					
				2	20								8	22.2			
10	8%	DNA	23	3-6	10*	24	1-5	8.3*	16	1	43.8						
				14	17.4							6-19	4.2*	2. 3	18.8*		
		Ex vivo	16	11. 15	13*	x	x	x	x	x	x	x					
				16. 17	8.7*								18-21	4.4*	4	12.5	
G1	15	1	4.4*	x	x	x	x	x	x	x							
		2	12.5								5	60					
		3. 4	6.3*								6	13.3					
		5	60								7-10	6.7*					
G2	9	11	66.2	x	x	x	x	x	x	x							
		12	22.2								11	66.2					
		13	11.1								12	22.2					
		13	11.1								13	11.1					
12	1%	Ex vivo	15	1	80	x	x	x	x	x	x						
				2	20							2	20				
		G1	14	3	64.3	x	x	x	x	x	x	x					
				4-8	7.1*								3	64.3			
		G2	10	9	50	x	x	x	x	x	x	x					
				3	20								10	20			
				10	20								2	10			
				2	10								3	33.3			
		LZ1	12	11-13	16.7*	12	8	33.3	12	1	50	x	x				
				6. 14	8.3*									9	33.3		
				1	16.7									10. 11	8.3*	2-7	8.3*
				15-18	8.3*									1	16.7		
LZ2	12	4	50	12	8	33.3	11	5	27.3	x	x						
		3	16.7									1	16.7				
		1	16.7									12-17	8.3*	2-4. 6-8	9.1*		
		15-18	8.3*									12-17	8.3*	2-4. 6-8	9.1*		
13	<1%	Ex vivo	12	1	91.7	13	1, 2	23.1*	13	1	69.2						
				2	8.3							3-10	7.7*	2	15.4		
		G3	13	2	61.5	x	x	x	x	x	x	x					
				3	30.8								3. 4	7.7	5	16.7	
14	5%	Ex vivo	17	1	100	x	x	x	x	x	x						
				2	50							1	28.6				
		G1	14	3	21.4	x	x	x	x	x	x	x	x				
				4	41.7									1	28.6		
				5	33.3									3	21.4		
				6	16.7									4	41.7		
		G2	12	7	8.3	12	1, 2	16.7*	12	x	x	x	x				
				8	8.3									3-10	8.3*		
				5	33.3									3	33.3		
				6	16.7									1. 4	25*		
		G3	12	7	91.7	12	3	33.3	12	x	x	x	x				
				8	8.3									5	16.7		

\*:Verteilung gilt für alle entsprechend gelisteten var Transkripte; X: kein Amplifikat

Patientennummer	Parasitämie	Generation	var-Sequenzen									
			Gruppe A			Gruppe B			Gruppe C			
			Anzahl (n)	Nummer	Verteilung	Anzahl (n)	Nummer	Verteilung	Anzahl (n)	Nummer	Verteilung	
19	8%	Ex vivo	22	1	81.8		x			x		
				3-6	4.6*							
			G1	24	1	4.2		x			x	
					2	91.7						
					7	4.2						
			G2	18	8	55		x			x	
					9	11.1						
					10-15*	5.5						
			G4	21	16	47.6		x			x	
					8	14.3						
					17	9.5						
					18-26*	4.8						
G6	12	16	41.7		x			x				
		8, 17, 19-23, 27*	8.3									
G8	12	8	33.3	12	1	58.3			x			
		16	33.3									
		2, 7, 10, 11*	8.3									
G12	12	2	16.7	13	8	23.1	17	1	16.7			
		4, 5, 7, 9-12, 14-16*	8.3									
20	< 1%	Ex vivo	17	1	52.9		x			x		
				3	41.2							
			G1	21	4	5.9		x			x	
					2	47.6						
					3	28.6						
					5	14.3						
					6, 6	4.8*						

\*:Verteilung gilt für alle entsprechend gelisteten var Transkripte; X: kein Amplifikat

Tabelle 3.2: var-Genexpressionsprofile der schnell *switchenden* Patientenisolate.

Patientennummer	Parasitämie	Generation	var-Sequenzen								
			Gruppe A			Gruppe B			Gruppe C		
			Anzahl (n)	Nummer	Verteilung	Anzahl (n)	Nummer	Verteilung	Anzahl (n)	Nummer	Verteilung
2	1%	<i>Ex vivo</i>	11	1 2 3,4	63.6 18.2 9.1*	11	1, 2, 4 3, 5-8	18.2* 9.1*		x	
		G1	10	1 2, 6, 7 5	50 10* 20	9	1-3, 9, 11, 12 10	11.1* 22.2		x	
3	0.01%	<i>Ex vivo</i>	8	1 2	87.5 12.5	12	1-3 4-9	16.7* 8.3	8	1, 2 3-6	25* 12.5*
		G1	9	1 2, 3	77.8 11.1*	11	1, 4, 5, 10-17	9.1*	10	7, 8 3, 9-13	20* 10*
4	3%	<i>Ex vivo</i>	12	1, 2 3-5	25* 16.7*	12	1 2-7	50 8.3*		x	
		G1	10	6 7, 8 9-11	30 20* 10*	12	1 2, 8-10	66.7 8.3*		x	
6	1%	<i>Ex vivo</i>	10	1 2 3	60 30 10	12	1 2, 3 4-8	25 16.7 8.3*		x	
		G1	11	1 3 2	45.5 45.5 9.1	7	4	100		x	
		G2	11	1 3	63.6 36.4	10	4 1 5, 9	50 30 10*		x	
		G3	6	3 4	83.3 16.7	10	4 1 2	50 40 10		x	
		<i>Ex vivo</i>	10	1 2-4	70 10*	8	1 2 3-5	37.5 25 12.5*	23	1 2 3 4, 5	56.5 21.7 13 4.4
		G1	12	1 2 3, 4	41.7 25 16.7*	12	1 6, 7, 8 3, 4, 9, 10	16.7 16.7* 8.3*	9	1	100
G2	9	3, 5 2 1	33.3* 22.2 11.1	12	12 3, 11, 13 4, 14, 15	25 16.7* 8.3*	19	1 3, 6, 7 2, 8, 9	52.6 10.5* 5.3*		
G3	11	1 3, 4 2, 5, 6	36.4 18.2* 9.1*	12	3 4 1, 11-13, 16	33.3 16.7 8.3*	20	2 3 6	70 20 10		
11	4%	<i>Ex vivo</i>	16	1, 2 3-6	37.5* 6.3*		x			x	
		G1	16	1 2, 8-11 7	56.3 6.3* 12.5		x			x	
		G2	12	1 3 12, 13	66.7 16.7 8.3*		x			x	
		<i>Ex vivo</i>	18	1 2, 3 4-9	40.4 11.1* 5.6*		x			x	
15	0.50%	<i>Ex vivo</i>	18	1 2 3	72.2 16.7 5.6*		x			x	
		G1	18	1 2 10, 11	72.2 16.7 5.6*		x			x	
		G3	11	1 2, 3	81.8 9.1*		x			x	
16	3%	G1	12	1 2 3 4	41.7 33.3 16.7 8.3		x		11	1 2 3	64.6 27.3 9.1
		G2	11	2 1, 3 5, 6	45.5 18.2* 9.1*	11	1 2 3-5	45.5 27.3 9.1*	9	1 2-4	33.3 22.2*
17	2%	<i>Ex vivo</i>		x		12	1 2	91.7 8.3			
		G1	10	1 2, 3	40 30*	12	1 3 4, 5	66.7 16.7 8.3*			
18	1%	<i>Ex vivo</i>	11	1 2	90.9 9.1	11	1 2 3 4, 5	36.4 27.3 18.2 9.1*			x
		G1	12	1 3 4-6	50 25 8.3*	11	3 1 2	63.6 27.3 9.1			x

\*: Verteilung gilt für alle entsprechend gelisteten var-Transkripte; X: kein Amplifikat

Tabelle 3.3: var-Genexpressionsprofile der langsam switchenden Patientenisolate.

### 3.1.1.4 Einfluss der Kultivierung auf die *var*-Expression

Eine Adaption an die Kultivierung könnte die Diskrepanz im *var*-Transkriptionsprofil zwischen Kultur- und Patientenisolaten erklären. So wurde das Patientenisolat 12, dessen dominierendes *A*-Transkript über die ersten drei Generationen hinweg wechselte, und somit in die Klasse der schnell *switchenden* Isolate fällt (vgl. Tabelle 3.2), weitere acht Wochen kultiviert, und hierauf das *var*-Expressionsprofil der synchronisierten Ringstadien erneut analysiert. Während in den ersten Generationen lediglich Gene der Gruppe *A* exprimiert waren, zeigte sich nach acht Wochen Kultivierung ein disperses Muster an Transkripten aller drei Gruppen (siehe Abbildung 3.5), das auch, insbesondere in den Gruppen *B* und *C*, über zwei analysierte Generationen konstant blieb.

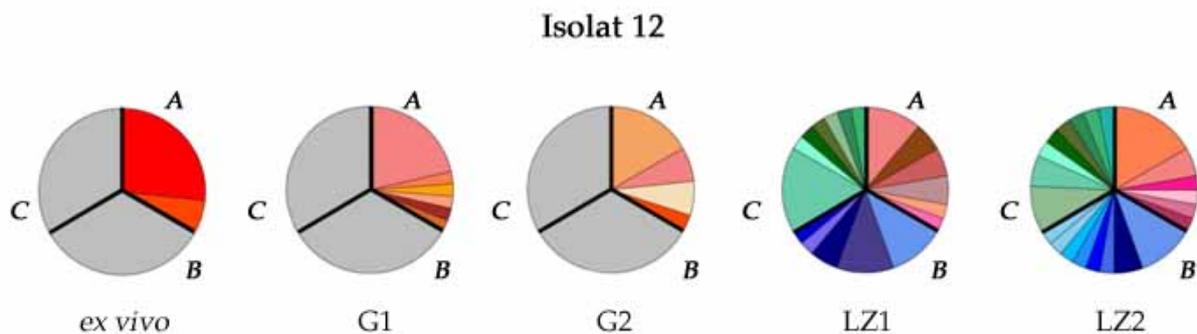


Abbildung 3.5: *var*-Genexpressionsprofil des Patientenisolates 12

*A*, *B* und *C* bezeichnen die *var*-Gengruppen; gleiche Farben stehen für gleiche Sequenzen; grau sind Bereiche einer Gengruppe, innerhalb derer kein Transkript zu detektieren war; G1: erste *in vitro*-Generation; G2: zweite *in vitro*-Generation; LZ1: erste Generation nach Langzeitkultivierung; LZ2: zweite Generation nach Langzeitkultivierung.

Ein detaillierteres Bild zeigt die folgende Analyse, in der die *var*-Expression des Patientenisolates 19 über zwölf synchronisierte *in vitro*-Generationen hinweg untersucht wurde. Bis einschließlich Generation sechs wurden nur Gene der Gruppe *A* exprimiert, wobei das Haupttranskript mit den ersten vier Generationen wechselte (vgl. Abbildung 3.6). Transkripte der Gruppe *B* konnten ab Generation acht, die der Gruppe *C* ab Generation zwölf detektiert werden. Im Laufe der Kultivierung erschienen sukzessive mehr Transkripte, zwischen den Gruppen als auch innerhalb jeder Gruppe.

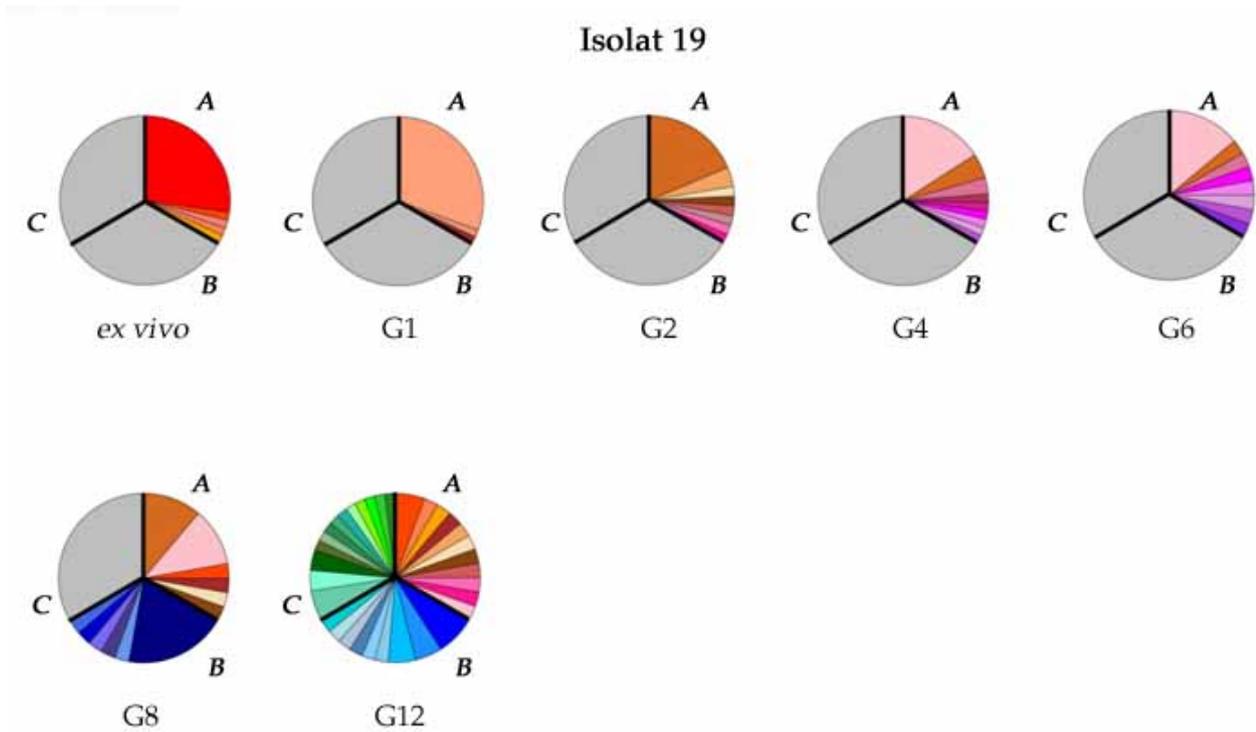


Abbildung 3.6: *var*-Genexpressionsprofil des Patientenisolates 19

*A*, *B* und *C* bezeichnen die *var*-Gengruppen; gleiche Farben stehen für gleiche Sequenzen; grau sind Bereiche einer Gengruppe, innerhalb derer kein Transkript zu detektieren war; *G*: *in vitro*-Generation.

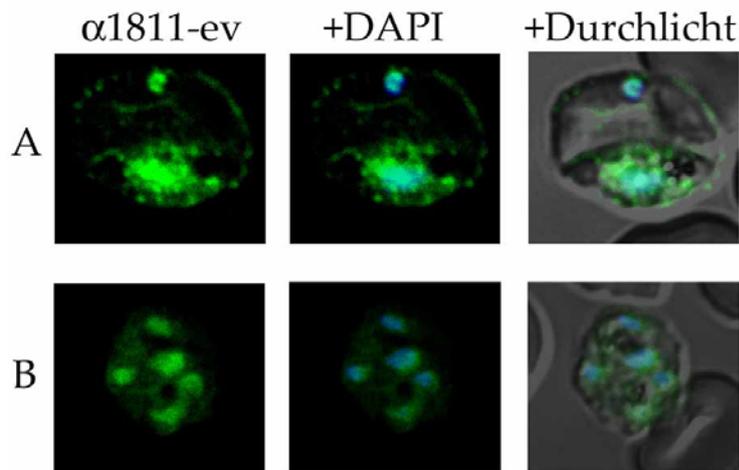


Abbildung 3.7: Indirekte Immunfluoreszenz  $\alpha 1811\text{ev}$  gegen *ex vivo*-Trophozoiten; konfokale Mikroskopie.

Vom *ex vivo*-Haupttranskript abgeleitete PfEMP1-Proteine konnten in manchen Zellen in den Maurerschen Spalten und in der Erythrozytenmembran lokalisiert werden, in manchen Zellen nur im Parasiten sowie im Erythrozytenzytosol. Die Verteilung war ungefähr 50:50. Unter A und B sind beispielhaft die unterschiedlichen Lokalisationen dargestellt. A: PfEMP1-Lokalisation in den Maurerschen Spalten und in der Erythrozytenmembran. B: PfEMP1 ist hauptsächlich im Parasiten und im Erythrozytenzytosol lokalisiert.

$\alpha 1811\text{-ev}$  wurde in einer Verdünnung von 1:300, der sekundäre Antikörper,  $\alpha$ Kaninchen-Alexa488, 1:200 eingesetzt; Kernfarbstoff DAPI: 1:400; die Bilder wurden in Schnitthöhen von jeweils  $0,1\ \mu\text{m}$  aufgenommen.

### 3.1.2 Nachweis des *Switchings* auf Proteinebene

Um zu überprüfen, ob der Wechsel der *var*-Genexpression im Patientenisolat BNI181107 (vgl. Abbildung 3.6) auch mit einem Wechsel des an der Oberfläche präsentierten Proteins einhergeht, wurden wie unter 2.2.12 beschrieben Peptidantikörper synthetisiert, die gegen das vom Haupttranskript der *ex vivo*- respektive der ersten *in vitro*- Generation abgeleiteten Protein gerichtet waren. Mit ihnen wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Blutaussstrichen der Trophozoiten der *ex vivo*- und der ersten *in vitro*-Generation durchgeführt und konfokale sowie *deconvolution*-Mikroskopiebilder erstellt.

In der Hälfte der infizierten Erythrozyten ließen sich die von den Haupttranskripten der *ex vivo*- wie der ersten *in vitro*-Generation abgeleiteten Proteine in 24 Stunden alten Trophozoiten der jeweiligen Generation in der Erythrozytenmembran und den Maurerschen Spalten nachweisen. Anderenfalls waren sie vesikelartig im Erythrozytenzytosol lokalisiert. Immer waren PfEMP1-Proteine im Parasiten selbst lokalisiert - mitunter auch nur dort (Abbildung 3.8 B).

Der Antikörper  $\alpha 1811\text{-ev}$  wurde im Blutaussstrich der Trophozoiten der ersten *in vitro*-Generation, und *vice versa*  $\alpha 1811\text{-1G}$  in dem der *ex vivo*-Generation eingesetzt.

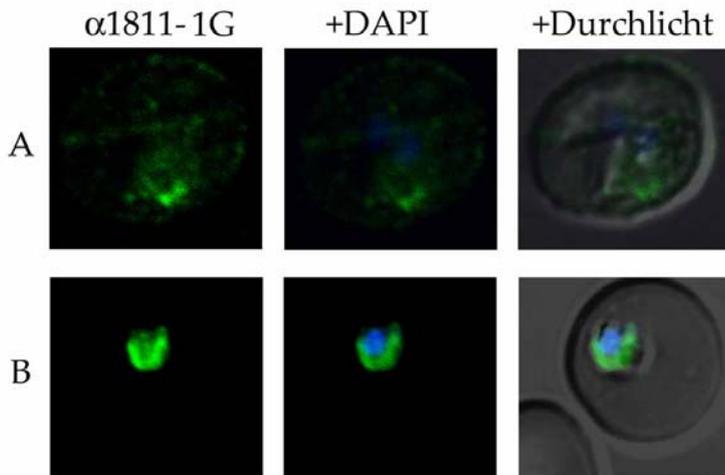


Abbildung 3.8: Indirekte Immunfluoreszenz  $\alpha 1811-1G$  gegen Trophozoiten der ersten *in vitro*- Generation; konfokale Mikroskopie.

Vom Haupttranskript der ersten *in vitro*-Generation abgeleitete PfEMP1-Proteine konnten in manchen Zellen in den Maurerschen Spalten und in der Erythrozytenmembran lokalisiert werden, in manchen Zellen nur im Parasiten sowie im Erythrozytenzytosol. Die Verteilung war ungefähr 50:50. Unter A und B sind beispielhaft die unterschiedlichen Lokalisationen dargestellt. A: PfEMP1-Lokalisation in den Maurerschen Spalten und in der Erythrozytenmembran. B: PfEMP1 ist im Parasiten lokalisiert.

$\alpha 1811-1G$  wurde in einer Verdünnung von 1:300, der sekundäre Antikörper,  $\alpha$ Kaninchen-Alexa488, 1:200 eingesetzt; Kernfarbstoff DAPI: 1:400; die Bilder wurden in Schnitthöhen von jeweils  $0,1 \mu m$  aufgenommen.

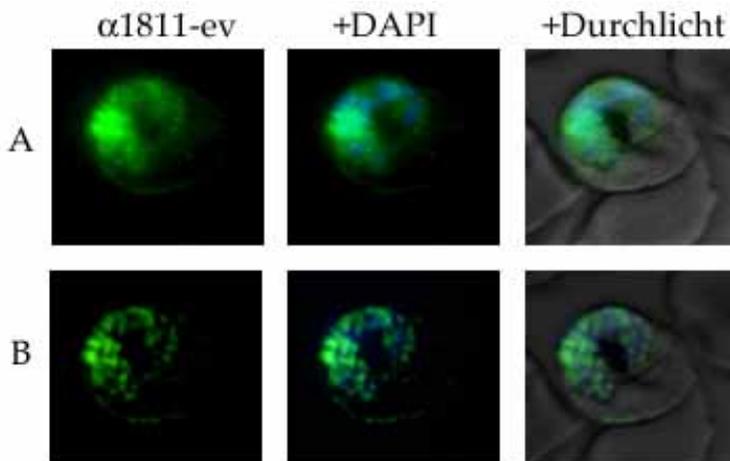


Abbildung 3.9: Indirekte Immunfluoreszenz  $\alpha 1811ev$  gegen *ex vivo*-Trophozoiten.

Lokalisation von PfEMP1 im Parasiten sowie in der Erythrozytenmembran.

A: *stack*; B: *deconvolution*;

die Bilder wurden in Schnitthöhen von jeweils  $0,1 \mu m$  aufgenommen.  $\alpha 1811-ev$  wurde in einer Verdünnung von 1:300, der sekundäre Antikörper,  $\alpha$ Kaninchen-Alexa488, 1:200 eingesetzt; Kernfarbstoff DAPI: 1:400.

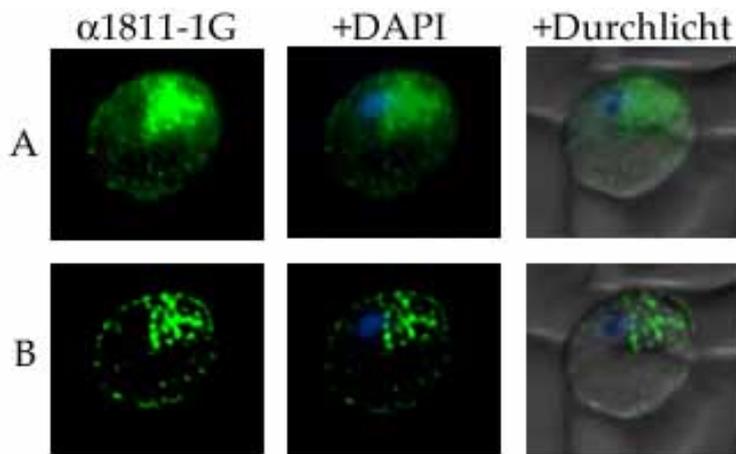


Abbildung 3.10: Indirekte Immunfluoreszenz  $\alpha 1811\text{-}1\text{G}$  gegen Trophozoiten der ersten *in vitro*-Generation und  $\alpha 1811\text{-}1\text{G}$  gegen *ex vivo*-Trophozoiten.

Lokalisation von PfEMP1 im Parasiten sowie in der Erythrozytenmembran.

A: *stack*; B: *deconvolution*;

die Bilder wurden in Schnitthöhen von jeweils  $0,1\ \mu\text{m}$  aufgenommen.  $\alpha 1811\text{-}1\text{G}$  wurde in einer Verdünnung von 1:300, der sekundäre Antikörper,  $\alpha$ Kaninchen-Alexa488, 1:200 eingesetzt; Kernfarbstoff DAPI: 1:400.

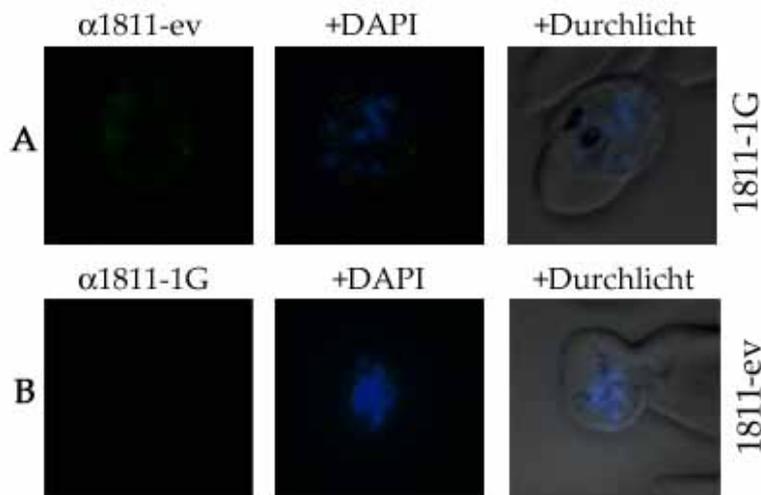


Abbildung 3.11: Indirekte Immunfluoreszenz  $\alpha 1811\text{-}1\text{G}$  gegen Trophozoiten der ersten *in vitro*-Generation.

A:  $\alpha 1811\text{-}ev$  reagiert nicht mit Trophozoiten der ersten *in vitro*-Generation. B:  $\alpha 1811\text{-}1\text{G}$  reagiert nicht mit Trophozoiten der *ex vivo*-Generation.

$\alpha 1811\text{-}ev$  und  $\alpha 1811\text{-}1\text{G}$  wurden in einer Verdünnung von 1:300, der sekundäre Antikörper,  $\alpha$ Kaninchen-Alexa488, 1:200 eingesetzt; Kernfarbstoff DAPI: 1:400.

$\alpha 1811\text{-}ev$  reagierte nicht mit Trophozoiten der ersten *in vitro*-Generation. Daraus ließ sich schließen,

dass das vom Haupttranskript der *ex vivo*-Generation abgeleitete Protein in der ersten *in vitro*-Generation nicht mehr vorhanden war. Ebenso war das vom Haupttranskript der ersten *in vitro*-Generation abgeleitete Protein in Trophozoiten der *ex vivo*-Generation noch nicht nachzuweisen. Diese Ergebnisse bestätigen die Transkriptionsdaten: Das Haupttranskript der *ex vivo*-Generation konnte in der ersten *in vitro*-Generation lediglich ein mal detektiert werden; das Haupttranskript der ersten *in vitro*-Generation hingegen in der *ex vivo*-Generation noch gar nicht (Tabelle 3.2 sowie Abbildung 3.6). Dem Wechsel der Genexpression war folglich der Wechsel des präsentierten Proteins analog.

## 3.2 Bindungsexperimente mit infizierten Erythrozyten

Durch die Bindung seiner an der Erythrozytenoberfläche präsentierten Proteine an Endothelrezeptoren des Wirtes entgeht der Parasit dem Blutstrom durch die Milz und sichert so unmittelbar sein Überleben. PfEMP1 ist das am besten charakterisierte Oberflächenprotein; daneben existieren in der RIF-, STEVOR- und PfMC2TM-Familie weitere potenzielle Bindungspartner, die an der Sequestrierung von *P. falciparum* in Gefäßkapillaren, ein Prozess, der die Schwere des Krankheitsbildes der Malaria tropica maßgeblich beeinflusst, beteiligt sein könnten. Dieser Teil der Arbeit richtete seinen Fokus auf die Expressionsprofile der Multigenfamilien in Parasiten, die Bindungskapazitäten an die Hirnendothelrezeptoren *Rx* und ICAM-1 aufwiesen.

### 3.2.1 Bindungsexperimente mit dem Kulturisolat 3D7 an *Rx*

*Rx* ist erstmalig als Rezeptor für infizierte Erythrozyten beschrieben worden, die Bindungspartner auf Seiten des Parasiten sind nicht bekannt. In diesem Versuch wurden mit 3D7 infizierte Erythrozyten an eine auf ihrer Oberfläche *Rx* exprimierende CHO745-Zelllinie gebunden, und die Expression der Multigenfamilien derer Parasiten, die Bindungskapazitäten aufwiesen im Vergleich zu zwei Kontrollzellpopulationen nach Reinfektion roter Blutkörperchen analysiert.

#### 3.2.1.1 Expressionsprofile der Ringstadien nach Bindung an *Rx*

Zunächst wurden Versuche zur *var*-Genexpression durchgeführt, die in frühen Stadien des erythrozytären Zyklus stattfindet. Die Transkriptionsanalyse der jungen Ringstadien acht Stunden nach Reinfektion der an *Rx* gebundenen Parasiten ergab eine Inaktivierung aller *var*-Gene (siehe Tabelle 3.4); die Analyse wurde auf die übrigen Multigenfamilien ausgeweitet. Die Expressionsprofile dieser Parasitenpopulation wurden über acht weitere synchronisierte Generationen untersucht, wobei sich ergab, dass Gene der Gruppe C bis zur dritten Generation nach dem Bindungsexperiment inaktiviert wurden, die Gene der Gruppen A und B hingegen erst nach der sechsten Generation wieder aktiv vorlagen (Tabelle 3.4). Gene der 2TM-Multigenfamilien waren in der *Rx*-bindenden Parasitenpopulation sowie auch in den acht darauffolgenden *in vitro*-Generationen nicht exprimiert.

Expression in 3D7-Ringstadien, gebunden an <i>Rx</i>		Generation							
Multigenfamilie	Untergruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>var</i>	A	-	-	-	-	-	√	√	√
	B	-	-	-	-	-	√	√	√
	C	-	-	√	√	√	√	√	√
<i>rif</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>stevor</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>pfmc2tm</i>		-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3.4: Genexpressionsprofil von 3D7 nach Bindung an *Rx* in Ringstadien der acht darauffolgenden Generationen.

32 h Trophozoiten 3D7, gebunden an Rx; Exp. 1			
	Parasiten/100 CHO-Zellen	Standardabweichung	gebundene Parasiten gesamt [%]
1. Präabsorption	38,6	4,28	6,3
Kontroll-Präabsorption	6,8	2,48	0,8
Panning	18,4	3,26	2,2

Tabelle 3.5: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an Rx; Exp. 1.

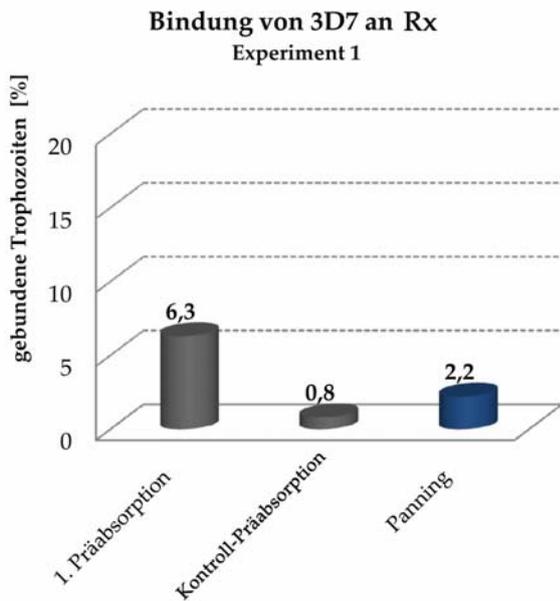


Abbildung 3.12: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an Rx; Exp. 1.

Im Folgenden wurden die Expressionsprofile der adulten Trophozoiten 28 Stunden nach Reinfektion untersucht.

### 3.2.1.2 Analyse der Expressionsmuster nach Bindung an Rx in adulten 3D7-Trophozoiten

**Rx-Bindung über eine Parasitengeneration** Das Bindungsexperiment wurde wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt und jeweils 500 CHO Zellen mit den an sie gebundenen Erythrozyten ausgezählt.

6,3 % der infizierten Erythrozyten banden an CHO-Zellen, in einer weiteren Präabsorptionsrunde (Kontroll-Präabsorption), die parallel zum Bindungsexperiment durchgeführt wurde, verblieben noch 0,8 % der Zellen. Zieht man diese von den 2,2 % des Bindungsexperiments ab, erhält man einen Wert von 1,4 %, der den Prozentsatz der 3D7-Population angibt, der in der Lage war, spezifisch an Rx zu binden.

Die Trophozoiten, die Bindungskapazitäten an Rx aufwiesen, exprimierten Gene der *rifA*- sowie der *pfmc2tm*-Familie (vgl. Tabelle 3.6). Unter den *pfmc2tm*-Transkripten fand sich ein zu 50 % do-

minierendes, die *rifA*-Transkripte waren divers. Im Vergleich wurden die Expressionsprofile der Parasitenpopulationen ohne Bindungskapaziten und solche, die dem Bindungsexperiment nicht unterzogen wurden, analysiert. Hier zeigte sich in beiden Kontrollen ein variables Expressionsmuster sowohl der *rifA*- als auch der *pfmc2tm*-Gene (siehe Abbildungen 3.13 und 3.14).

Genexpression 3D7, gebunden an Rx ; Exp. 1							
Parasitenpopulation (28 h Trophozoiten)				Sequenzen			
	Multigenfamilie	Untergruppe	Expression	Anzahl (n)	Gen	Verteilung (%)	
Panning	<i>var</i>	A	n. e.				
		B	n. e.				
		C	n. e.				
	<i>rif</i>	A	√		12	PF1B1050w	23
						PF1I815c	8,33
						PF10075w	16,67
						PF110009	8,33
						PFA0045c	16,67
						MAL7P1.185	16,67
						PFB1010w	8,33
	B	n. e.					
	<i>stevor</i>		n. e.				
	<i>pfmc2tm</i>		√		12	PF100390	50
PFF0060w						16,67	
MAL7P1.58						16,67	
PFF1525c						8,33	
MAL7PT.213						8,33	
ungebunden	<i>var</i>	A	√	n. a.			
		B	√	n. a.			
		C	√	n. a.			
	<i>rif</i>	A	√		10	PFA0020w	10
						PF110021	10
						PF10075w	10
						PFC0010c	10
						PF070138	10
						PFD1225w	10
						MAL7P1.185	10
						PFA0045c	10
	PFB1010w	10					
	B	√	n. a.				
	<i>stevor</i>		√	n. a.			
	<i>pfmc2tm</i>		√		10	PF100390	10
						PFF0060w	10
						PFA0065w	20
PFC1080c						10	
PFF1525c						10	
MAL7P1.213						20	
PFB0985c						10	
MAL7P1.5						10	
Kultur	<i>var</i>	A	√	n. a.			
		B	√	n. a.			
		C	√	n. a.			
	<i>rif</i>	A	√		10	PF11815c	10
						PFD0060w	10
						PF110021	10
						PF10075w	10
						PFC0010c	10
						PF070138	10
						PFD1225w	10
						MAL7P1.185	10
	PFA0045c	10					
	PFB1010w	10					
B	√	n. a.					
<i>stevor</i>		√	n. a.				
<i>pfmc2tm</i>		√		10	PF100390	10	
					PFA0680c	10	
					PFF0060w	10	
					PF110014	10	
					PFC1080c	10	
					MAL7P1.58	10	
					PFF1525c	10	
					PF110025	10	
					PFB0985c	10	
MAL7P1.213	10						

n. e.: nicht exprimiert; n.a.: nicht analysiert

Tabelle 3.6: Genexpressionsprofil der 3D7 Trophozoiten nach Bindung an Rx.

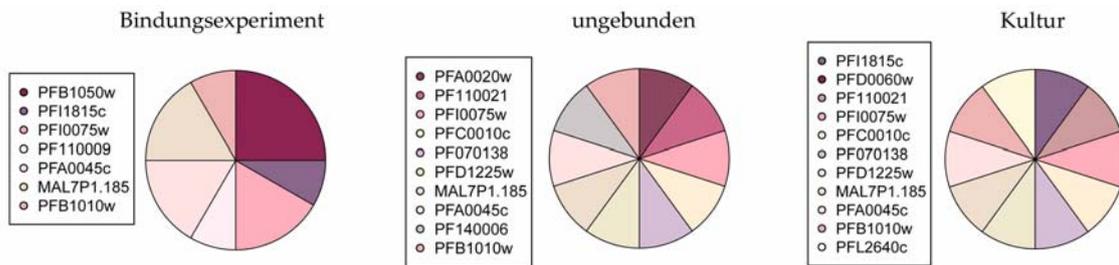


Abbildung 3.13: Sequenzverteilung der *rifA*-Transkripte der 3D7 Trophozoiten nach Bindung an Rx; Exp. 1.

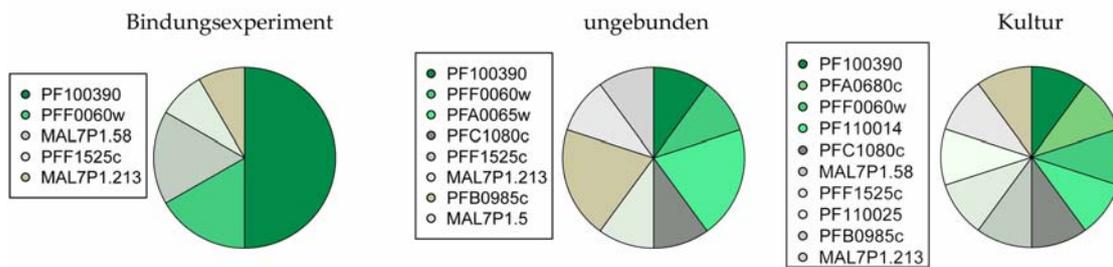
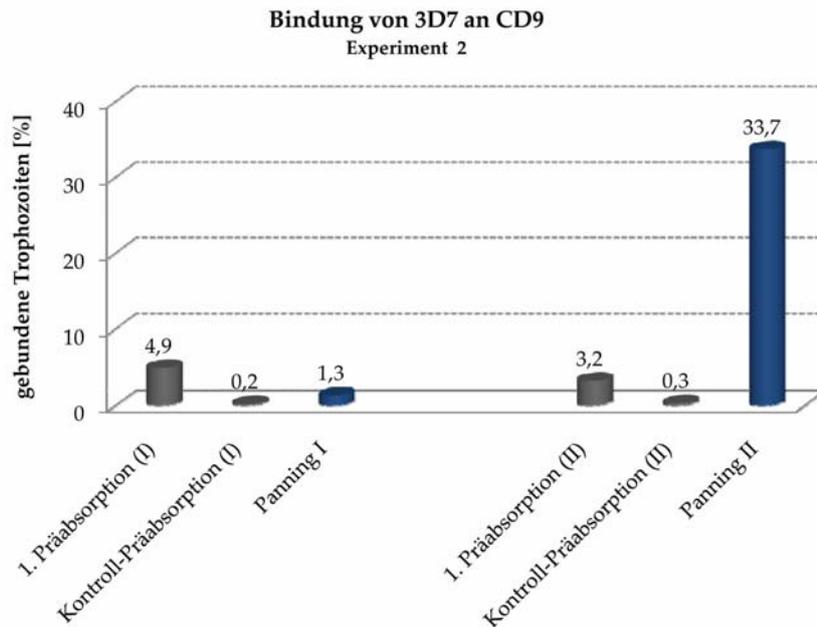


Abbildung 3.14: Sequenzverteilung der *pfmc2tm*-Transkripte der 3D7 Trophozoiten nach Bindung an Rx; Exp. 1.

32 h Trophozoiten 3D7, gebunden an CD9; Exp. 2			
	Parasiten/100 CHO-Zellen	Standardabweichung	gebundene Parasiten gesamt [%]
1. Präabsorption (I)	29	4,43	4,9
Kontroll-Präabsorption (I)	4,2	2,56	0,2
Panning I	15,8	3,31	1,3
1. Präabsorption (II)	17,4	4,8	3,2
Kontroll-Präabsorption (II)	3	2	0,3
Panning II	48,8	6,9	33,7

Tabelle 3.7: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an *Rx*; Exp. 2.Abbildung 3.15: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an *Rx*; Exp. 2.

***Rx*-Bindung über zwei Parasitengenerationen** In einem nächsten Versuch wurden die 3D7 Parasiten in zwei aufeinanderfolgenden Generation an *Rx*-exprimierende Zellen gebunden; zum einen, um eine Anreicherung derer Parasiten mit Bindungskapazität zu erreichen und um zu untersuchen, ob damit eine Anreicherung des dominierenden Transkriptes verbunden war. Band man mit 3D7 infizierte Erythrozyten in zwei aufeinanderfolgenden Generationen an *Rx*, ließ sich der Prozentsatz der Parasiten mit Bindungskapazität von ca. 1 % auf 33,7 % steigern (vgl. Tabelle 3.7 sowie Abbildung 3.15). Die Bindung an die Kontrollzelllinie blieb in beiden Generationen konstant.

In der ersten wie der zweiten Generation an Parasiten mit Bindungskapazität waren wiederum Gene der *rifA*- und der *pfmc2tm*-Familie exprimiert (vgl. Tabelle 3.2.1.2 sowie die Abbildungen 3.16 und 3.17). Während die *rifA*-Transkripte über beide Generationen variabel verteilt waren, war das dominierende *pfmc2tm*-Transkript in der ersten Generation zu 41,18 %, in der zweiten Generation zu 71,43 % vertreten (siehe Tabelle 3.7).

Genexpression 3D7, gebunden an Rx ; Exp. 2							
Parasitenpopulation (28 h Trophozoiten)	Sequenzen						
	Multigenfamilie	Untergruppe	Expression	Anzahl (n)	Gen	Verteilung (%)	
Panning I	<i>var</i>	A	n. e.				
		B	n. e.				
		C	n. e.				
	<i>rif</i>	A	√		12	PF11815c	33,33
						PF110021	8,33
						PF10075w	8,33
						PFD0060w	8,33
						PF110009	8,33
	<i>stevor</i>						
	<i>pfmc2tm</i>		√		21	PF1100390	11,18
						PF1A0680c	17,65
PFF0060w						11,77	
PF110014						11,77	
PFC1080c						5,88	
MAL7P1.58						5,88	
PFF1525c						5,88	
Panning II	<i>var</i>	A	n. e.				
		B	n. e.				
		C	n. e.				
	<i>rif</i>	A	√		17	PF11050w	17,65
						PF110021	11,76
						PF10075w	11,76
						PFD0060w	23,53
						PF110009	11,76
						PFL2640c	5,88
						PFD0050w	5,88
	PFC0010c	5,88					
	PF070138	5,88					
	<i>stevor</i>						
<i>pfmc2tm</i>		√		19	PF1100390	71,43	
					PFF060w	14,29	
					PF1A0065w	9,52	
					PF110025	4,76	
ungebunden	<i>var</i>	A	√	n. a.			
		B	√	n. a.			
		C	√	n. a.			
	<i>rif</i>	A	√		10	PF11050w	10
						PFA0020w	10
						PF110021	10
						PF10075w	10
						PFC0010c	20
						PF070138	10
						PFD1225w	10
	MAL7P1.185	10					
	PFA0045c	10					
	<i>stevor</i>						
<i>pfmc2tm</i>		√		11	PF1100390	9,09	
					PFA0680c	9,09	
					PFF0060w	9,09	
					PF110014	9,09	
					PFC1080c	9,09	
					MAL7P1.58	18,18	
					PFF1525c	9,09	
					PF110025	9,09	
MAL7P1.213	9,09						
MAL7P1.5	9,09						

n. e.: nicht exprimiert; n.a.: nicht analysiert

Genexpression 3D7, gebunden an Rx ; Exp. 2							
Parasitenpopulation (28 h Trophozoiten)				Sequenzen			
	Multigenfamilie	Untergruppe	Expression	Anzahl (n)	Gen	Verteilung (%)	
Kultur	<i>var</i>	A	√	n. a.			
		B	√	n. a.			
		C	√	n. a.			
	<i>rif</i>	A	√		10	PFB1050w	10
						PF110021	10
						PF10075w	10
						PFC0010c	10
						PF070138	10
						PFD1225w	10
						MAL7P1.185	10
						PFA0045c	10
						PFB1010w	10
	PF140006	10					
	<i>stevor</i>	B	√		n. a.		
	<i>pfmc2tm</i>		√		10		
						PF100390	10
					PFA0680c	10	
					PPF0060w	10	
					PF110014	10	
					PFC1080c	10	
					MAL7P1.58	10	
					PPF1525c	10	
					PF110025	10	
					MAL7P1.213	10	
					MAL7P1.5	10	

n. e.: nicht exprimiert; n.a.: nicht analysiert

Tabelle 3.8: Genexpressionsprofil der 3D7 Trophozoiten nach Bindung an Rx über zwei aufeinanderfolgende Generationen.

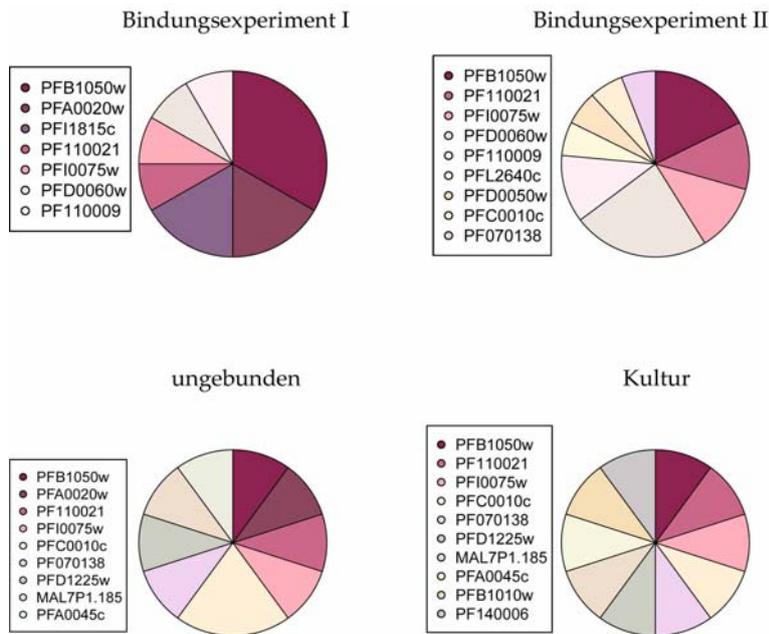


Abbildung 3.16: Sequenzverteilung der *rifA*-Transkripte der 3D7 Trophozoiten nach Bindung an Rx über zwei aufeinanderfolgende Generationen.

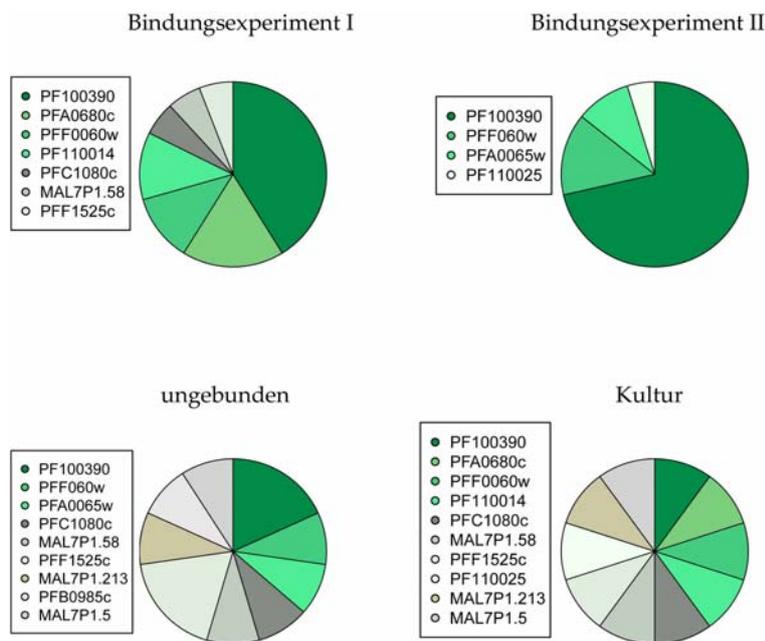


Abbildung 3.17: Sequenzverteilung der *pfmc2tm*-Transkripte der 3D7 Trophozoiten nach Bindung an Rx über zwei aufeinanderfolgende Generationen.

32 h Trophozoiten 3D7, gebunden an ICAM-1; Exp. 1			
	Parasiten/100 CHO-Zellen	Standardabweichung	gebundene Parasiten gesamt [%]
1. Präabsorption (I)	57	3,16	24,3
Kontroll-Präabsorption (I)	13,4	3,14	6,5
Panning I	27	3,58	7,9
1. Präabsorption (II)	17,4	4,8	15,4
Kontroll-Präabsorption (II)	10,4	2,15	5,9
Panning II	51,8	4,12	79,6

Tabelle 3.9: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 1.

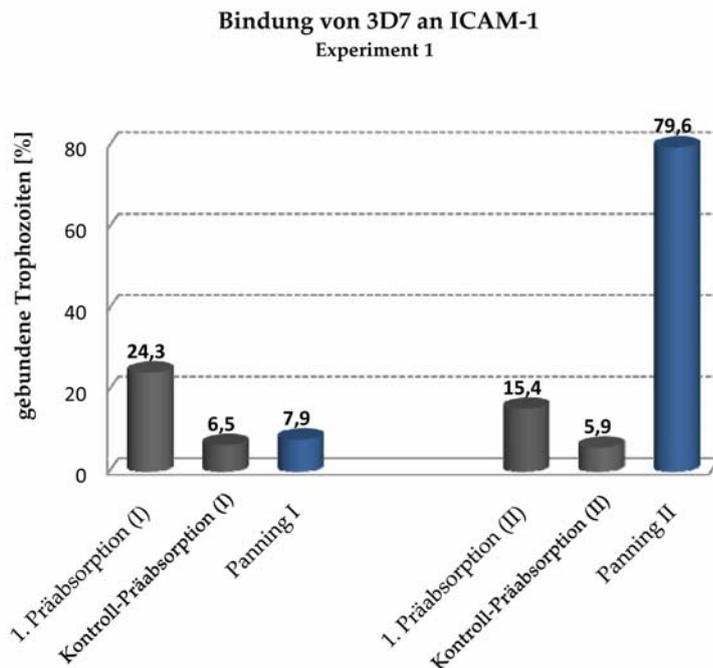


Abbildung 3.18: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 1.

### 3.2.2 Bindungsexperimente mit dem Kulturoisolat 3D7 an ICAM-1

PfEMP1 ist als Bindungspartner für den Hirnendothelrezeptor ICAM-1, der an der seltenen, doch schweren Komplikation der zerebralen Malaria beteiligt zu sein scheint, bekannt.

#### 3.2.2.1 Bindungsexperimente

Die mit 3D7 infizierten Erythrozyten wurden jeweils über zwei Parasitengenerationen an eine auf ihrer Oberfläche ICAM-1 exprimierende CHO745-Zelllinie gebunden. Es wurden jeweils 500 CHO-Zellen mit den an sie adhärirten infizierten Erythrozyten ausgezählt. Das Experiment wurde vier mal wiederholt. Während der Experimente 3 und 4 wurden die Parasiten unter Zugabe von 4 % humanem Serum kultiviert.

32 h Trophozoiten 3D7, gebunden an ICAM-1; Exp. 2			
	Parasiten/100 CHO-Zellen	Standardabweichung	gebundene Parasiten gesamt [%]
Präabsorption I	47,6	3,07	19,8
Panning I	15,8	2,31	5,1
Präabsorption II	17,2	2,32	9,3
Panning II	51,4	2,33	72,5

Tabelle 3.10: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 2.

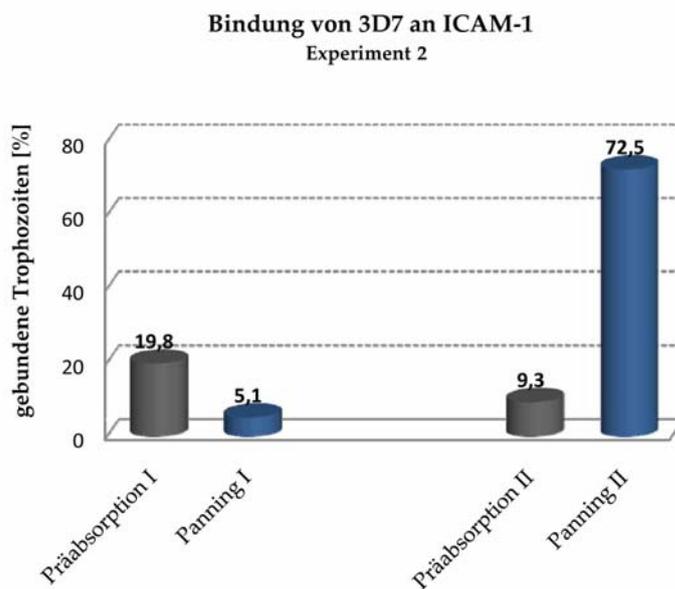


Abbildung 3.19: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 2.

32 h Trophozoiten 3D7, gebunden an ICAM-1; Exp. 3			
	Parasiten/100 CHO-Zellen	Standardabweichung	gebundene Parasiten gesamt [%]
1. Präabsorption (I)	38,6	3,44	9,6
Kontroll-Präabsorption (I)	15,2	2,71	4,9
Panning I	23	3,03	6,3
1. Präabsorption (II)	31,6	3,14	11
Kontroll-Präabsorption (II)	8,4	3,2	4,7
Panning II	60,6	3,72	59

Tabelle 3.11: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 3.

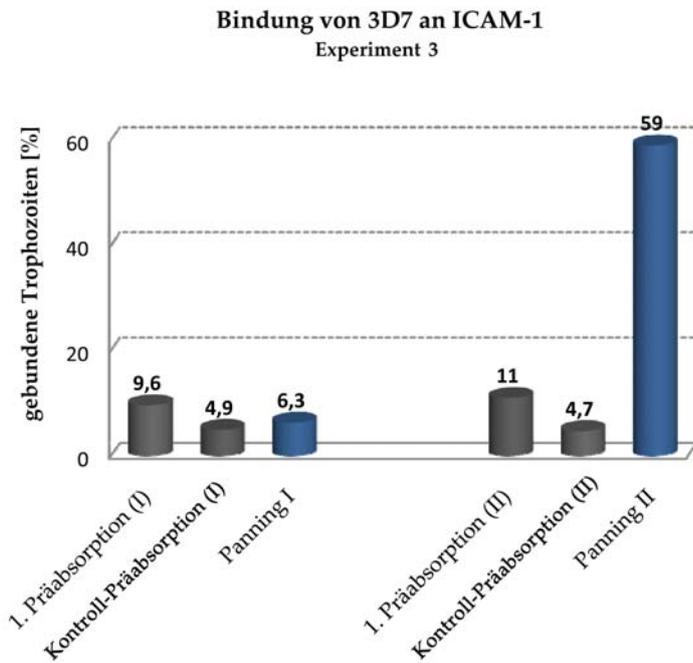


Abbildung 3.20: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 3.

32 h Trophozoiten 3D7, gebunden an ICAM-1; Exp. 4			
	Parasiten/100 CHO-Zellen	Standardabweichung	gebundene Parasiten gesamt [%]
Präabsorption I	31	6,52	3,1
Panning I	15,2	2,14	1,57
Präabsorption II	21,4	4,41	2,14
Panning II	50,2	3,71	45,14

Tabelle 3.12: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 4.

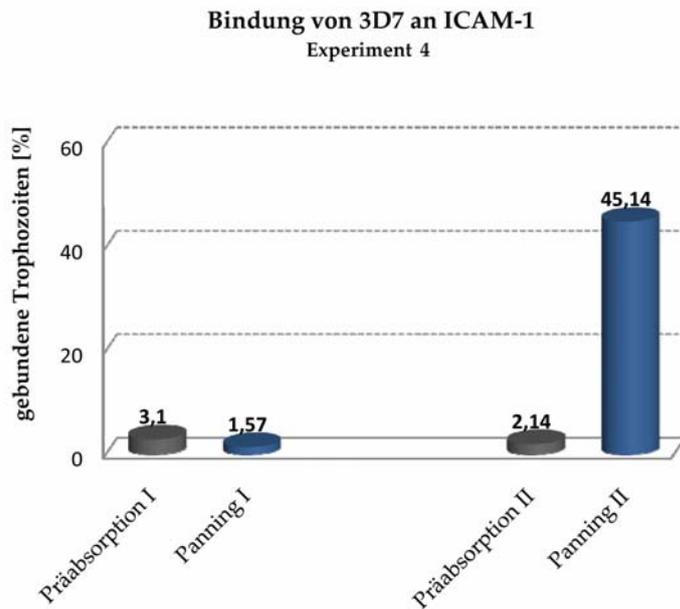


Abbildung 3.21: Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 4.

Der Prozentsatz der gebundenen infizierten Erythrozyten lag in der ersten Parasitengeneration aller vier Bindungsexperimente unter Abzug derer Parasiten der Kontroll-Präabsorption, die parallel zum Bindungsexperiment durchgeführt wurde, bei etwa 1 % (vgl. Tabelle 3.9 und 3.11). Im Bindungsexperiment der darauffolgenden Generation ließ sich der Prozentsatz der Parasiten mit Bindungskapazität auf etwa 45 % bis zu über 70 % steigern (siehe Abbildungen 3.18, 3.19, 3.20 und 3.21). Es fällt auf, dass der Prozentsatz der Präabsorption in den Experimenten 3 und 4, in denen die Parasiten in Gegenwart von humanem Serum kultiviert wurden, auf 9,6 % (vgl. Abbildung 3.20) respektive 3,1 % (vgl. Abbildung 3.21) sank. Infizierte Erythrozyten, die ohne Zugabe von humanem Serum kultiviert wurden, banden zu etwa 20 % an die GFP-exprimierende CHO-Kontrollzelllinie (vgl. Abbildung 3.18 und 3.19).

### 3.2.2.2 Expressionsanalysen

Da PfEMP1 als Bindungspartner von ICAM-1 bekannt ist, wurden in allen vier Experimenten die Expressionsmuster der frühen Ringstadien analysiert, in denen die *var*-Gene exprimiert werden. In Experiment 4 wurde zusätzlich das Transkriptionsprofil der adulten Trophozoiten untersucht. Zu allen Zeitpunkten wurde die Expression aller Multigenfamilien in den Parasitenpopulationen derer mit Bindungskapazität, derer ohne und derer, die dem Experiment nicht unterzogen wurden, analysiert.

Genexpression 3D7, gebunden an ICAM-1, Exp. 1						
Parasitenpopulation (8 h Ringe)				Sequenzen		
	Multigenfamilie	Untergruppe	Expression	Anzahl (n)	Gen	Verteilung (%)
Panning I	<i>var</i>	A	√	21	PF13_0003	33,3
					PFD1235w	19,05
					PFA0015c	19,05
					PFI1820w	14,29
					PF11_0521	9,52
					PFE1640w	4,76
		B	n. e.			
		C	n. e.			
	<i>rif</i>	A	n. e.			
		B	n. e.			
<i>stevor</i>		n. e.				
<i>pfmc2tm</i>		n. e.				
Panning II	<i>var</i>	A	√	17	PF13_0003	23,53
					PFD1235w	17,65
					PF11_0521	11,75
					PFA0015c	11,75
					PFI1820w	5,88
					PFE1640w	5,88
		B	n. e.			
		C	n. e.			
	<i>rif</i>	A	n. e.			
		B	n. e.			
<i>stevor</i>		n. e.				
<i>pfmc2tm</i>		n. e.				
ungebunden	<i>var</i>	A	√	10	PFD1235w	10
					PFA0015c	10
					PFI1820w	20
					PFE1640w	30
					PF11_0008	10
					PFD0020c	10
	B	√	n. a.			
<i>stevor</i>		√	n. a.			
<i>pfmc2tm</i>		√	n. a.			
Kultur	<i>var</i>	A	√	10	PFD1235w	10
					PFA0015c	10
					PFI1820w	20
					PFE1640w	20
					PF11_0008	10
					PFD0020c	10
		B	√	n. a.		
		C	√	n. a.		
	<i>rif</i>	A	√	n. a.		
		B	√	n. a.		
<i>stevor</i>		√	n. a.			
<i>pfmc2tm</i>		√	n. a.			

n. e.: nicht exprimiert; n. a.: nicht analysiert

Tabelle 3.13: Genexpressionsprofil der 3D7 Ringstadien nach Bindung an ICAM-1; Exp. 1

Genexpression 3D7, gebunden an ICAM-1, Exp. 2						
Parasitenpopulation (8 h Ringe)				Sequenzen		
	Multigenfamilie	Untergruppe	Expression	Anzahl (n)	Gen	Verteilung (%)
Panning II	<i>var</i>	A	√	17	PF13_0003	47,06
					PFD1235w	23,53
					PF11_0521	23,53
					PF11820w	5,88
		B	n. e.			
		C	n. e.			
	<i>rif</i>	A	n. e.			
		B	n. e.			
<i>stevor</i>		n. e.				
<i>pfmc2tm</i>		n. e.				
ungebunden	<i>var</i>	A	√	12	PF13_0003	8,33
					PFD1235w	8,33
					PFA0015c	16,67
					PF11820w	16,67
					PFE1640w	25
					PFD0020c	8,33
		PFF0005c	8,33			
	PF08_0104	8,33				
	B	√	n. a.			
<i>stevor</i>		√	n. a.			
<i>pfmc2tm</i>		√	n. a.			
Kultur	<i>var</i>	A	√	11	PFD1235w	9,09
					PFA0015c	18,18
					PF11820w	18,18
					PFE1640w	18,18
					PF11_0008	9,09
					PFD0020c	9,09
		PFF0005c	9,09			
		PF08_0104	9,09			
		B	√	n. a.		
	C	√	n. a.			
<i>rif</i>	A	√	n. a.			
	B	√	n. a.			
<i>stevor</i>		√	n. a.			
<i>pfmc2tm</i>		√	n. a.			

n. e.: nicht exprimiert; n. a.: nicht analysiert

Tabelle 3.14: Genexpressionsprofil der 3D7 Ringstadien nach Bindung an ICAM-1; Exp. 2

Genexpression 3D7, gebunden an ICAM-1, Exp. 3							
Parasitenpopulation (8 h Ringe)				Sequenzen			
	Multigenfamilie	Untergruppe	Expression	Anzahl (n)	Gen	Verteilung (%)	
Panning I	<i>var</i>	A	√	19	PF13_0003	12,11	
					PF11_0521	26,32	
					PFD1235w	26,32	
						PFA0015c	5,26
		B	n. e.				
		C	n. e.				
	<i>rif</i>	A	n. e.				
		B	n. e.				
<i>stevor</i>		n. e.					
<i>pfmc2tm</i>		n. e.					
Panning II	<i>var</i>	A	√	19	PF13_0003	17,37	
					PF11_0521	31,58	
					PFD1235w	15,79	
						PFA0015c	5,26
		B	n. e.				
		C	n. e.				
	<i>rif</i>	A	n. e.				
		B	n. e.				
<i>stevor</i>		n. e.					
<i>pfmc2tm</i>		n. e.					
ungebunden	<i>var</i>	A	√	11	PFD1235w	9,09	
					PFA0015c	18,18	
					PFI1820w	18,18	
					PFE1640w	27,27	
					PF11_0008	9,09	
	PFD0020c	9,09					
	B	√	n. a.				
<i>stevor</i>		√	n. a.				
<i>pfmc2tm</i>		√	n. a.				
Kultur	<i>var</i>	A	√	10	PF13_0003	10	
					PFD1235w	10	
					PFA0015c	10	
					PFI1820w	20	
					PFE1640w	20	
	PF11_0008	10					
	PFF0005c	10					
	PF08_0104	10					
		B	√	n. a.			
	C	√	n. a.				
<i>rif</i>	A	√	n. a.				
	B	√	n. a.				
<i>stevor</i>		√	n. a.				
<i>pfmc2tm</i>		√	n. a.				

n. e.: nicht exprimiert; n. a.: nicht analysiert

Tabelle 3.15: Genexpressionsprofil der 3D7 Ringstadien nach Bindung an ICAM-1; Exp. 3

Genexpression 3D7, gebunden an ICAM-1, Exp. 4										
				Sequenzen						
Parasitenpopulation	Multigenfamilie	Untergruppe	Expression	Anzahl (n)	Gen	Verteilung (%)				
Panning II	8 h Ringe	var	A	√	20	PFI13_0003	20			
						PF11_0521	20			
						PFI1235w	15			
				PFD0020c		10				
			B	n. e.						
			C	n. e.						
		rif	A	n. e.						
			B	n. e.						
		stevor		n. e.						
		pfmc2tm		n. e.						
	28 h Trophozoiten	var	A	√	n. a.					
		C	n. e.							
		rif	A	n. e.						
			B	n. e.						
		stevor		n. e.						
	pfmc2tm		n. e.							
			√	21	PFA0065w	42,68				
					MAL7P1.213	19,05				
					MAL7P1.58	9,52				
					PFF1525c	9,52				
					PFA0680c	9,52				
					PFF0060w	4,76				
					PFB0985c	4,76				
ungebunden	8 h Ringe	var	A	√	10	PFI13_0003	10			
							PFD1235w	10		
							PFA0015c	20		
						PFI1820w	20			
						PFE1640w	10			
						PF11_0008	10			
		PFD0020c	10							
		PFF0005c	10							
		B	√	n. a.						
		stevor		√		n. a.				
		pfmc2tm		√		n. a.				
28 h Trophozoiten	var	A	√	n. a.						
		B	√	n. a.						
		stevor		√	n. a.					
		pfmc2tm		√	11	PFA0065w	9,09			
						MAL7P1.213	9,09			
				PFF1525c		18,18				
				PFC1080c		18,18				
				PFB0985c		18,18				
				MAL7P1.58	9,09					
				PF100390	9,09					
				PFF0060w	9,09					
Kultur	8 h Ringe	var	A	√	12	PFD1235w	8,33			
							PFA0015c	16,67		
							PFI1820w	8,33		
							PFE1640w	25		
							PF11_0008	16,67		
						PFD0020c	8,33			
						PFF0005c	8,33			
						PF08_0104	8,33			
						B	√	n. a.		
						C	√	n. a.		
		rif	A	√		n. a.				
			B	√		n. a.				
		stevor		√		n. a.				
		pfmc2tm		√		n. a.				
	28 h Trophozoiten	var	A	√		n. a.				
			B	√		n. a.				
C			√	n. a.						
		rif	A	√	n. a.					
			B	√	n. a.					
		stevor		√	n. a.					
	pfmc2tm		√	10	PFA0065w	10				
					MAL7P1.213	20				
					MAL7P1.58	20				
					PFC1080c	10				
					PFB0985c	10				
					PF100390	20				
				PFF0060w	10					

n. e.: nicht exprimiert; n. a.: nicht analysiert

Tabelle 3.16: Genexpressionsprofil der 3D7 Ringstadien und adulten Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 4

In den jungen Ringstadien acht Stunden nach Reinfektion aller Parasitenpopulationen, die in der Lage waren, an ICAM-1 zu binden, waren lediglich Gene der Gruppe *var-A* exprimiert. Hier sind insbesondere die Transkripte der drei Gene PF13\_0003, PF11\_0521 und PFD1235w detektiert worden, die in allen analysierten Proben vertreten waren und dabei die drei häufigsten Transkripte darstellten (vgl. Tabellen 3.13, 3.14, 3.15 und 3.16). Die Transkripte von PF13\_0003 bildeten in jeder ICAM-1 bindenden Parasitenpopulation mit Prozentsätzen von 33,3 % und 42,11 % in der ersten Parasitengeneration, und solchen von 47 % bis 55 % in der darauffolgenden das in häufigster Frequenz detektierte. Das Expressionsmuster derer Parasiten, die in Gegenwart von 4 % humanem Serum kultiviert wurden (Experimente 3 und 4) unterschied sich nicht von dem derer, die ohne Serum kultiviert wurden. Die Kontrollpopulationen der Parasiten ohne ICAM-1 Bindungskapazität und der, die dem Bindungsexperiment nicht unterzogen wurden, zeigten in allen vier Experimenten ein disperses Bild an *var-A* Sequenzen; daneben waren Gene aller anderen untersuchten Multigenfamilien exprimiert, deren Transkripte nicht sequenziert wurden.

Im vierten Experiment wurden zusätzlich zu den Transkriptionsprofilen der jungen Ringstadien die der adulten Trophozoiten analysiert. In der Population der ICAM-1 bindenden Parasiten der ersten wie zweiten Generation waren neben *var-A* Genen, deren Transkripte nicht auf ihre Verteilung untersucht wurden, zusätzlich Gene der *pfmc2tm*-Familie exprimiert; mit 42,68 % am häufigsten war das Transkript des Gens PFA0065w vertreten (vgl. Tabelle 3.16). Die adulten Trophozoiten der Kontrollpopulationen exprimierten Gene aller untersuchten Familien, mit großer Variabilität der *pfmc2tm*-Transkripte, aus denen zwischen zehn und zwölf Sequenzen generiert wurden. Die folgenden Abbildungen zeigen die Verteilungen der *var-A* und der *pfmc2tm*-Sequenzen in graphischer Darstellung.

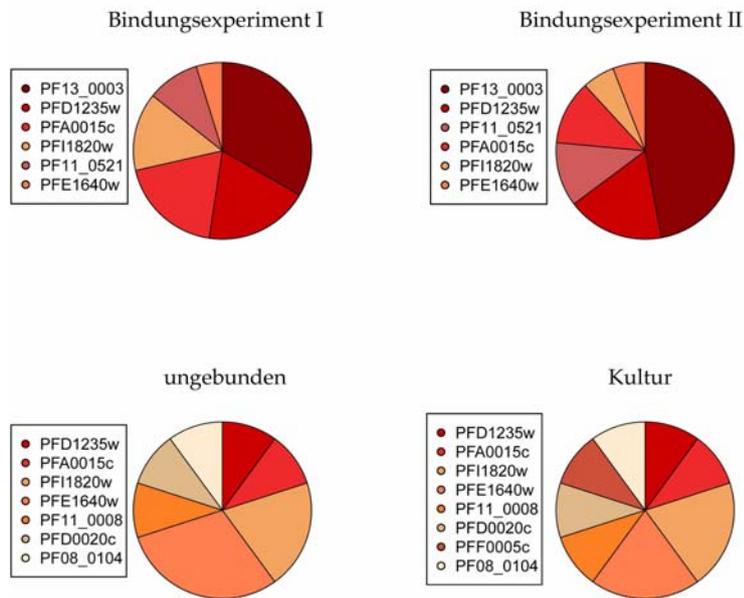


Abbildung 3.22: Sequenzverteilung der *var-A*-Transkripte junger Ringstadien nach Bindung an ICAM-1 über zwei aufeinanderfolgende Generationen; Exp. 1.

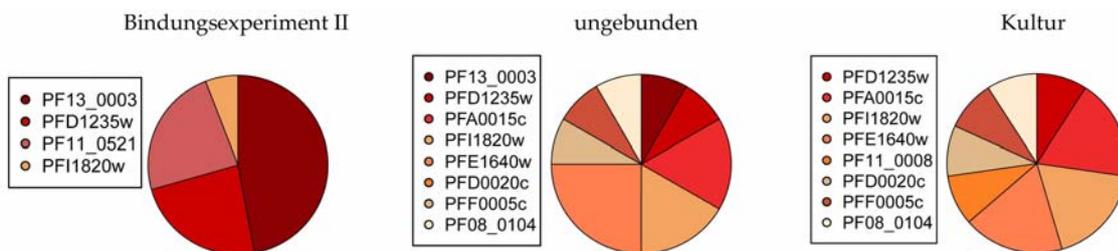


Abbildung 3.23: Sequenzverteilung der *var-A*-Transkripte junger Ringstadien nach Bindung an ICAM-1 über zwei aufeinanderfolgende Generationen; Exp. 2.

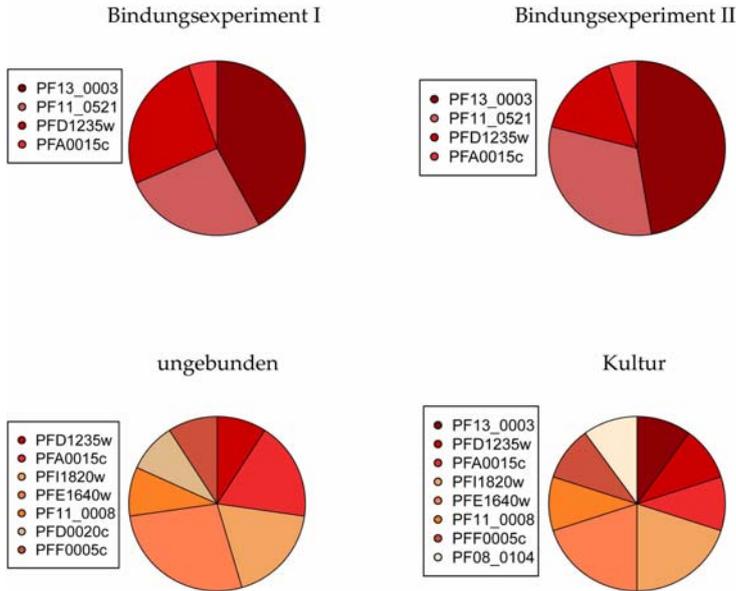


Abbildung 3.24: Sequenzverteilung der *var-A*-Transkripte junger Ringstadien nach Bindung an ICAM-1 über zwei aufeinanderfolgende Generationen; Exp. 3.

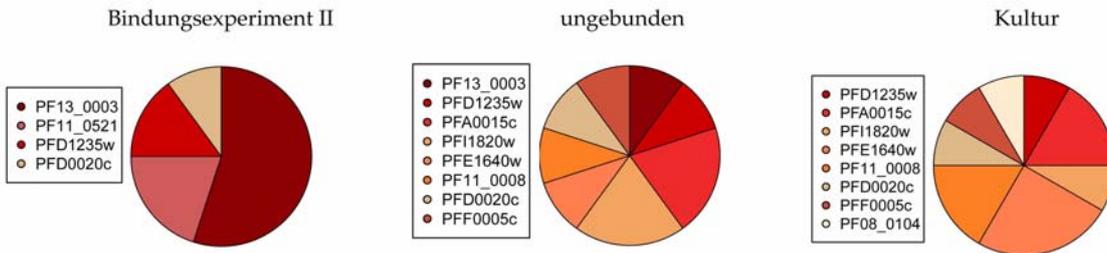


Abbildung 3.25: Sequenzverteilung der *var-A*-Transkripte junger Ringstadien nach Bindung an ICAM-1 über zwei aufeinanderfolgende Generationen; Exp. 4.

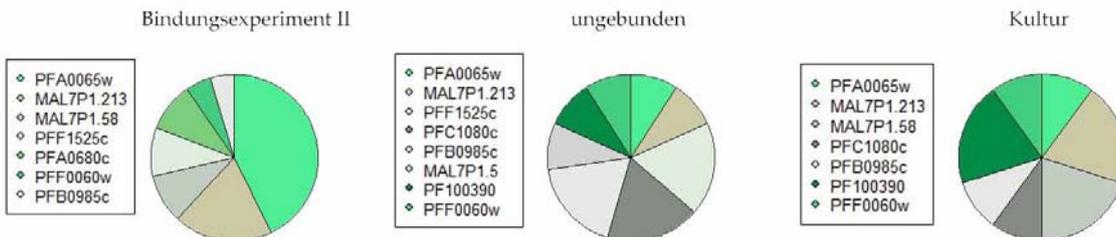


Abbildung 3.26: Sequenzverteilung der *pfmc2tm*-Transkripte adulter Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1 über zwei aufeinanderfolgende Generationen; Exp. 4.

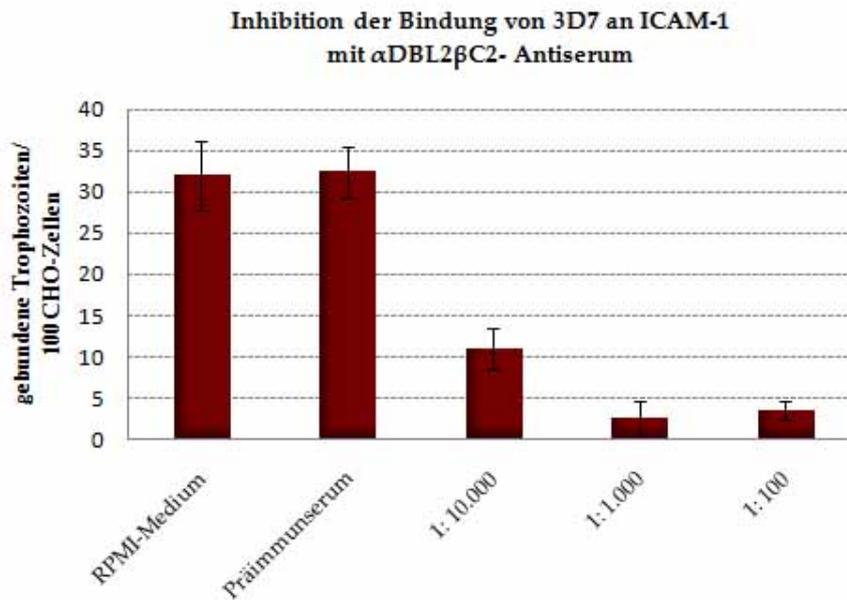


Abbildung 3.27: Inhibition der ICAM-1 Bindung mit  $\alpha$ DBL2 $\beta$ C2-Antiserum.

### 3.2.2.3 Inhibition der Bindung

Gegen die vom dominierend exprimierten Gen der ICAM-1 bindenden Parasitenpopulation, PF13\_0003, abgeleiteten rekombinanten DBL2 $\beta$ C2-Domäne wurden Antikörper generiert und mit 3D7 infizierten Erythrozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $\alpha$ DBL2 $\beta$ C2-Antiserum vor dem Bindungsexperiment inkubiert. Es wurden wiederum jeweils 500 Zellen ausgezählt.

In den Kontrollen ohne Antiserum und mit Präimmunsereum banden 32 respektive 32,4 parasitierte Erythrozyten pro 100 CHO-Zellen. Die Zugabe von Antiserum in einer Konzentration von 1:10000 verringerte die Anzahl der gebundenen infizierten Erythrozyten auf elf. Eine Erhöhung der Konzentration auf 1:1000 bewirkte eine weitere Verringerung auf 2,4 Zellen pro 100 CHO-Zellen, in Gegenwart von  $\alpha$ DBL2 $\beta$ C2-Antiserum in einer Konzentration von 1:100 wurden im Durchschnitt 3,4 gebundene parasitierte rote Blutkörperchen pro 100 CHO-Zellen gezählt.

Die Bindung infizierter Erythrozyten an ICAM-1 ließ sich also mit einem gegen die DBL2 $\beta$ C2-Domäne von PF13\_0003 gerichteten Antikörper spezifisch hemmen.

### 3.2.3 Bindungsexperimente mit dem Patientenisolat BNI151209 an ICAM-1

Das Patientenisolat BNI151209 wurde über vier Wochen kultiviert, bevor es über zwei aufeinanderfolgende Parasitengeneration an eine ICAM-1 exprimierende CHO-Zelllinie gebunden wurde. Es wurden jeweils 500 CHO-Zellen mit den an sie gebundenen infizierten Erythrozyten ausgezählt.

### 3.2.4 Bindungsexperiment

32 h Trophozoiten BNI151209, gebunden an ICAM-1			
	Parasiten/100 CHO-Zellen	Standardabweichung	gebundene Parasiten gesamt [%]
1. Präabsorption (I)	25,2	5,85	5,1
Panning I	19,2	3,97	4
1. Präabsorption (II)	11,8	2,79	3,3
Panning II	41,4	6,9	17,11

Tabelle 3.17: Auszählung der BNI151209-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1.

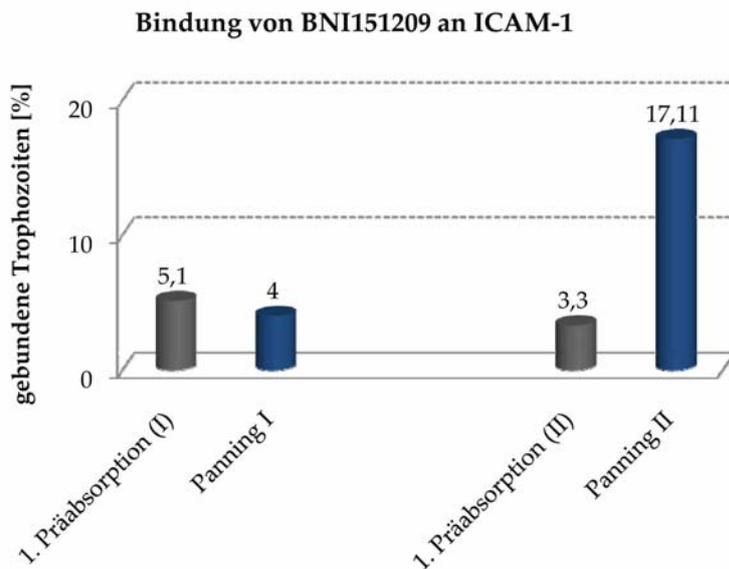


Abbildung 3.28: Auszählung der BNI151209-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1.

Das in Gegenwart von 4 % humanem Serum kultivierte Patientenisolat band zu 5,1 % in der ersten (1. Präabsorption), zu 3,3 % in der zweiten Parasitengeneration (2. Präabsorption) an die Kontroll-CHO-Zelllinie. Die Parasitenpopulation mit ICAM-1 Bindungskapazität ließ sich von 4 % auf 17,11 % anreichern (Abbildung 3.28).

### 3.2.4.1 Expressionsanalysen

Die Genexpression der Multigenfamilien wurde acht beziehungsweise 28 Stunden nach Reinfektion der Erythrozyten jeweils für die Parasitenpopulationen der Generationen des ersten wie des zweiten Bindungsexperiments, die über ICAM-1 Bindungskapazität verfügten und für die Kontrollpopulationen derer ohne Bindungskapazität und derer, die dem Experiment nicht unterzogen wurden, analysiert. In den jungen Ringstadien der Parasiten, die an ICAM-1 banden, waren in der ersten wie in der zweiten Generation *var*-Gene der Gruppe A exprimiert. Ein Transkript dominierte die anderen in der Anzahl der Sequenzen, in der ersten Generation bildete es 33,3 % aller Sequenzen, in der zweiten Generation 40 %. Die Transkripte 2 und 3, die in der ersten Generation zu 27,78 % und 22,22 % vertreten waren, wurden in der zweiten Generation zu 25 % respektive 10 % gefunden (siehe Tabelle 3.18). In den adulten Trophozoiten wurden zusätzlich zu den den *var* A Transkripten solche der *stevor*-Familie gefunden, hier dominierte ein Transkript in der ersten Parasitengeneration zu 47,06 %, in der zweiten lag es auf 57,9 % angereichert vor. Transkript 2 machte in beiden Generationen ungefähr ein Viertel der Sequenzen aus. In den Kontrollpopulationen waren diverse Gene aller untersuchten Familien exprimiert.

Genexpression BNI151209, gebunden an ICAM-1							
				Sequenzen			
Parasitenpopulation	Multigenfamilie	Untergruppe	Expression	Anzahl (n)	Nummer	Verteilung (%)	
Panning I	8 h Ringe	<i>var</i>	A	√	18	1	33,3
						2	27,78
						3	22,22
				4		5,56	
				5		5,56	
				6		5,56	
		B	n. e.				
	C	n. e.					
	<i>rif</i>	A	n. e.				
		B	n. e.				
	<i>stevor</i>		n. e.				
	<i>pfmc2tm</i>		n. e.				
	28 h Trophozoiten	<i>var</i>	A	√	n.a.		
			B	n. e.			
C			n. e.				
<i>rif</i>		A	n. e.				
		B	n. e.				
<i>stevor</i>			√	17		1	47,06
			2			17,65	
		3	11,75				
		4	5,88				
		5	5,88				
		6	5,88				
		7	5,88				
<i>pfmc2tm</i>		n. e.					
Panning II	8 h Ringe	<i>var</i>	A	√	20	1	10
						2	25
						7	10
				4		5	
				5		5	
				6		5	
				8		5	
			9	5			
	B	n. e.					
	C	n. e.					
	<i>rif</i>	A	n. e.				
		B	n. e.				
	<i>stevor</i>		n. e.				
	<i>pfmc2tm</i>		n. e.				
28 h Trophozoiten	<i>var</i>	A	√	n. a.			
		B	n. e.				
		C	n. e.				
	<i>rif</i>	A	n. e.				
		B	n. e.				
	<i>stevor</i>		√		19	1	57,9
			3			26,32	
		4	10,53				
		8	5,26				
<i>pfmc2tm</i>		n. e.					

n. e.: nicht exprimiert; n. a.: nicht analysiert

Genexpression BNI151209, gebunden an ICAM-1													
Parasitenpopulation					Sequenzen								
		Multigenfamilie	Untergruppe	Expression	Anzahl (n)	Nummer	Verteilung (%)						
ungebunden	8 h Ringe	<i>var</i>	A	√	10	2	10						
						4	10						
						5	10						
						6	10						
						7	10						
						8	10						
				B	√		n. a.						
			<i>stevor</i>		√		n. a.						
			<i>pfmc2tm</i>		√		n. a.						
		28 h Trophozoiten	<i>var</i>	A	√								
	B			√									
				<i>stevor</i>		√	12	2	8,33				
								3	16,67				
							5	8,33					
							7	16,67					
							9	8,33					
							10	8,33					
						11	8,33						
						12	8,33						
						13	8,33						
						14	8,33						
		<i>pfmc2tm</i>		√		n. a.							
Kultur	8 h Ringe	<i>var</i>	A	√		1	10						
						2	10						
						4	10						
						5	10						
						6	10						
						8	10						
						9	10						
						11	10						
						12	10						
						13	10						
									B	√		n. a.	
									C	√		n. a.	
								<i>rif</i>	A	√		n. a.	
				B	√		n. a.						
			<i>stevor</i>		√		n. a.						
			<i>pfmc2tm</i>		√		n. a.						
		28 h Trophozoiten	<i>var</i>	A	√								
	B			√									
	C			√									
				<i>rif</i>	A	√		n. a.					
				B	√		n. a.						
			<i>stevor</i>		√	12	1	8,33					
							3	8,33					
						5	8,33						
						7	8,33						
						9	8,33						
						10	8,33						
						11	8,33						
						12	8,33						
						13	8,33						
						14	8,33						
						15	8,33						
						16	8,33						
		<i>pfmc2tm</i>		√		n. a.							

n. e.: nicht exprimiert; n. a.: nicht analysiert

Tabelle 3.18: Genexpressionsprofil der BNI151209 Ringstadien und adulten Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1 über zwei aufeinanderfolgende Generationen.

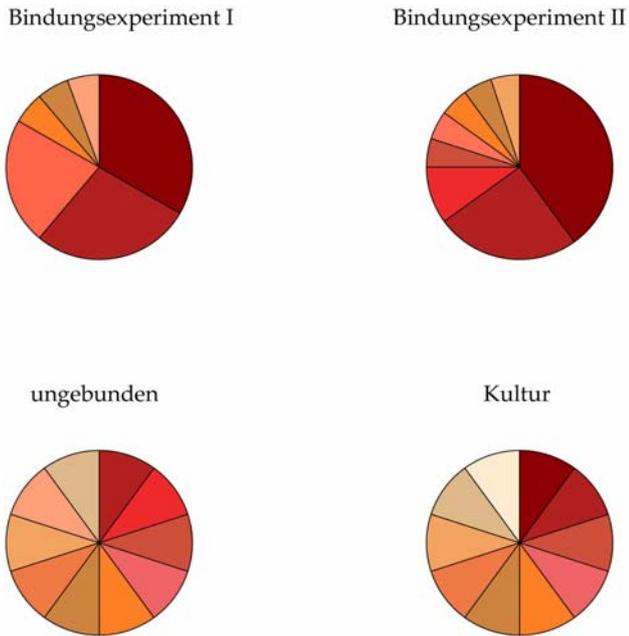


Abbildung 3.29: Sequenzverteilung der *varA*-Transkripte von BNI151209 nach Bindung an ICAM-1 über zwei aufeinanderfolgende Generationen.

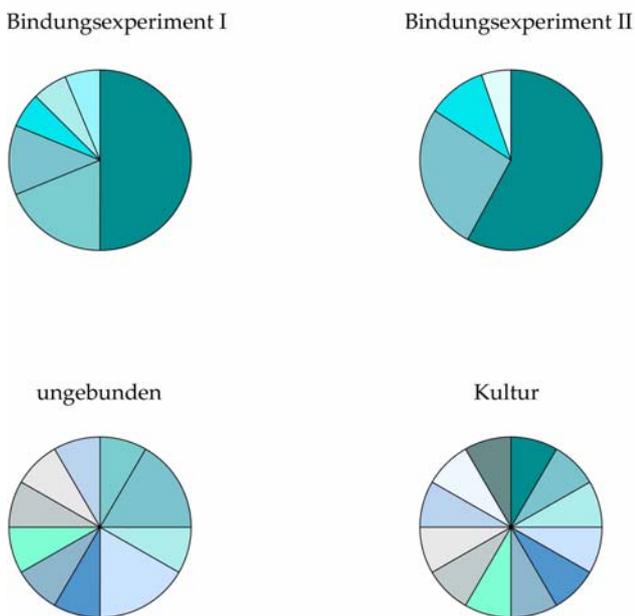


Abbildung 3.30: Sequenzverteilung der *stevor*-Transkripte von BNI151209 nach Bindung an ICAM-1 über zwei aufeinanderfolgende Generationen.

### 3.3 Bindungsexperimente mit rekombinalem Protein

24 PfEMP1-Domänen des Kulturstammes 3D7 wurden für Bindungsexperimente am Schwingquarz rekombinant exprimiert und renaturiert (vgl. 2.2.15). Es wurden DBL $\beta$ -Domänen, in Kombination mit und ohne der C-terminal anschließenden C2-Domäne sowie diverse Kontrolldomänen der *var*-Gengruppen A, B und C für die Bindung an die Endothelrezeptoren ICAM-1 und CD36 ausgewählt. Abbildung 3.31 zeigt alle rekombinant exprimierten Domänen im Schema. Die rekombinanten Proteine waren in einer Ausgangskonzentration von 1 mg/mL in Puffer D gelöst und wiesen Größen zwischen 17 und 35 kDa auf.

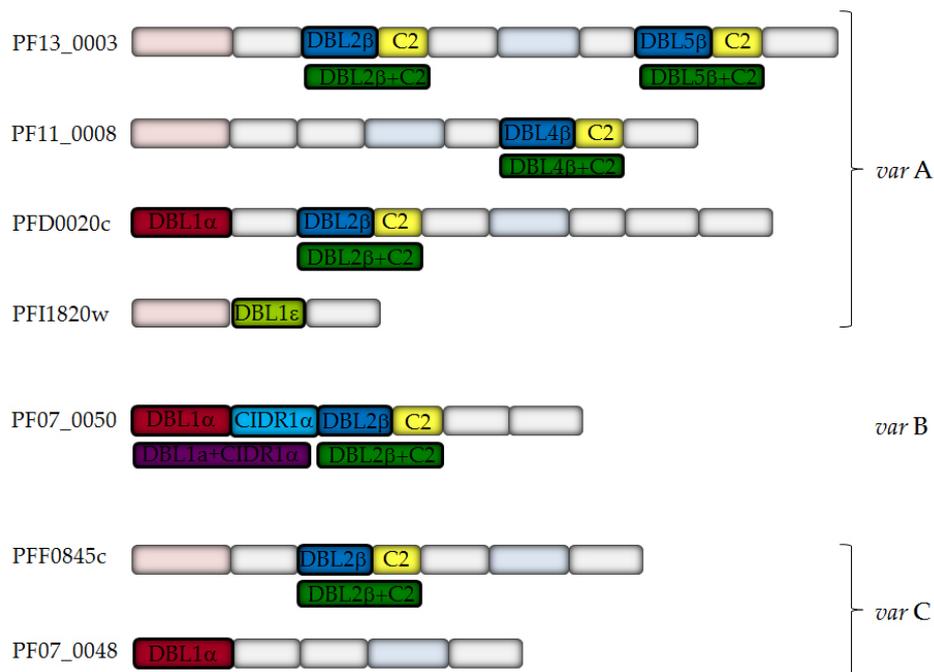


Abbildung 3.31: Rekombinante PfEMP1-Domänen.

#### 3.3.1 PF07\_0050\_CIDR1 $\alpha$ bindet an CD36

Isolierte CHO-Zellmembranen mit oberflächenständigem Endothelrezeptor CD36 wurden an den Schwingquarz gekoppelt (vgl. 2.2.21) und rekombinante Proteindomänen, abgeleitet vom Gen PF07\_0050, in unterschiedlichen Konzentrationen darüber geleitet.

Rekombinantes DBL1 $\alpha$  sowie DBL2 $\beta$ , jeweils in Konzentrationen von 100  $\mu$ g/mL, wiesen keine Bindungskapazität an CD36 auf. CIDR1 $\alpha$  hingegen interagierte in der gleichen Proteinkonzentration mit dem CD36-Rezeptor, die Bindung bewirkte einen Frequenzabfall um 65 Hz. In einem nächsten Versuch wurde der Bindungsnachweis von CIDR1 $\alpha$  (100  $\mu$ g/mL) wiederholt und im Anschluss auf den selben Quarz rekombinantes CIDR1 $\alpha$  einer Konzentration von 1 mg/mL geleitet, was zu einem weiteren Frequenzabfall um 288 Hz führte.

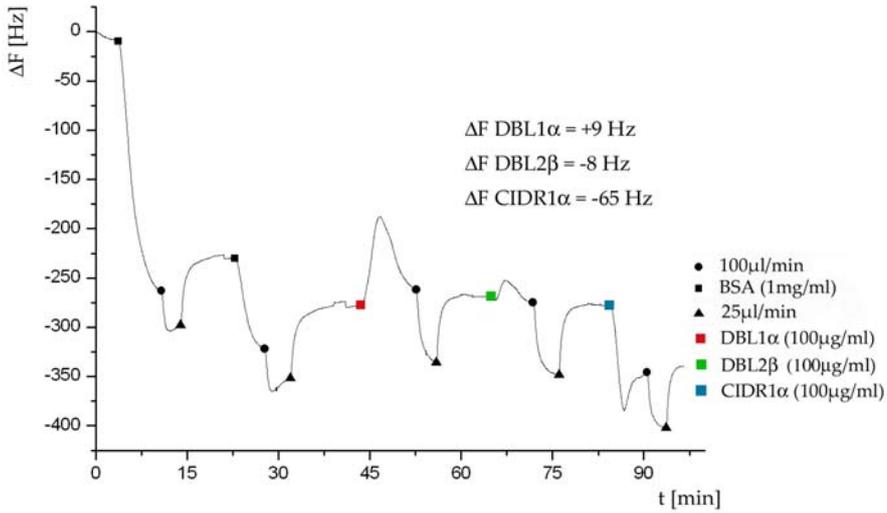


Abbildung 3.32: Bindung von PF07\_0050\_DBL1 $\alpha$ , PF07\_0050\_DBL2 $\beta$  und PF07\_0050\_CIDR1 $\alpha$  an CD36.

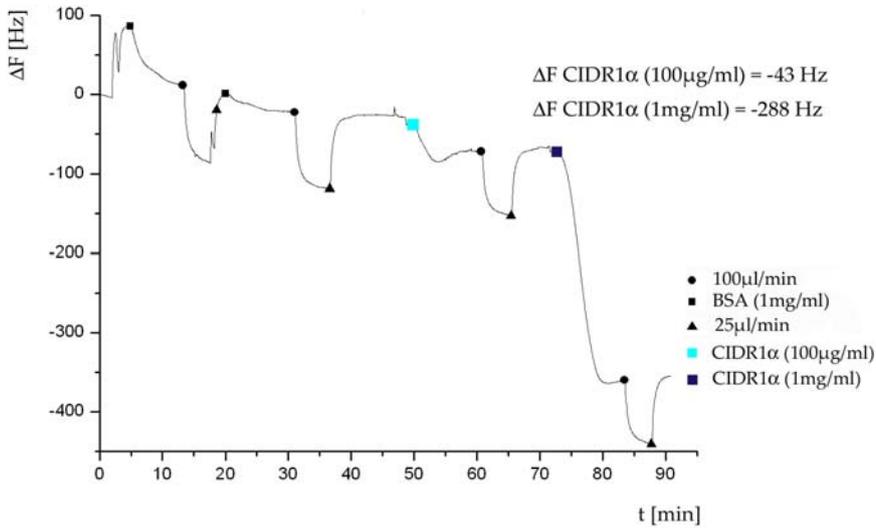


Abbildung 3.33: Bindung von PF07\_0050\_CIDR1 $\alpha$  an CD36 mit den Konzentrationen 100  $\mu\text{g/mL}$  und 1  $\text{mg/mL}$ .

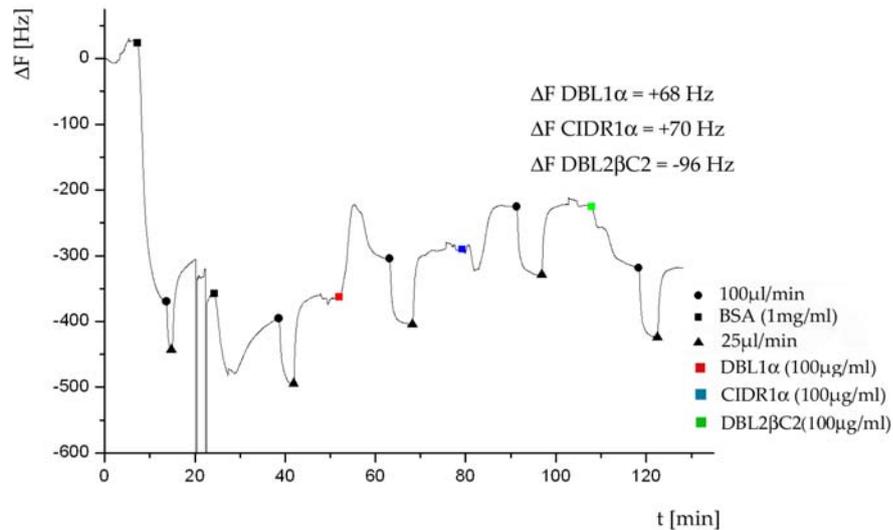


Abbildung 3.34: Bindung von PF07\_0050\_DBL1 $\alpha$ , CIDR1 $\alpha$  und DBL2 $\beta$ C2 an ICAM-1.

### 3.3.2 Bindung an ICAM-1

Im Folgenden wurde die Bindung unterschiedlicher PfEMP1-Domänentypen an den Endothelrezeptor ICAM-1 getestet.

Die von dem der *var*-Gengruppe *B* zugehörigen PF07\_0050 abgeleiteten PfEMP-1-Domänen DBL1 $\alpha$ , CIDR1 $\alpha$  und DBL2 $\beta$ C2 wurden in einer Proteinkonzentration von 100  $\mu$ g/mL nacheinander über den auf CHO-Zellmembranen exprimierten ICAM-1 Rezeptor geleitet. Wie der Abbildung 3.34 zu entnehmen, band PF07\_0050\_DBL2 $\beta$ C2 mit einer relativen Bindungsstärke von 96 Hz. DBL1 $\alpha$  und CIDR1 $\alpha$  wiesen keine Bindungskapazität auf, sie führten dagegen zu einer Zunahme der Resonanzfrequenz; dieses als *positive mass effect* bekannte Phänomen ist auf eine Viskositätsänderung der Lipid-Doppelschicht zurückzuführen.

#### 3.3.2.1 DBL1 $\alpha$ bindet nicht an ICAM-1

Die Bindung rekombinanter DBL1 $\alpha$ -Domänen, abgeleitet von je einem Vertreter der *var*-Gengruppen *A*, *B* und *C*, wurde jeweils in den Konzentrationen 100  $\mu$ g/mL und 1 mg/mL getestet. Keiner der Domänen in unterschiedlichen Verdünnungen konnte eine Bindungskapazität an den Endothelrezeptor ICAM-1 nachgewiesen werden. In Abbildung 3.35 ist beispielhaft die über das Bindungsexperiment von PFD0020c\_DBL1 $\alpha$  hinweg aufgezeichnete Resonanzfrequenz des Schwingquarzsensors dargestellt.

#### 3.3.2.2 DBL1 $\epsilon$ bindet nicht an ICAM-1

Die rekombinante PFI1820w\_DBL1 $\epsilon$ -Domäne bindet bei keiner der getesteten Konzentrationen an ICAM-1. Das Ergebnis der mit 1 mg/mL höchsten eingesetzten Proteinkonzentration ist in

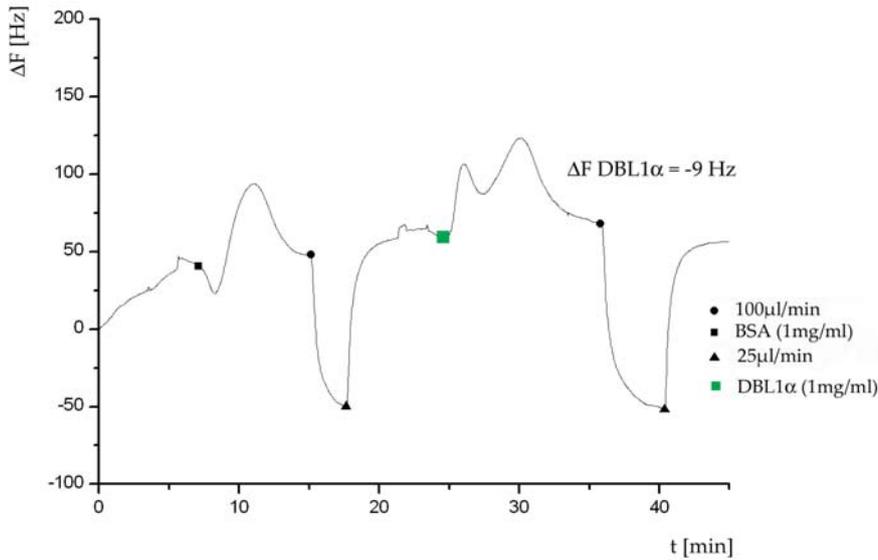
Abbildung 3.35: Bindung von PFD0020c\_DBL1 $\alpha$  an ICAM-1.

Abbildung 3.36 gezeigt. Mit einem Anstieg der Resonanzfrequenz um 62 Hz zeigte sich auch hier ein *positive mass effect*.

### 3.3.2.3 Wenige rekombinante DBL $\beta$ C2-Domänen binden ICAM-1

Wurden die rekombinanten DBL $\beta$ -Domänen ohne die an sie C-terminal anschließende C2-Domäne für die Bindungsexperimente eingesetzt, konnte mit keiner der sechs aus den *var*-Gengruppen A, B und C abgeleiteten Domänen (siehe Abbildung 3.31) eine Bindung an ICAM-1 gezeigt werden. Auch die jeweiligen C2-Domänen allein zeigten keine Bindung; beispielhaft ist dies für die Proteindomänen PFD0020c\_DBL2 $\beta$  und PFF0845c\_C2 in den Abbildungen 3.37 und 3.38 gezeigt. Wurden die rekombinanten DBL $\beta$ -Domänen in Kombination mit C2 für das Bindungsexperiment eingesetzt, so zeigten die Proteine PF13\_0003\_DBL5 $\beta$ C2, PFD0020c\_DBL2 $\beta$ C2 und PFF0845c\_DBL2 $\beta$ C2 keine Interaktion mit ICAM-1 (beispielhaft in Abbildung 3.39 dargestellt). PF11\_0008\_DBL4 $\beta$ C2 und PF07\_0050\_DBL2 $\beta$ C2 konnte mit relativen Bindungsstärken von ca. 150 Hz bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL und ca. 90 Hz bei einer Konzentration von 100  $\mu$ g/mL eine leichte Bindung an ICAM-1 nachgewiesen werden (Abbildung 3.40 wie auch 3.34).

PF13\_0003\_DBL2 $\beta$ C2 zeigte bei einer Proteinkonzentration von 100  $\mu$ g/mL mit einer relativen Bindungsstärke von 181 Hz, respektive 781 Hz bei einer Konzentration von 1 mg/mL die vergleichsweise stärkste Interaktion mit ICAM-1.

Die relative Bindungsstärke der PF13\_0003\_DBL2 $\beta$ C2-Domäne an ICAM-1 wurde unter den Proteinkonzentrationen 25  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 75  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL und 1 mg/mL getestet.

Im Konzentrationsbereich von 25  $\mu$ g/mL bis 100  $\mu$ g/mL stieg die relative Bindungsstärke steil an und schien bei 1 mg/mL in den Sättigungsbereich zu gelangen.

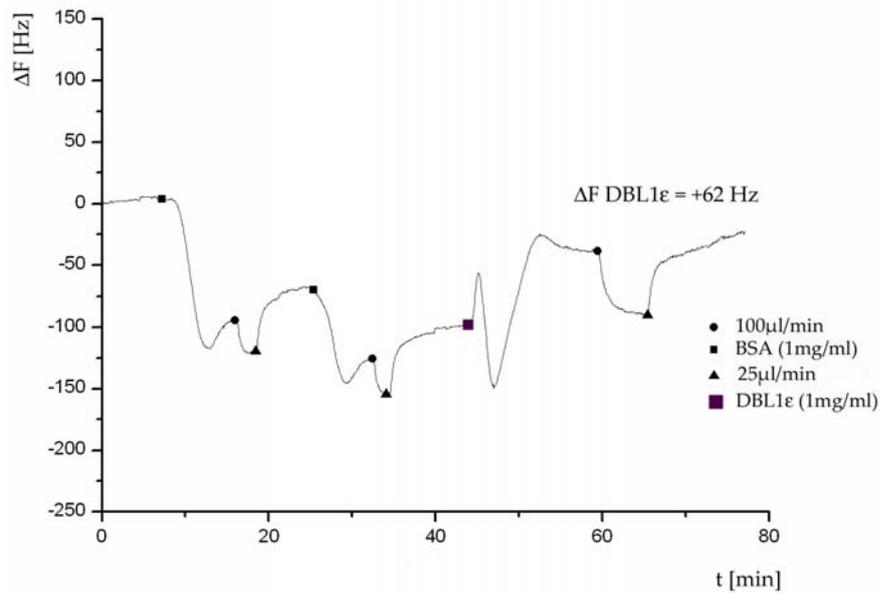


Abbildung 3.36: Bindung von PFI1820w\_DBL1ε an ICAM-1.

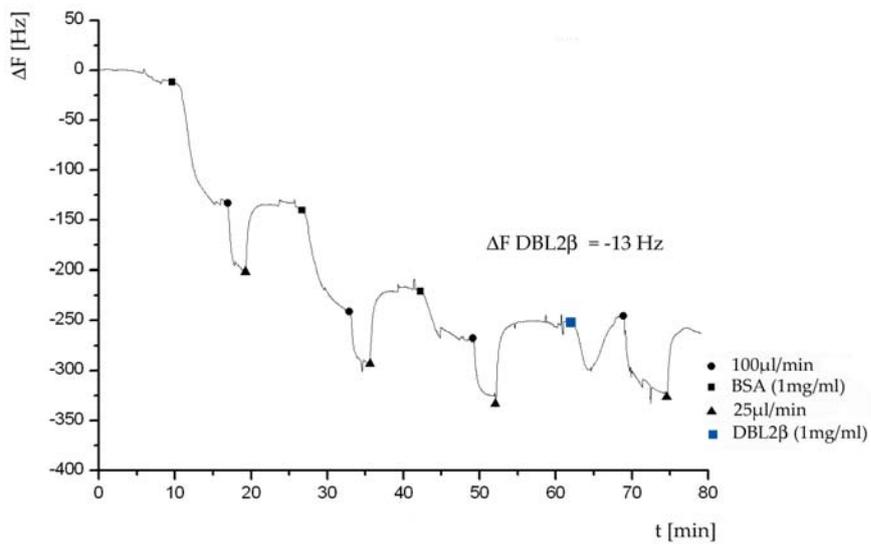


Abbildung 3.37: Bindung von PFD0020c\_DBL2β an ICAM-1.

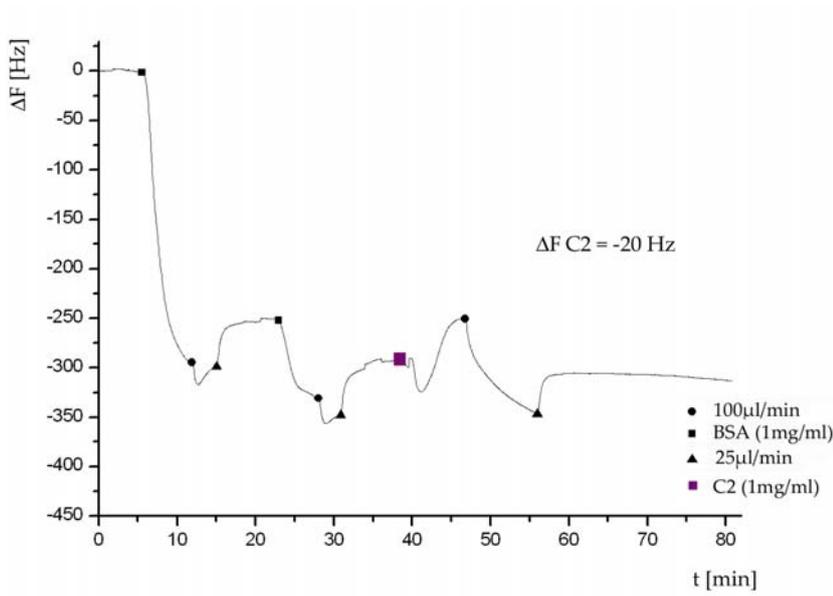


Abbildung 3.38: Bindung von PFF0845c\_C2 an ICAM-1.

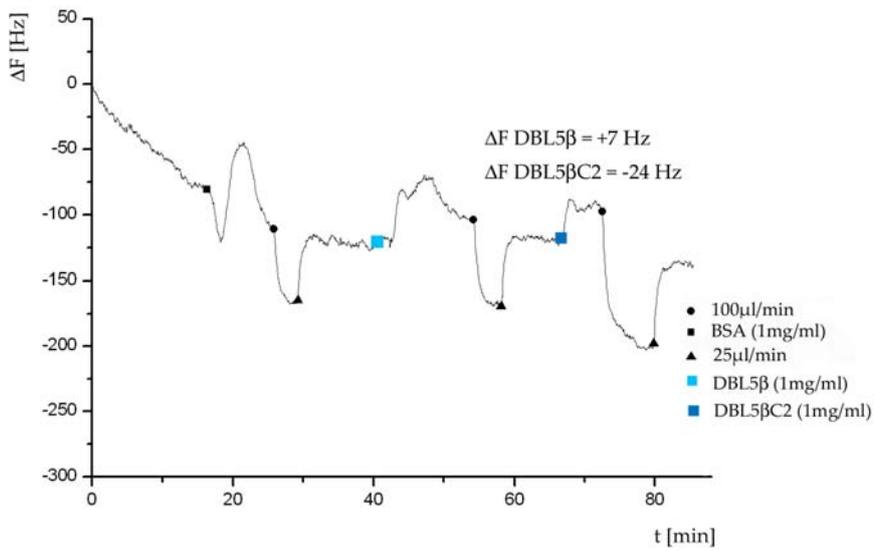


Abbildung 3.39: Bindung von PF13\_0003\_DBL5βC2 an ICAM-1.

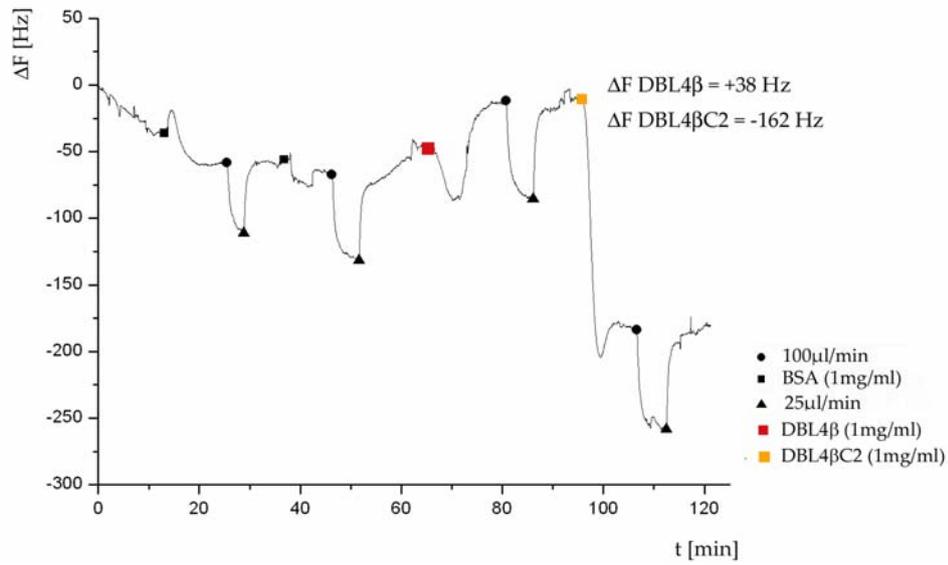


Abbildung 3.40: Bindung von PF11\_0008\_DBL4 $\beta$ C2 an ICAM-1.

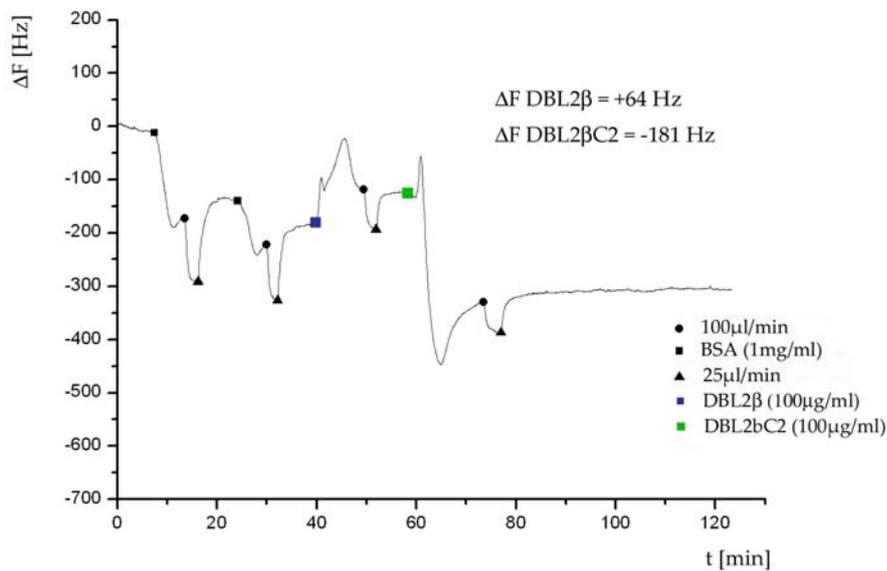


Abbildung 3.41: Bindung von PF13\_0003\_DBL2 $\beta$ C2 an ICAM-1 (100  $\mu$ g/mL).

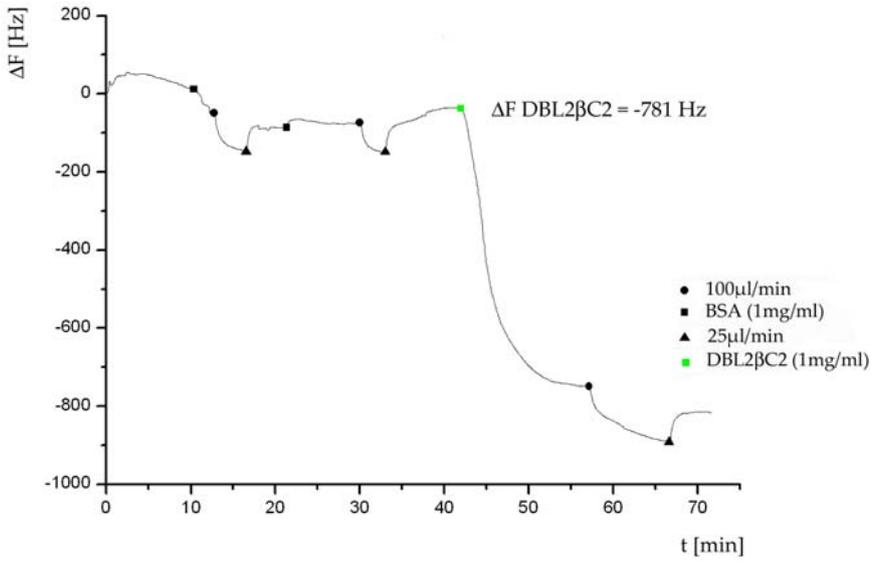


Abbildung 3.42: Bindung von PF13\_0003\_DBL2βC2 an ICAM-1 (1 mg/mL).

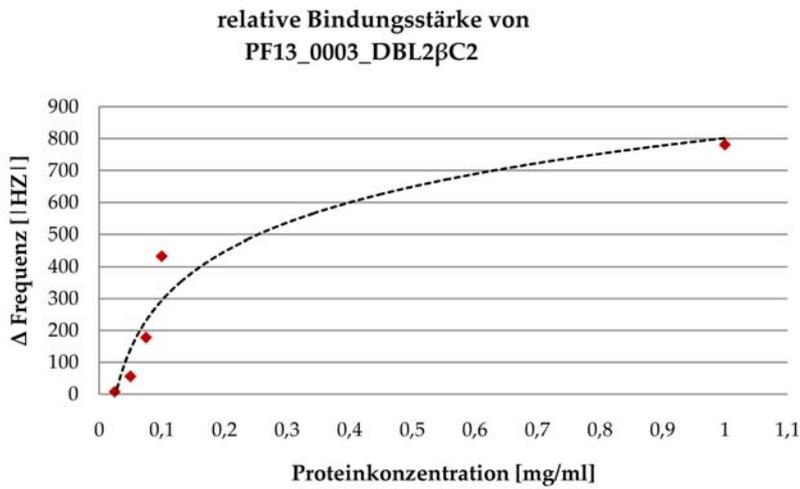


Abbildung 3.43: relative Bindungsstärke von PF13\_0003\_DBL2βC2 an ICAM-1 in Abhängigkeit der Proteinkonzentration.

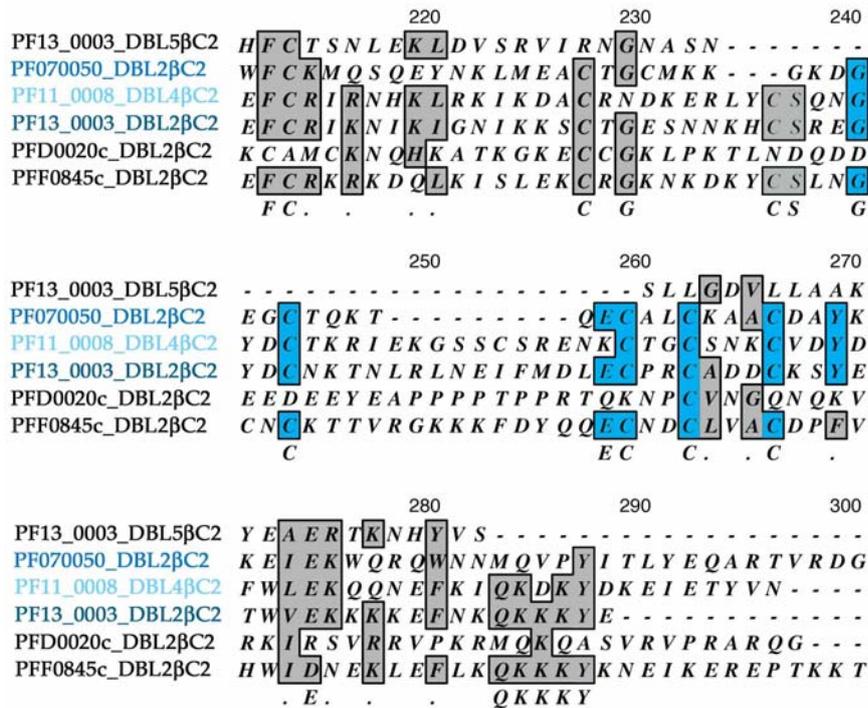


Abbildung 3.44: Ausschnitt des *Clustal W Alignments* der sechs auf ihre Bindung getesteten DBL2βC2-Domänen.

dunkelblau: starker Binder; mittel-/hellblau: schwacher Binder; schwarz: keine Bindungskapazität; Aminosäuren, die an der ICAM-1 Interaktion beteiligt sein könnten, sind blau dargestellt.

Um ein Motiv für die unterschiedlichen Bindungskapazitäten der sechs getesteten DBLβC2-Domänen zu finden, wurden ihre Aminosäuresequenzen miteinander verglichen. Das *Alignment* wurde mit *Clustal W* berechnet und ist ausschnittsweise in Abbildung 3.44 dargestellt.

Die Domänen mit Bindungskapazität haben ein Glycin, vier Cysteine, ein Glutamat und ein Tyrosin gemeinsam und unterscheiden sich darin von den nicht bindenden Domänen, wobei PFF0845c\_DBL2βC2 eine Ausnahme darstellt, da für diese Domäne, obwohl sie über diese Aminosäurereste verfügt, keine Bindungskapazität nachgewiesen werden konnte. Ggesetzt den Fall, dass diese Aminosäuren für die Interaktion mit ICAM-1 verantwortlich sind, ergibt sich folgendes Sequenzmotiv:





# Kapitel 4

## Diskussion

Die hohe Pathogenität von *Plasmodium falciparum* ist auf seine Fähigkeit zur Sequestrierung zurückzuführen. Vermittelt wird die Bindung ans Wirtsendothel unter anderem durch das Oberflächenprotein PfEMP1. Um dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen, nutzt der Parasit die Strategie der Antigenen Variation, der Wechsel des präsentierten Proteins wird durch einen Transkriptionswechsel der *var*-Gene vollzogen. Der molekulare Mechanismus dieser für die Persistenz im Wirt wichtigen Funktion ist kaum verstanden.

### 4.1 Antigene Variation

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden 20 *P. falciparum*-Isolate aus nicht-immunen Patienten über mehrere Generationen auf ihre *var*-Genexpression überprüft. Dabei sollte analysiert werden, i) wie viele Gene der drei *var*-Gengruppen *A*, *B* und *C* in einer Parasitenpopulation exprimiert werden und ob ii) die Expression über die Generationen konstant bleibt oder ob ein *Switching* beobachtet werden kann. Desweiteren sollte geklärt werden, ob iii) die Expressionswechsel mit einem Wechsel der präsentierten Proteine einhergehen.

#### 4.1.1 Innerhalb einer Parasitenpopulation wird ein Gen dominant exprimiert

In allen untersuchten Isolaten, die maximal zwei genetische *P. falciparum*-Varianten beinhalteten, konnten Transkripte der Gruppe *A var*-Gene detektiert werden, wobei die Gruppen *B* und *C* nicht in allen Fällen exprimiert wurden. Hierbei wurde jeweils hauptsächlich ein Transkript gefunden; entweder blieb es über die analysierten Generation stabil oder wechselte mit der Generation. Da diese Ergebnisse das Produkt ganzer Zellpopulationen - und nicht einzelner Zellen - sind, lässt sich schließen, dass die *var*-Genexpression hoch organisiert verläuft, da fast alle Parasiten einer Population das gleiche Gen exprimieren, selbst wenn die Expression mit der Generation wechselt. Diese Beobachtung der stringenten *var*-Genexpression konnte auch von Kaestli et al. gemacht werden [64]. In ihrer Studie fanden sie lediglich ein dominantes DBL1 $\alpha$ -Transkript pro genetischer Variante in Parasitenpopulationen, die aus infizierten Kindern eines malariaendemischen Gebietes

isoliert worden waren. Über ihre viermonatige Studiendauer stellten sie in verschiedenen Genen unterschiedliche Wechselraten fest; so wechselte die Expression mancher *var*-Gene schnell, andere blieben über Wochen stabil.

#### 4.1.2 Gruppe A *var*-Gene *switchen* schneller als solche der Gruppen B und C

Erstmalig wurde die detaillierte Analyse der *var*-Genexpression von Parasitenpopulationen mit größtenteils nur einer genetischen Variante unmittelbar nach Isolierung aus Wirtsblut sowie über sukzessive *in vitro*-Generationen in dieser Arbeit durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass Gene der Gruppe A Wechselraten von bis zu 100 % besitzen. In den schnell *switchenden* Isolaten waren oftmals nur Gene der Gruppe A exprimiert, blieb die Genexpression konstant, waren es zumeist alle drei Gengruppen. Wie anhand der beiden schnell *switchenden* Isolate 12 und 19 gezeigt werden konnte, geht im Laufe der Kultivierung eine disperser werdende Expression aller Gengruppen mit einer sinkenden *Switchingrate* einher. Dieses Phänomen macht Immunelektionsdruck als Voraussetzung einer stringenten *var*-Genexpression mit hohen *Switchingraten* wahrscheinlich und erklärt die Diskrepanz zwischen den *Switchingraten*, die aus *in vivo*- und *in vitro*-Daten gewonnen wurden. So stellten Roberts et al. fest, dass sich adhäsive Eigenschaften langzeitkultivierter Isolate mit Raten von 2,4 % ändern [62]. Andererseits fanden Peters et al. gravierende Unterschiede in der *var*-Genexpression während und nach der Passage durch mit dem Kulturisolat 3D7 experimentell infizierter Patienten. Aufgrund ihrer Beobachtungen postulierten sie - während der akuten Phase der Infektion - *Switchingraten* von mindestens 16 % [51].

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass Gene der Gruppe A grundsätzlich höhere Wechselraten haben als solche der Gruppen B und C; sie werden durch verschiedene Studien unterstützt, die fanden, dass telomer lokalisierte Gene der Gruppe A schneller *switchen* als zentromer lokalisierte Gene der Gruppe C und auch als solche der Gruppe B, obwohl auch sie telomer bzw. subtelomer lokalisiert sind [51, 52, 31, 72]. Die Wechselgeschwindigkeit von *var*-Genen wird nicht nur durch ihre AN-, sondern auch durch ihre AUS-Raten bestimmt; diese scheinen eine intrinsische Eigenschaft des jeweiligen Gens zu sein [31]. Dem gemäß wurde in dieser Studie bei allen über einen längeren Zeitraum kultivierten Isolaten eine konstante, disperse Expression der Gruppe B- und C-Gene beobachtet. Die präferierte Expression dieser Gene nach Kultivierung konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden [73, 72, 74].

#### 4.1.3 *Switching* der Genexpression führt zum Präsentationswechsel vom PfEMP1

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen dem Wechsel der *var*-Genexpression und dem Wechsel des an der Erythrozytenoberfläche präsentierten Proteins herzustellen. Durch Immunfluoreszenzanalysen konnte das Produkt des acht Stunden nach Infektion exprimierten Gens nach 24 Stunden auf der Erythrozytenoberfläche detektiert werden. Da dies für zwei Generationen in denen die Expression des *var A*-Gens wechselte gezeigt werden konnte, war es gelungen, das *Switching* nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern

auch auf Proteinebene nachzuweisen. Aufgrund des immensen Zeit- und Kostenaufwandes konnte dies lediglich am Beispiel des Patientenisolates 19 durchgeführt werden.

#### 4.1.4 Modell

*P. falciparum* entgeht durch den regelmäßigen Wechsel der an der Erythrozytenoberfläche präsentierten Antigene dem Immunsystem des Wirtes. In der akuten Phase der Infektion sind hohe *Switching*raten insofern plausibel, als sie dem Parasiten ungehinderte Vermehrung und damit die Etablierung im Wirt gewährleisten. Aufgrund empirischer Beobachtungen und theoretischer Überlegungen wurde ein mathematisches Modell entwickelt, das *var*-Wechselraten von mindestens 18 % in der frühen Phase der Infektion postuliert [51, 63]. Diese Funktion wäre durch die telomer gelegenen, schnell *switchenden var A*-Gene erfüllt; je schneller die Präsentation eines Antigens wechselt, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, vom Immunsystem erkannt zu werden, desto schneller ist aber andererseits das Repertoire an *var*-Genen und seinen Produkten erschöpft. Für die Persistenz im Wirt müsste also die *Switching*rate über einen längeren Zeitraum abnehmen. Möglicherweise spielen hierfür die Genprodukte der Gruppe *B* und vor allem *C* eine Rolle, die sich durch langsamere Aus-Raten auszeichnen. Bei diesen Überlegungen muss bedacht werden, dass jedes präsentierte Antigen Bindungseigenschaften ans Wirtsendothel aufweisen muss; anderenfalls würde der Parasit durch die Milz eliminiert - unabhängig von hohen oder niedrigen Wechselraten. In der Situation *in vivo* gibt es einen Selektionsdruck auf die Expression bewährter Bindungstypen, und somit - auf Dauer - gegen hohe *Switching*raten. Die hohen *var*-Wechselraten der Gruppe *A*-Gene zu Beginn der Infektion und die Tendenz zur Expression langsam *switchender* Gruppe *C*-Gene sind somit offenbar die Resultante aus optimaler Immunevasion und Aufrechterhaltung von Bindungskapazität.

## 4.2 Zytoadhärenz

*P. falciparum* ist als einziger der humanpathogenen Erreger zur Sequestrierung befähigt; die Kenntnis über die Bindungspartner dieser Interaktion zwischen parasitärem Protein und Wirtsendothelrezeptor ist die Voraussetzung dafür, diese Bindung blockieren zu können.

### 4.2.1 Bindungsexperimente mit infizierten Erythrozyten

Die Bindung infizierter Erythrozyten an den Hirnendothelrezeptor ICAM-1 ist mit den Komplikationen einer zerebralen Malaria assoziiert [6, 7]. Mit *Rx* wurde kürzlich ein neuer, auf Endothelzellen des Gehirns exprimierter Rezeptor identifiziert, an den infizierte Erythrozyten binden können. Im Gegensatz zu ICAM-1, über dessen Interaktion mit PfEMP1-Molekülen mehrere - mitunter widersprüchliche - Daten vorliegen, ist über den Liganden auf Seiten des Parasiten in Bezug auf *Rx* nichts bekannt.

In diesem Teil der Arbeit sollten die Interaktionspartner infizierter Erythrozyten mit den Hirnendothelrezeptoren ICAM-1 und *Rx* identifiziert werden, indem die Bindungseigenschaften in Zusammenhang mit den Expressionsprofilen der variablen Oberflächenantigene gestellt wurden. Hierfür

wurde eine Methode etabliert, in der infizierte Erythrozyten über zwei Parasitengenerationen an den Endothelrezeptor gebunden wurden, um die Bindungscharakteristika mit der Genexpression variabler Oberflächenantigene innerhalb einer Parasitengeneration über zwei erythrozytäre Zyklen hinweg miteinander vergleichen zu können.

#### 4.2.1.1 Bindung an *Rx*

Die Bindung an den erst kürzlich als Interaktionspartner für infizierte Erythrozyten identifizierten Rezeptor *Rx* wurde in diesem Versuchsteil erstmalig näher charakterisiert.

***var*-Genprodukte scheinen nicht an der Bindung an *Rx* beteiligt zu sein** Das Kulturisolat 3D7 wurde an den Endothelrezeptor *Rx* gebunden und die Expression der *var*-Gene in jungen Ringstadien untersucht. Da *var*-Gene aller drei Gruppen inaktiviert vorlagen, scheint eine Beteiligung von PfEMP1 an der Bindung an *Rx* unwahrscheinlich. Da sich die Inaktivierung auch auf die darauffolgende Generation erstreckte und die Gruppen danach sukzessive aktiviert wurden - Gruppe C-Transkripte waren ab der dritten, Gruppe A und B Transkripte ab der sechsten Generation nach dem Bindungsexperiment detektierbar (Tabelle 3.4) - scheint die Expression der *var*-Gene streng reguliert zu sein. Die Gene der *rif*-, *stevor*- und *pfmc2tm*-Familie wurden in jungen Ringstadien derer Parasiten mit Bindungskapazität bis einschließlich der achten Generation nach dem Bindungsexperiment nicht exprimiert; es ist bekannt, dass die Transkription der 2TM-Superfamilie im Trophozoitenstadium stattfindet [46, 47, 48], jedoch konnte auch ein Expressionsfenster wenige Stunden nach Infektion nachgewiesen werden (A. Bachmann, unveröffentlichte Daten). Die Ergebnisse sind denen dieser Arbeit analog: In den Kontrollpopulationen der ICAM-1 Bindungsexperimente waren in jungen Ringstadien Gene der 2TM-Familie in disperser Verteilung exprimiert (siehe Tabellen 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 sowie 3.18). Während der Expressionsanalysen der jungen Ringstadien nach den *Rx*-Bindungsexperimenten wurden diese Kontrollen nicht durchgeführt (siehe Tabelle 3.4).

**Der Prozentsatz einer 3D7-Parasitenpopulation mit *Rx*-Bindungskapazität kann auf 33,7 % angereichert werden** 2,2 % der infizierten Erythrozyten im ersten, 1,3 % der infizierten Erythrozyten im zweiten Experiment banden in der ersten Generation an den Rezeptor *Rx* (Tabellen 3.5 und 3.7). Nachdem die Parasitenpopulation in der darauffolgenden Generation wiederum an *Rx* gebunden wurde, konnte der Prozentsatz der infizierten Erythrozyten mit Bindungskapazität auf 33,7 % gesteigert werden. Aufgrund der starken Anreicherung kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung der 3D7-Population an *Rx* spezifisch ist.

***pfmc2tm*-Genprodukte sind möglicherweise für die *Rx*-Bindung verantwortlich** In den 28 Stunden alten Trophozoiten der Generation nach den Bindungsexperimenten waren Gene der *pfmc2tm* sowie der *rifA*-Familie exprimiert. Während die Transkripte der letzteren über beide Generationen variabel verteilt waren, war das dominierende *pfmc2tm*-Transkript PF100390 in der ersten Generation zu 41,18 %, in der zweiten Generation zu 71,43 % vertreten (siehe Tabelle 3.2.1.2 sowie

Abbildungen 3.14 und 3.17). Die bevorzugte Expression dieses Transkripts und dessen Anreicherung gibt einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung seines Produktes an der Bindung an *Rx*; diese könnte durch Immunfluoreszenzanalysen und Inhibitionsversuche mit spezifischen Antikörpern gegen PF100390 bewiesen (oder widerlegt) werden. Auch müsste der genaue Zeitpunkt des ersten Auftretens des Transkriptes innerhalb eines Entwicklungszyklusses von *P. falciparum* bestimmt werden, da 28 Stunden nach Infektion die Bindung an den Rezeptor bereits vollzogen sein müsste. PfMC2TM-Proteine wurden - neben Lokalisation in der parasitophoren Vakuole und deren Membran [75, 48] - an der Erythrozytenoberfläche nachgewiesen [76]. Zwischen den beiden Transmembrandomänen liegt ein ca. 17 Aminosäuren langer, hypervariabler, extrazellulärer, *Loop* [76]; ob dieser Teil für eine Interaktion mit *Rx* ausreicht, muss überprüft werden. Es wird als unwahrscheinlich erachtet, dass *rif-A*-Genprodukte eine Rolle an der *Rx*-Bindung spielen, da sich die disperse Sequenzverteilung auch nach der zweiten Adhäsionsgeneration nicht ändert (siehe Tabelle 3.2.1.2 sowie Abbildungen 3.13 und 3.16).

#### 4.2.1.2 Bindungsexperimente an ICAM-1

In diesem Versuch wurde die Bindung an ICAM-1 unter Fließbedingungen untersucht.

**Der Prozentsatz einer 3D7-Parasitenpopulation mit ICAM-1-Bindungskapazität kann auf bis zu 79,6 % angereichert werden** In vier unabhängigen Bindungsexperimenten über zwei aufeinanderfolgende Parasitengenerationen konnte der Prozentsatz derer Parasiten mit Bindungskapazität von zwischen 1,57 % und 7,9 % in der ersten Adhäsionsgeneration auf zwischen 45,14 % und 79,6 % in der zweiten Adhäsionsgeneration angereichert werden (Abbildungen 3.18, 3.19, 3.20 und 3.21). Der Prozentsatz derer Parasiten, die in der Präabsorption an die Kontrollzelllinie banden, lag in den Experimenten 1 und 2 bei 24,3 % respektive 19,8 %, in den Experimenten 3 und 4 bei 9,6 % respektive 3,1 %. In den Experimenten 3 und 4 wurden die infizierten Erythrozyten unter Zugabe von 4 % humanem Serum kultiviert, da es Hinweise gibt, dass die effiziente Präsentation der PfEMP1-Proteine auf der Erythrozytenoberfläche die Gegenwart von Serum, und hierbei insbesondere Lipoprotein niedriger Dichte (LDL), bedarf [77]. Die deutlich niedrigeren Präabsorptionswerte in diesen Experimenten werden einerseits auf eine Absättigung der Bindungsstellen auf den CHO-Zellen durch mehr Protein im Medium, andererseits auf mehr PfEMP1-Moleküle auf der Erythrozytenoberfläche und somit die relative Unterrepräsentation anderer, CHO-zellbindender, Oberflächenproteine zurückgeführt. Auf die Genexpression hatte die Serumzugabe keinen Einfluss (s.u.).

**Das PF13\_0003-Genprodukt ist neben anderen offenbar an der ICAM-1-Bindung beteiligt** Da PfEMP1 als Bindungspartner von ICAM-1 bekannt ist, wurden die Expressionsmuster der *var*-Gene acht Stunden nach Reinfektion der Erythrozyten analysiert. Es zeigte sich eine exklusive Transkription der Gruppe A-Gene und hierbei insbesondere die der Gene PF13\_0003, PF11\_0521 und PFD1235w, wobei PF13\_0003 mit Prozentsätzen von bis zu 42,1 % in der ersten und bis zu 55 % in der zweiten Adhäsionsgeneration am häufigsten detektiert werden konnte (Tabellen 3.13, 3.14, 3.15

und 3.16). Die Bindungskapazität des PF11\_0521-Genproduktes an ICAM-1 konnte kürzlich gezeigt werden [40] (siehe auch 4.2.3.2). In adulten Trophozoiten derer Parasiten mit Bindungskapazität sind neben Genen der Gruppe *varA* auch solche der *pfmc2tm*-Familie exprimiert und hierbei insbesondere das Gen PFA0065w, dessen Sequenzen zu 42,68 % am häufigsten vertreten waren. Eine Beteiligung dieses Genprodukts an der ICAM-1-Bindung muss allerdings erst nachgewiesen werden.

**Die Bindung an ICAM-1 kann mit einem spezifischen Antikörper blockiert werden** Mit einem Antikörper gegen die PF13\_0003-DBL2 $\beta$ C2-Domäne konnte die Bindung von mit dem Kulturstamm 3D7 infizierten Erythrozyten konzentrationsabhängig inhibiert werden (Abbildung 3.27). Die Bindung der PF13\_0003-DBL2 $\beta$ C2-Domäne an ICAM-1 scheint daher spezifisch zu sein, zumal neben i) der spezifischen Inhibition ii) die präferierte Expression des PF13\_0003-Gens gezeigt und iii) die Bindung der rekombinanten PF13\_0003-DBL2 $\beta$ C2-Domäne an ICAM-1 unter Fließbedingungen nachgewiesen werden konnte (siehe 4.2.3.2).

Bei einer Antikörperkonzentration von 1:100 adhärten durchschnittlich noch 3,4 infizierte Erythrozyten pro 100 CHO-Zellen. Diese könnten auf solche Zellen zurückzuführen sein, die nicht über die PF13\_0003-DBL2 $\beta$ C2-Domäne, sondern über das PF11\_0521- oder das PFD1235w-Genprodukt an ICAM-1 binden. Interessant wäre festzustellen, ob mit  $\alpha$ PF13\_0003-DBL2 $\beta$ C2 auch die Adhärenz anderer Isolate an ICAM-1 inhibiert werden kann, da die Problematik eines PfEMP1-basierten Impfstoffes in erster Linie auf der hohen Variabilität zwischen verschiedenen *P. falciparum*-Stämmen beruht (siehe 4.3).

**Bindungsexperimente mit dem Patientenisolat BNI151209 an ICAM-1** Der Prozentsatz der infizierten Erythrozyten mit Bindungskapazität an ICAM-1 konnte über zwei aufeinanderfolgende Adhäsionsgenerationen von 4 % auf 17,11 % gesteigert werden (siehe Abbildung 3.28). Dieser vergleichsweise niedrige Anstieg könnte mit einem *Switching* der *var-A*-Gene in einem Teil der Parasitenpopulation erklärt werden; im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach vier Wochen Kultivierung die *var*-Genexpression weitgehend konserviert ist und Expressionswechsel selten stattfinden; allerdings ist es durchaus möglich, dass dieses Ereignis dennoch in einem Teil der Parasitenpopulation nach der ersten Adhäsionsgeneration stattgefunden hat, die daraufhin ihre Bindungskapazität an ICAM-1 verloren haben. Durch die Überlagerung an Sequenzen derer Parasiten, die weder in der ersten noch in der zweiten Generation über ICAM-1-Bindungskapazität verfügten, ist nicht zu erwarten, diesen Expressionswechsel in der Kontrollpopulation der ungebundenen infizierten Erythrozyten beobachten zu können (Tabelle 3.18).

Die Genexpression der VSA-Multigenfamilien wurde in acht Stunden alten Ringen und 28 Stunden alten Trophozoiten untersucht. In jungen Ringen konnten Transkripte der *var-A*-Gene detektiert werden; ein Transkript schien präferiert exprimiert worden zu sein, es stellte in der ersten Adhäsionsgeneration 33,3 %, in der zweiten 40 % aller Sequenzen dar. In adulten Trophozoiten wurden zusätzlich Gene der *stevor*-Familie exprimiert, hier dominierte ein Transkript in der ersten Adhäsionsgeneration zu 47,06 % in der Anzahl der Sequenzen, in der zweiten zu 57,9 %. Es fällt auf, dass im Vergleich mit dem Kulturoisolat 3D7 wiederum *var*-Gene der Gruppe A exprimiert

waren. Leider kann über die Ähnlichkeit der hauptsächlich exprimierten Transkripte der ICAM-1-bindenden Populationen des 3D7- sowie des Patientenisolates keine Aussage getroffen werden, da der sequenzierte Bereich der *var*-Transkripte weitgehend im 5' untranslatierten Bereich liegt, und die Genomsequenz des Patientenisolates nicht bekannt ist. Im Gegensatz zur 3D7 Parasitenpopulation, in der zusätzlich Gene der *pfmc2tm*-Familie exprimiert waren, waren es im Patientenisolat BNI151209 solche der *stevor*-Familie. Es spricht viel dafür, dass VSA-Multigenfamilien gemeinsam reguliert werden.

#### 4.2.2 Regulation der VSA-Multigenfamilien

In allen in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsexperimenten fiel auf, dass in den Populationen derer Parasiten mit Bindungskapazität Multigenfamilien exklusiv exprimiert worden waren; es wird postuliert, dass die Produkte der transkribierten Gene für die Interaktion mit den Endothelrezeptoren *Rx* respektive ICAM-1 verantwortlich sind. Es ist bekannt, dass die *var*-Genexpression *mutually exclusive* verläuft, in einer Zelle pro Zeitpunkt also nur ein *var*-Gen aktiv, die anderen stumm vorliegen [50, 51, 52, 53]. Möglicherweise unterliegen nicht nur die *var*-Gene innerhalb ihrer Familie, sondern gemeinsam mit den Vertretern der *pfmc2tm*-, der *rif*- und der *stevor*-Familie einer strikten Regulation. So konnte das Phänomen beobachtet werden, dass mit der Herabregulierung der *var*-Genexpression auch die der anderen VSA-Multigenfamilien eingeschlossen war, woraus auf die Existenz eines gemeinsamen Aktivierungsfaktors geschlossen wurde [58]. Die Ergebnisse der Bindungsexperimente dieser Arbeit sprechen dafür, dass die Expression einer Multigenfamilie die gleichzeitige Expression einer anderen erlaubt und die übrigen ausschließt. So wurde - unter Ausschluss der restlichen VSA-Multigenfamilien - die gleichzeitige Expression von *pfmc2tm*- und *rifA*-Genen (siehe 3.2.1.2), die gleichzeitige Expression von *varA* und *pfmc2tm* (siehe 3.2.2.2) oder von *varA* und *stevor* (siehe 3.2.4.1) beobachtet. Da aktive *var*-Promotoren und solche der *rif*-Familie sich eine *expression site* in der Peripherie des Nukleus teilen, wird postuliert, dass beide Familien auch untereinander exklusiv exprimiert werden [78]. Desweiteren war die verstärkte Aktivierung der *pfmc2tm*-Gene mit einer Repression der *stevor*-Gene verbunden [58]; möglicherweise haben beide Genfamilienprodukte eine ähnliche Funktion, der Ausschluss der einen bei Aktivierung der anderen würde demnach eine redundante Expression verhindern - und dem Wirtsimmunsystem nicht unnötigerweise Antigene präsentieren. Nach der Bindung an *Rx* wurde in den jungen Ringen keine der VSA-Multigenfamilien exprimiert. Es ist denkbar, dass ein weiterer Mitspieler der variablen Oberflächenantigene mit *Rx* interagiert, und dessen Genexpression die der anderen reprimiert. In dieser Arbeit konnte die *surf*-Multigenfamilie als möglicher Kandidat ausgeschlossen werden (die Daten wurden nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt, beziehen sich die Ergebnisse auf eine Parasitenpopulation; welche Genfamilien innerhalb einer Zelle pro Zeitpunkt gemeinsam exprimiert werden, kann daher nur spekuliert werden.

### 4.2.3 Bindungsexperimente mit rekombinantem Protein

Da jedes *P. falciparum*-Isolat über die gleichen PfEMP1-Domänentypen verfügt, die aber innerhalb eines Isolates sowie zwischen den Isolaten hochgradig variieren, wurde im dritten Teil dieser Arbeit die Bindung 24 rekombinant exprimierter PfEMP1-Domänen an Endothelrezeptoren mit Schwingquarzsensoren untersucht. Es wurden DBL $\beta$ -Domänen in Kombination mit und ohne der C-terminal anschließenden C2-Domäne sowie diverse Kontrolldomänen der *var*-Gengruppen *A*, *B* und *C* für die Bindung an die Endothelrezeptoren ICAM-1 und CD36 ausgewählt.

#### 4.2.3.1 CIDR1 $\alpha$ bindet CD36

Die meisten mit *P. falciparum*-Isolaten infizierten Erythrozyten sind in der Lage, an den Endothelrezeptor CD36 zu binden [20]. Die CIDR1 $\alpha$ -Domäne verschiedener Isolate wurde als Interaktionspartner für CD36 beschrieben [36, 37]; aufgrund der Sequenzvariabilität zwischen verschiedenen Domänen, die alle über Bindungskapazität verfügen, wird eine konservierte Faltung postuliert, die die Bindung vermittelt [79]. In dieser Arbeit band die PF07\_0050\_CIDR1 $\alpha$ -Domäne unter Fließbedingungen an CD36, nicht aber an ICAM-1 (Abbildungen 3.33 sowie 3.34). Diese Kontrolle diente als Hinweis, dass die Proteindomänen korrekt renaturiert wurden, und die Interaktionen mit den Endothelrezeptoren spezifisch waren.

#### 4.2.3.2 Wenige rekombinante DBL $\beta$ C2-Domänen binden ICAM-1

Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Kombination aus DBL $\beta$  und C2 die Bindung an ICAM-1 vermittelt [38, 26, 27, 28], jedoch können nicht alle DBL $\beta$ C2-Domänen an ICAM-1 binden, und es bestehen widersprüchliche Ergebnisse, welche Charakteristika für eine Interaktion gegeben sein müssen. So sprechen die Ergebnisse einer Studie von Howell et al. dafür, dass ein geringer Teil des DBL $\beta$ C2-Repertoires des Kulturisolates IT4 an ICAM-1 binden kann, aber keine der Domänen mit Bindungskapazität von einem *var*-Gen der Gruppe *A* abgeleitet war [39]. Dagegen konnten Oleinikov et al. nur eine, der Gruppe *A* zugehörige, DBL $\beta$ C2-Domäne im Kulturstamm 3D7 identifizieren, die an ICAM-1 bindet [40].

In dieser Arbeit konnte unter Fließbedingungen weder mit der rekombinanten DBL $\beta$ - noch mit der C2-Domäne allein eine Bindung an ICAM-1 gezeigt werden (Abbildungen 3.37 und 3.38).

Bei der der *var*-Gruppe *B* zugehörigen PF07\_0050\_DBL2 $\beta$ C2- und die der Gruppe *A* zugehörigen PF11\_0008\_DBL4 $\beta$ C2-Domäne konnte eine leichte Bindung an ICAM-1 beobachtet werden (Abbildung 3.40 wie auch 3.34). PF13\_0003\_DBL2 $\beta$ C2 zeigte die vergleichsweise stärkste Interaktion mit ICAM-1 (Abbildungen 3.41 und 3.41); diese war ab einer Proteinkonzentration von 25  $\mu$ g/mL nachzuweisen und schien bei 1 mg/mL in den Sättigungsbereich zu gelangen (Abbildung 3.43). Die PF13\_0003\_DBL2 $\beta$ C2-Domäne ist von demjenigen Gen abgeleitet, das bei den in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsexperimenten mit infizierten Erythrozyten an ICAM-1 in Parasiten mit Bindungskapazität in höchster Frequenz exprimiert wurde (Abbildungen 3.22, 3.23, 3.24 und 3.25). Mit einem gegen diese Domäne gerichteten Antikörper konnte die Bindung infi-

zierter Erythrozyten an ICAM-1 konzentrationsabhängig gehemmt werden (Abbildung 3.27). Die Daten, die auf Transkriptions- sowie auf Proteinebene generiert wurden, weisen darauf hin, dass PF13\_0003\_DBL2βC2 ein Interaktionspartner von ICAM-1 ist (siehe auch 4.2.1.2).

Durch Sequenzvergleiche konnten Gemeinsamkeiten innerhalb der Domänen mit Bindungskapazität ermittelt werden. Gesetzt den Fall, dass diese Aminosäuren für die Interaktion mit ICAM-1 verantwortlich sind, ergibt sich das Sequenzmotiv  $GX_2CX_{4-14}ECX_2CX_3CX_2Y$ . Im Folgenden wurden die Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten DBLβC2-Domänen mit der Sequenz der von Oleinikov et al. als starker Binder identifizierten Domäne PF11\_521\_DBL2βC2 verglichen. Es zeigte sich, dass auch sie über das postulierte Sequenzmotiv verfügt. Im Genom von 3D7 existieren unter den 18 DBLβC2-Domänen drei weitere mit diesem Motiv, neben der PFL1950w\_DBL2βC2- und der PFL0020w\_DBL2βC2- auch die PFL1235w\_DBL2βC2-Domäne; das von letztgenannter abgeleitete Gen war in eines der drei in höchster Frequenz exprimierten Gene derer Parasiten, die über ICAM-1-Bindungskapazität verfügten (Tabellen 3.13, 3.14, 3.15 und 3.16). In weiteren Versuchen sollten alle Domänen, die über dieses Sequenzmotiv verfügen, auf ihre Bindungseigenschaften getestet werden. Auch wäre interessant festzustellen, ob einer Domäne ohne Bindungskapazität durch Mutationen, die zum postulierten Bindungsmotiv führen, Bindungskapazitäten verliehen werden können. Der Zusammenhang zwischen Sequenz und Bindungskapazität scheint so unmittelbar allerdings nicht zu sein; es konnte das Phänomen beobachtet werden, dass Domänen mit Bindungseigenschaften und solche ohne mitunter mehr Sequenzübereinstimmungen haben, als bindende Domänen untereinander [34].

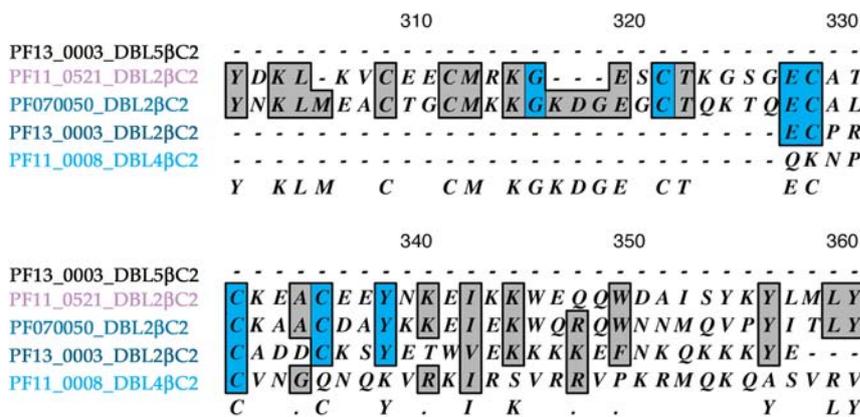


Abbildung 4.1: Ausschnitt des *Clustal W Alignments* der auf ihre Bindung getesteten DBLβC2-Domänen im Vergleich zu PF11\_521\_DBL2βC2.

dunkelblau: starker Binder; mittel-/hellblau: schwacher Binder; violett: starker Binder von Oleinikov et al.; schwarz: keine Bindungskapazität; Aminosäuren, die an der ICAM-1 Interaktion beteiligt sein könnten, sind blau dargestellt.

In derselben Arbeit von Oleinikov et al. konnte PF13\_0003\_DBL2βC2 keine Bindungskapazität nachgewiesen werden [40]; die rekombinant exprimierte Domäne ist am C-Terminus um ca. 40 Aminosäuren größer als die in dieser Studie exprimierte Domäne. Da gezeigt werden konnte, dass bereits das erste Drittel der C2-Domäne als Anhang zur DBLβ-Domäne für eine Bindung an ICAM-

1 ausreicht [26], ist es denkbar, dass die C-terminal Verlängerung zu einer sterischen Hinderung und/oder einer anderen Faltung führte, die die Bindung an ICAM-1 verunmöglichte. Ob sich die DBL $\beta$  und die C2-Domäne zu einer gemeinsamen Struktur falten oder unabhängig voneinander, oder ob die C2-Domäne lediglich als Strukturgeber oder Abstandshalter dient, ist nicht bekannt [28, 80].

### 4.3 Klinische Relevanz

Die an der Erythrozytenoberfläche präsentierten variablen Antigene sind, in Abhängigkeit ihrer Expositionsdauer und ihrer Bindungseigenschaften, für Schwere und Verlauf der Malaria tropica mit verantwortlich. So konnte die Fähigkeit infizierter Erythrozyten, ICAM-1 zu binden mit den Komplikationen der zerebralen Malaria in Zusammenhang gestellt werden [7, 81, 82]. Diese schwere Form der Malaria tritt auffälligerweise hauptsächlich bei Kindern unter fünf Jahren auf; es konnte gezeigt werden, dass zerebrale Malaria mit der stringenten Expression von PfEMP1 Varianten der Gruppe A assoziiert ist [83]. Die in dieser Arbeit bestimmten hohen *Switching*raten der Gruppe A *var*-Gene könnten die Ursache dafür sein, dass Patienten zerebraler Malaria niedrige Antikörpertiter gegen *P. falciparum*-Antigene aufweisen [84, 85], da durch den raschen Expositionswechsel keine Immunantwort des Wirtes aufgebaut werden kann. Die erfolgreiche Etablierung der Infektion im Wirt erlaubt es dem Parasiten, diversere Antigene - wie die heterogenen Varianten der Gruppen B und C- zu exprimieren. Es wird angenommen, dass das Immunsystem unterrepräsentierte Antigen-Subpopulationen weitgehend ignoriert [86, 87, 88]. Überlebt ein Patient eine schwere Malaria unbehandelt, wird diese daher in eine milde, chronische Form übergehen. Vollständige Immunität kann allerdings nie erreicht werden; eine chronische oder regelmäßige Infektion mit *P. falciparum* ist die Voraussetzung für den Erhalt einer sogenannten Semiimmunität.

Ein PfEMP1-basierter Impfstoff könnte die Transmission des Parasiten wohl nicht verhindern, da Parasiten, die wenig virulente, heterogene variable Oberflächenantigen exprimieren, nicht angegriffen würden [84]. Allerdings würden die schwersten Formen der Malaria tropica und damit nahezu alle *P. falciparum*-bedingten Todesfälle beseitigt. Als Kandidatenantigene kamen bereits DBL1 $\alpha$  und CIDR1 $\alpha$  in Frage, da diese Domänen als Bestandteil der konservierten Kopfstruktur in allen PfEMP1-Varianten vorhanden sind [89]. Eine sterile Immunität konnte in Affen der Gattung Aotus mit homologen, nicht aber mit heterologen Parasiten erreicht werden [90]. Aufgrund der hohen Variabilität in den Sequenzen, aber der vergleichsweise stark restringierten Bindungskapazitäten der PfEMP1-Moleküle, sollte ein Impfstoff auf der Sekundär- und Tertiärstruktur der Epitope basieren, die an der Interaktion mit Wirts-Endothelrezeptoren beteiligt sind. Im Verlauf dieser Arbeit ist es gelungen, ein Sequenzmotiv zu identifizieren, das möglicherweise die Bindung an ICAM-1 vermittelt. Des Weiteren wurde mit der Gewinnung eines Kristalls der PF13\_0003\_DBL2 $\beta$ C2-Domäne, deren starke Interaktion mit ICAM-1 nachgewiesen werden konnte, begonnen. Die in ersten Versuchsansätzen gebildeten Kristalle waren allerdings zu klein zum Vermessen.

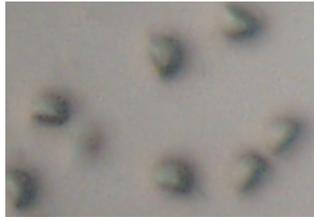


Abbildung 4.2: PF13\_0003\_DBL2 $\beta$ C2-Kristall.

Alle *P. falciparum*-Isolate verfügen über DBL $\beta$ C2-Domänen, von denen aber nur ein geringer Teil Bindungskapazität an ICAM-1 besitzt. Durch Auflösung der molekularen Struktur der PF13\_0003\_DBL2 $\beta$ C2 könnte der Zusammenhang zwischen Primär- und Tertiärstruktur des Proteins erschlossen werden. Damit wäre es möglich, das Potenzial eines Parasiten, an ICAM-1 zu binden und somit eine zerebrale Malaria zu verursachen, anhand der Nukleotidsequenz vorherzusagen. Des Weiteren könnte aufgrund der Epitopstruktur ein Inhibitor synthetisiert werden. Wären mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten nicht mehr in der Lage, an ICAM-1 zu binden, könnten somit die schweren Komplikationen einer zerebralen Malaria beseitigt werden.



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Verbreitungskarte . . . . .	5
1.2	Der Entwicklungszyklus von Plasmodien . . . . .	7
1.3	Die Hauptformen der Adhäsion infizierter Erythrozyten . . . . .	8
1.5	Sequestrierung . . . . .	10
1.4	Modifikationen der Wirtszellmembran . . . . .	10
1.6	Sequestrierung . . . . .	12
1.7	Der Proteinaufbau Variabler Oberflächenantigene . . . . .	13
1.8	Die genomische Lokalisation variabler Multigenfamilien . . . . .	13
2.1	Versuchsablauf des Bindungsexperiments . . . . .	30
2.2	Klonierungsschema zweier <i>var</i> -Gene des Patientenisolates 19 . . . . .	40
2.3	Schwingquarz-Analyseplattform . . . . .	44
2.4	Schwingquarzsensoren . . . . .	44
2.5	Schwingquarzsensoren . . . . .	45
3.1	<i>var</i> -Genexpressionsprofil des Patientenisolates 10 . . . . .	50
3.2	<i>var</i> -Genexpressionsprofil des Patientenisolates 14 . . . . .	50
3.3	<i>var</i> -Genexpressionsprofil des Patientenisolates 6 . . . . .	51
3.4	<i>var</i> -Genexpressionsprofil des Patientenisolates 11 . . . . .	51
3.5	<i>var</i> -Genexpressionsprofil des Patientenisolates 12 . . . . .	55
3.6	<i>var</i> -Genexpressionsprofil des Patientenisolates 19 . . . . .	56
3.7	Indirekte Immunfluoreszenz $\alpha$ 1811-ev gegen <i>ex vivo</i> -Trophozoiten; konfokale Mikroskopie . . . . .	57
3.8	Indirekte Immunfluoreszenz $\alpha$ 1811-1G gegen Trophozoiten der ersten <i>in vitro</i> - Generation; konfokale Mikroskopie . . . . .	58
3.9	Indirekte Immunfluoreszenz $\alpha$ 1811-ev gegen <i>ex vivo</i> -Trophozoiten . . . . .	58
3.10	Indirekte Immunfluoreszenz $\alpha$ 1811-ev gegen Trophozoiten der ersten <i>in vitro</i> -Generation und $\alpha$ 1811-1G gegen <i>ex vivo</i> -Trophozoiten . . . . .	59
3.11	Indirekte Immunfluoreszenz $\alpha$ 1811-1G gegen Trophozoiten der ersten <i>in vitro</i> -Generation . . . . .	59
3.12	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an <i>Rx</i> ; Exp. 1 . . . . .	62
3.13	Sequenzverteilung der <i>rifA</i> -Transkripte nach Bindung an <i>Rx</i> ; Exp. 1 . . . . .	65

3.14	Sequenzverteilung der <i>pfmc2tm</i> -Transkripte nach Bindung an <i>Rx</i> ; Exp. 1 . . . . .	65
3.15	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an <i>Rx</i> ; Exp. 2 . . . . .	66
3.16	Sequenzverteilung der <i>rifA</i> -Transkripte nach Bindung an <i>Rx</i> ; Exp. 2 . . . . .	69
3.17	Sequenzverteilung der <i>pfmc2tm</i> -Transkripte nach Bindung an <i>Rx</i> ; Exp. 2 . . . . .	69
3.18	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 1 . . . . .	70
3.19	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 2 . . . . .	71
3.20	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 3 . . . . .	72
3.21	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 4 . . . . .	73
3.22	Sequenzverteilung der <i>var-A</i> -Transkripte nach Bindung an ICAM-1; Exp. 1 . . . . .	79
3.23	Sequenzverteilung der <i>var-A</i> -Transkripte nach Bindung an ICAM-1; Exp. 2 . . . . .	79
3.24	Sequenzverteilung der <i>var-A</i> -Transkripte nach Bindung an ICAM-1; Exp. 3 . . . . .	80
3.25	Sequenzverteilung der <i>var-A</i> -Transkripte nach Bindung an ICAM-1; Exp. 4 . . . . .	80
3.26	Sequenzverteilung der <i>pfmc2tm</i> -Transkripte nach Bindung an ICAM-1; Exp. 4 . . . . .	80
3.27	Inhibition der ICAM-1 Bindung mit $\alpha$ DBL2 $\beta$ C2-Antiserum . . . . .	81
3.28	Auszählung der BNI151209-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1 . . . . .	82
3.29	Sequenzverteilung der <i>varA</i> -Transkripte von BNI151209 nach Bindung an ICAM-1 . . . . .	86
3.30	Sequenzverteilung der <i>stevor</i> -Transkripte von BNI151209 nach Bindung an ICAM-1 . . . . .	86
3.31	Rekombinante PfEMP1-Domänen . . . . .	87
3.32	Bindung von PF07_0050_DBL1 $\alpha$ , PF07_0050_DBL2 $\beta$ und PF07_0050_CIDR1 $\alpha$ an CD36 . . . . .	88
3.33	Bindung von PF07_0050_CIDR1 $\alpha$ an CD36 . . . . .	88
3.34	Bindung von PF07_0050_DBL1 $\alpha$ , PF07_0050_CIDR1 $\alpha$ und PF07_0050_DBL2 $\beta$ C2 an ICAM-1 . . . . .	89
3.35	Bindung von PFD0020c_DBL1 $\alpha$ an ICAM-1 . . . . .	90
3.36	Bindung von PFI1820w_DBL1 $\epsilon$ an ICAM-1 . . . . .	91
3.37	Bindung von PFD0020c_DBL2 $\beta$ an ICAM-1 . . . . .	91
3.38	Bindung von PFF0845c_C2 an ICAM-1 . . . . .	92
3.39	Bindung von PF13_0003_DBL5 $\beta$ C2 an ICAM-1 . . . . .	92
3.40	Bindung von PF11_0008_DBL4 $\beta$ C2 an ICAM-1 . . . . .	93
3.41	Bindung von PF13_0003_DBL2 $\beta$ C2 an ICAM-1 (100 $\mu$ g/mL) . . . . .	93
3.42	Bindung von PF13_0003_DBL2 $\beta$ C2 an ICAM-1 (1 mg/mL) . . . . .	94
3.43	relative Bindungsstärke von PF13_0003_DBL2 $\beta$ C2 an ICAM-1 in Abhängigkeit der Proteinkonzentration . . . . .	94
3.44	<i>Clustal W Alignment</i> der sechs auf ihre Bindung getesteten DBL2 $\beta$ C2-Domänen . . . . .	95
4.1	<i>Clustal W Alignments</i> der auf ihre Bindung getesteten DBL $\beta$ C2-Domänen im Vergleich zu PF11_521_DBL2 $\beta$ C2 . . . . .	105
4.2	PF13_0003_DBL2 $\beta$ C2-Kristall . . . . .	107

# Tabellenverzeichnis

3.1	<i>var</i> -Genexpressionsprofile der Kulturisolate 3D7 und FCR3 . . . . .	49
3.2	<i>var</i> -Genexpressionsprofile der schnell <i>switchenden</i> Patientenisolate . . . . .	53
3.3	<i>var</i> -Genexpressionsprofile der langsam <i>switchenden</i> Patientenisolate . . . . .	54
3.4	Genexpressionsprofil der Ringstadien von 3D7 nach Bindung an CD9 . . . . .	61
3.5	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an <i>Rx</i> ; Exp. 1 . . . . .	62
3.6	Genexpressionsprofil der 3D7 Trophozoiten nach Bindung an <i>Rx</i> . . . . .	64
3.7	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an <i>Rx</i> ; Exp. 2 . . . . .	66
3.8	Genexpressionsprofil der 3D7 Trophozoiten nach Bindung an <i>Rx</i> ; Exp. 2 . . . . .	68
3.9	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 1 . . . . .	70
3.10	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 2 . . . . .	71
3.11	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 3 . . . . .	71
3.12	Auszählung der 3D7-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 4 . . . . .	72
3.13	Genexpressionsprofil der 3D7 Ringstadien nach Bindung an ICAM-1; Exp. 1 . . . . .	74
3.14	Genexpressionsprofil der 3D7 Ringstadien nach Bindung an ICAM-1; Exp. 2 . . . . .	75
3.15	Genexpressionsprofil der 3D7 Ringstadien nach Bindung an ICAM-1; Exp. 3 . . . . .	76
3.16	Genexpressionsprofil der 3D7 Ringstadien und adulten Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1; Exp. 4 . . . . .	77
3.17	Auszählung der BNI151209-Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1 . . . . .	82
3.18	Genexpressionsprofil der BNI151209 Ringstadien und adulten Trophozoiten nach Bindung an ICAM-1 . . . . .	85



# Literaturverzeichnis

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>.
- [2] B. Loos-Frank R. Lucius. *Biologie von Parasiten*. Springer, 2007.
- [3] H. Gilles D. Warrel. *Essential Malariology*. Arnold, 2002.
- [4] K. Kirchgatter et al. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *An Acad Bras Cienc*, 77(3), 2005.
- [5] L. H. Miller and O. K. Doumbo. The pathogenic basis of Malaria. *Nature*, 415(2), 2002.
- [6] S. Wassmer et al. Pathophysiology of Cerebral Malaria. *Ann N.Y. Acad Sci*, 992, 2003.
- [7] G. Turner et al. An Immunohistochemical Study of the Pathology of Fatal Malaria. *Am J Pathol*, 145, 1994.
- [8] R. Udomsangpetch et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocytes rosettes. *J Ex Med*, 169, 1989.
- [9] A. Pain et al. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Nat Ac S*, 98, 2001.
- [10] J. W. Barnwell et al. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions *in vitro* as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *L Clin Invest*, 84, 1989.
- [11] D. Roberts et al. Thrombospondine binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature*, 318, 1985.
- [12] A. R. Berendt et al. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 341, 1989.
- [13] C. F. Ockenhouse et al. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med*, 176, 1992.
- [14] C. J. Treutiger et al. PECAM/CD31, an endothelial receptors for binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med*, 176, 1992.

- [15] B. Pouvelle et al. Neural cell adhesion molecule, a new adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, capable of aggregation. *Infect Immun*, 75, 2007.
- [16] M. Fried and P. E. Duffy. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*, 272, 1996.
- [17] J. G. Beeson and G. V. Brown. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes demonstrate dual specificity for adhesion to hyaluronic acid and chondroitin sulfate A and have distinct adhesive phenotypes. *J Infect Dis*, 189, 2004.
- [18] J. Chulay et al. Host receptors for Malaria-infected Erythrocytes. *Am J Trop Med*, 43, 1990.
- [19] J. G. Beeson et al. Adhesion of plasmodium falciparum-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *J Infect Dis*, 189, 2004.
- [20] C. Newbold et al. Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Nat Med*, 6, 2000.
- [21] L. Serghides et al. CD36 and Malaria: friends or foes? *Trends in Parasitol*, 19, 2003.
- [22] I. W. Sherman et al. The sticky secrets of sequestration. *Parasitology Today*, 11, 1995.
- [23] I. W. Sherman. Advances in parasitology: Reflections on an century of malaria biochemistry. *Academic Press*, 2008.
- [24] J. A. Rowe et al. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Camb Univ Press*, 11, 2009.
- [25] S. Chakravorty et al. Host response to cytoadherence in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Soc Trans*, 36, 2008.
- [26] J. D. Smith et al. Identification of a intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria.
- [27] R. Chattopadhyay et al. Molecular analysis of the cytoadherence phenotype of a *Plasmodium falciparum* field isolate that binds intercellular adhesion molecule-1. *Mol Bio Para*, 133, 2004.
- [28] A. L. Springer et al. Functional interdependence of the DBLbeta domain and c2 region for binding of the *Plasmodium falciparum* variant antigen to ICAM-1. *Mol Biochem Parasitol*, 137, 2004.
- [29] R. M. Fairhurst et al. Abnormal display of PfEMP1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria. *Nature*, 435, 2005.
- [30] P. Heinrich et al. 3-D analysis of the Plasmodium falciparum Maurer's clefts using different electron tomographic approaches. *Biotech J*, 6, 2009.

- [31] P. Horrocks. Variable *var* transition rates underlie antigenic variation in malaria. *Proc Natl Acad Sci*, 101(30), 2004.
- [32] X. Su et al. The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*, 82, 1995.
- [33] J. D. Smith et al. Decoding the language of *var* genes and *Plasmodium falciparum* sequestration. *Trends Parasitol*, 17(11), 2001.
- [34] J. D. Smith et al. Classification of adhesive domains in the *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 family. *Mol Biochem Parasitol*, 110, 2000.
- [35] L. H. Miller et al. Definition of the minimal domain of CIDR1alpha of *Plasmodium falciparum* PfEMP1 for binding CD36. *Mol Biochem Parasitol*, 120, 2002.
- [36] J. D. Smith et al. Analysis of adhesive domains from A4VAR *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 identifies a CD36 binding domain. *Mol Biochem Parasitol*, 97, 1997.
- [37] D. I. Baruch et al. Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. *Blood*, 90, 1997.
- [38] B. M. Cooke et al. Assignment of functional roles to parasite proteins in malaria-infected red blood cells by competitive flow-based adhesion assay. *Br J Haematol*, 117(1), 2002.
- [39] D. P. Howell et al. Mapping a common interaction site used by *Plasmodium falciparum* Duffy binding-like domains to bind diverse host receptors. *Mol Microbiol*, 67, 2008.
- [40] A. V. Oleinikov et al. High throughput functional assays of the variant antigen PfEMP1 reveal a single domain in the 3D7 *Plasmodium falciparum* genome that bind ICAM1 with high affinity and is targeted by naturally acquired neutralizing antibodies. *PLoS Pathog*, 4, 2009.
- [41] M. J. Gardner et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419, 2002.
- [42] T. Lavstsen et al. Sub-grouping of *Plasmodium falciparum* 3D7 *var*-genes based on sequence analysis of coding and noncoding regions. *Malar J*, 27(2), 2003.
- [43] S. M. Kraemer et al. A family affair: *var* genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol*, 9, 2006.
- [44] A. R. Trimnell et al. Global diversity and evolution of *var*-genes associated with placental and severe childhood malaria. *Mol Biochem Parasitol*, 148, 2006.
- [45] S. M. Kraemer et al. Evidence for the importance of genetic structuring and functional specialization of the *Plasmodium falciparum* *var*-gene family. *Mol Microbiol*, 50, 2003.

- [46] M. Petter et al. Variant proteins of the *Plasmodium falciparum* RIFIN family show distinct subcellular localization and developmental expression patterns. *Mol Biochem Parasitol*, 156, 2007.
- [47] J. Przyborski et al. Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *EMBO J*, 13, 2005.
- [48] T. Y. Sam-Yellowe et al. A *Plasmodium* gene family encoding Maurer's cleft membrane proteins: structural properties and expression profiling. *Genome Res*, 6, 2004.
- [49] L. Hviid K. Deitsch. Variant surface antigens, virulence genes and the pathogenesis of malaria. *Trends Parasitol*, 20, 2004.
- [50] A. Scherf et al. Antigenic variation in malaria: *in situ* switching, relaxed and mutually exclusive transcription of *var* genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J*, 17(18), 1998.
- [51] J. Peters et al. High diversity and rapid change over of expressed *var* genes during the acute phase of *Plasmodium falciparum* infections in human volunteers. *Proc Nat Ac S*, 99(16), 2002.
- [52] R. Dzikowski et al. Mutually Exclusive Expression of Virulence Genes by Malaria Parasites Is Regulated Independently of Antigen Production. *PLoS Pathog*, 2(3), 2006.
- [53] Q. Chen et al. Developmental selection of *var* gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 394, 1998.
- [54] A. Scherf et al. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol*, 62, 2008.
- [55] C. Lavazec et al. Expression switching in the *stevor* and *Pfmc-2TM*superfamilies in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, 64, 2007.
- [56] T. Chookajorn et al. Epigenetic memory at malaria virulence genes. *Proc Nat Ac S*, 104(3), 2006.
- [57] P. Borst. Antigenic variation and allelic exclusion. *Cell*, 109, 2002.
- [58] C. Howitt et al. Clonally variant gene families in *Plasmodium falciparum* share a common activation factor. *Mol Microbiol*, 73, 2009.
- [59] L. Gannoun-Zaki et al. A silenced *Plasmodium falciparum var* promoter can be activated in vivo through spontaneous deletion of a silencing element in the intron. *Eukaryot Cell*, 4(2).
- [60] M. Calderwood et al. *Plasmodium falciparum var* genes are regulated by two regions with separate promoters, one upstream of the coding region and a second within the intron. *J Biol Chem*, 278(36).
- [61] K. W. Deitsch et al. Cooperative silencing elements in *var* genes. *Nature*, 412, 2001.

- [62] D. Roberts et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature*, 357, 1992.
- [63] S. Paget-McNicol et al. The *Plasmodium falciparum* var gene switching rate, switching mechanism and patterns of parasite recrudescence described by mathematical modelling. *Parasitol*, 124, 2002.
- [64] M. Kaestli et al. Longitudinal assessment of *Plasmodium falciparum* var gene transcription in naturally infected asymptomatic children in Papua New Guinea. *J Infect Dis*, 189, 2004.
- [65] B. W. Mok et al. Default Pathway of var2csa switching and translational repression in *Plasmodium falciparum*. *PLOS ONE*, 3, 2008.
- [66] P. Borst and P. A. Genest. Switching like for like. *Nature*, 439, 2006.
- [67] M. Kaestli et al. Virulence of malaria is associated with differential expression of *Plasmodium falciparum* var gene subgroups in a case-control study. *J Infect Dis*, 193, 2006.
- [68] A. Salanti et al. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol Microbiol*, 49, 2003.
- [69] F. Roberts et al. Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90, 1996.
- [70] C. N. Pace et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4, 1995.
- [71] S. Predehl. *Dynamik der var-Genexpression bei Plasmodium falciparum*. Diplomarbeit, 2007.
- [72] M. Frank et al. Variable switching rates of malaria virulence genes are associated with chromosomal position. *Mol Microbiol*, 64, 2007.
- [73] M. Dahlback et al. Changes in var gene mRNA level during erythrocytic development in two phenotypically distinct *Plasmodium falciparum* parasites. *Malar J*, 6(78), 2007.
- [74] S. Sharp et al. Programmed transcription of the var gene family, but not stevor, in *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Mol Microbiol*, 64, 2007.
- [75] I. Tsarukyanova et al. Proteins of the Plasmodium falciparum two transmembrane Maurer's cleft protein family, PfMC-2TM, and the 130 kDa Maurer's cleft protein define different domains of the infected erythrocyte intramembranous network. *Parasitol Res*, 104, 2009.
- [76] C. Lavazec et al. Hypervariability within the Rifin, Stevor and Pfmc-2TM superfamilies in *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.*, 34, 2006.

- [77] S. Frankland et al. Serum Lipoproteins Promote Efficient Presentation of the Malaria Virulence Protein PfEMP1 at the Erythrocyte surface. *Eukaryotic Cell*, 6(9), 2007.
- [78] R. Dzikowski et al. Mechanisms underlying mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites. *EMBO Report*, 8, 2007.
- [79] D. I. Baruch. Adhesive receptors in malaria-parasitized red cells. *Baillieres Clinical Haematology*, 12, 1999.
- [80] S. Chakravorty et al. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Europ J Cell Biol*, 84, 2005.
- [81] C. F. Ockenhouse et al. Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. *J Infect Dis*, 164, 1991.
- [82] C Newbold et al. Receptor specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum* . *J Infect Dis*, 164, 1991.
- [83] A. T. R. Jensen et al. *Plasmodium falciparum* associated with severe childhood malaria preferentially express PfEMP1 encodes by Group A var genes. *J Exp Med*, 199, 2004.
- [84] L. Hviid. The role of *Plasmodium falciparum* variant surface antigens in protective immunity and vaccine development. *Human Vaccines*, 6(1), 2010.
- [85] Qijun Chen. The naturally acquired immunity in severe malaria and its implication for a PfEMP1 based vaccine. *Microbes and Infection*, 9, 2007.
- [86] K. Marsh et al. Antigens induced of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. *Science*, 231, 1986.
- [87] H. A. Giha et al. Nine-year longitudinal study of antibodies to variant antigens of the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect Immun*, 70, 2002.
- [88] M. F. Ofori et al. Malaria-induced acquisition of antibodies to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens. *Infect Immun*, 70, 2002.
- [89] P. E. Duffy et al. Variant proteins on the surface of malaria infected erythrocytes-developing vaccines. *Trends in Parasitol*, 17(8).
- [90] D. I. Baruch et al. Immunization of Aotus monkeys with a functional domain of *Plasmodium falciparum* variant antigens induces protection against a lethal parasite line. *Proc Nat Ac S*, 99, 2002.

# Danksagung

Erstens - und in erster Linie - gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Iris Bruchhaus für die Anleitung und Korrektur dieser Arbeit. Danke Iris, für die freie Hand, die Du mir immer gelassen und dennoch mit Argusaugen beäugt hast; und dafür, dass Du mir beigebracht hast, dass der, der keine Erwartungen hat, auch nicht enttäuscht werden kann.

Ich danke Prof. Dr. Egbert Tannich für die Übernahme des zweiten Dissertationsgutachtens und nicht zuletzt für die Finanzierung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Rolf Horstmann bedanke ich mich für die Übernahme des Disputationsgutachtens. Danke an seine Arbeitsgruppe - besonders an Birgit Förster - für die produktive Zusammenarbeit, den Erfahrungsaustausch sowie für die freundliche Bereitstellung der CHO-Zelllinien. Herrn Prof. Böttger und Herrn PD Lüthen danke ich dafür, sich als Disputationsvorsitzender respektive -Gutachter zur Verfügung zu stellen.

Ich danke allen Kollegen aus den Laboren 4, 5 und 6 für die angenehme Atmosphäre während und nach der Arbeitszeit (hierbei vor allem Jenny, Ina, Dennis!) sowie für ihre beständige Hilfsbereitschaft. Danke, Anna, für die gute Zusammenarbeit. Und danke Heidrun - dafür, dass Du alles weißt.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe für Biosensorik der Universität Tübingen, und hierbei insbesondere Daniela Kömpf und Dr. Frank Gehring, für die Kooperation am Schwingquarzsensoren-Projekt. Bei Dr. Markus Perbandt aus der Arbeitsgruppe Strukturelle Infektionsbiologie von Prof. Dr. Christian Betzel bedanke ich mich für die unermüdlichen Kristallisationsversuche.

Großer Dank gilt meiner Familie, die meine Doktorarbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt hat; meiner Mutter danke ich insbesondere für ihre akribische Korrekturlesearbeit. Ich möchte mich bei denen bedanken, die viel Verständnis für die Wochenenden aufgebracht haben, die ich im Labor zugebracht habe. Und vor allem bei denen, die dafür überhaupt kein Verständnis hatten. Zu guter Letzt danke ich dem Hause Beer. Ihr werdet schon wissen, warum.