

**Transkriptionelle Veränderung von Gehirnendothelzellen und *P. falciparum* (Welch, 1897) infolge von Zytoadhäsion infizierter Erythrozyten, Fieber und Exposition mit Plasma von Malariapatienten**

---

**Dissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades  
*Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*

vorgelegt der

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

von

Michael Dörpinghaus

Hamburg, März 2019

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Iris Bruchhaus  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Abteilung ‚Protozoologie‘  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg
  
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Abteilung ‚Zelluläre Parasitologie‘  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

**Tag der Disputation:** 08.03.2019

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Quellen – benutzt habe. Die Arbeit wurde von mir nicht vorher einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium

Hamburg, Januar 2019



Michael Dörpinghaus

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Zusammenfassung.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Malaria – Erfolge und Rückschläge.....	1
1.2 Krankheitsbild der Malaria .....	2
1.3 Der Lebenszyklus .....	3
1.3.1 Der intraerythrozytäre Replikationszyklus .....	5
1.4 Modifizierung des infizierten Erythrozyten.....	6
1.4.1 Zytoadhäsion .....	6
1.4.1.1 Die Mediatoren der Zytoadhäsion: <i>var</i> -Gene und <i>PfEMP1</i> -Proteine.....	7
1.4.1.2 Knobs .....	8
1.4.1.3 Die Zytoadhäsion und Endothelzellen.....	9
1.4.2 Zytoadhäsion und die dadurch induzierte Signaltransduktion .....	11
1.4.2.1 NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren und Signalweg .....	11
1.4.2.2 Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch den TNF Signalweg .....	13
1.4.2.3 MAPK Signalwege .....	14
1.4.2.4 TLR und NOD-like Rezeptoren und Signalwege.....	15
1.4.2.5 TGF-beta signaling pathway .....	16
1.5 Zielsetzung.....	17
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Materialien .....	19
2.1.1 Laborgeräte .....	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.3 Chemikalien .....	20
2.1.4 Kits .....	20
2.1.5 Enzyme und Zytokine .....	21
2.1.6 DNS-Standard .....	21
2.1.7 Medium und Zusätze.....	21
2.1.8 Antikörper.....	21
2.1.9 Puffer und Lösungen .....	22
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Zellbiologische Methoden .....	22
2.2.1.1 Zellkultur.....	22

2.2.1.1.1	HBEC-5i (ATCC CRL-3245) Gehirndothelzelllinie .....	22
2.2.1.1.2	CHO-745-Zelllinie (ATCC No. CRL 2242) .....	23
2.2.1.1.3	Kultivierung von Plasmodium falciparum .....	23
2.2.1.2	Bestimmung der Parasitämie .....	24
2.2.1.3	Synchronisation .....	24
2.2.1.4	Anreicherung („panning“) von P. falciparum infizierten Erythrozyten auf die Bindung an HBEC-5i Zellen .....	24
2.2.1.5	Zell-ELISA .....	25
2.2.1.6	Bindungs-Assay.....	26
2.2.1.6.1	Inhibitions-Assay mit löslichem Chondroitin-4-sulfat .....	27
2.2.1.6.2	Inhibitions-Assay mit Chondroitinase ABC.....	27
2.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	28
2.2.2.1	Mykoplasmen-PCR.....	28
2.2.2.2	Quantitative real-time PCR.....	29
2.2.2.3	Agarosegel-Elektrophorese .....	30
2.2.2.4	Trypsin-Assay und Proteinnachweis mittels Western Blot .....	30
2.2.2.4.1	Probenaufbereitung .....	30
2.2.2.4.2	SDS-Gelelektrophorese .....	31
2.2.2.4.3	Western Blot-Analyse.....	31
2.2.2.5	Elektronenmikroskopie .....	32
2.2.2.6	RNS-Isolation .....	32
2.2.2.7	Transkriptomanalyse .....	33
2.2.2.7.1	Aufarbeitung der Transkriptom-Daten.....	33
2.2.2.7.2	Funktionelle Analyse .....	34
3.	Ergebnisse.....	35
3.1	Voruntersuchungen.....	35
3.1.1	Reaktionszeit der Gehirndothelzellen auf extrazelluläre Stimuli.....	35
3.1.2	Bestimmung des optimalen Volumens für die Transkriptomanalyse .....	36
3.1.3	Supplementation der Patienten-Plasmen mit Heparin .....	37
3.1.4	Auswahl der Patienten-Plasmen für die Transkriptom-Studie.....	38
3.1.5	Anreicherung von Parasitenpopulationen auf die Gehirndothelzellen .....	39
3.1.6	Experimenteller Aufbau.....	41
3.2	Effekt der Zytoadhäsion an Gehirndothelzellen und febrilen Temperatur auf <i>P. falciparum</i> .....	42
3.2.1	Effekt der Zytoadhäsion an Gehirndothelzellen und febrilen Temperatur auf die <i>P. falciparum var</i> -Gen Expression .....	42

3.2.2	Erhöhte Bindungskapazität an Chondroitin-Sulfat A (CSA) bei Parasiten mit erhöhter <i>var</i> -Gen Expression.....	45
3.2.3	Zytoadhäsion an Gehirndothelzellen bei Fieber induziert die Knob-Bildung .....	47
3.2.4	Erhöhte Bindungskapazität durch Anreicherung bei febrilen Temperaturen bleibt über einen längeren Zeitraum erhalten .....	49
3.2.5	Effekte der Zytoadhäsion von <i>P. falciparum</i> und Fieber auf die Gehirndothelzellen	50
3.2.6	Einordnung der differentiell exprimierten Gene nach Gen Ontologien.....	53
3.2.7	Stoffwechselweg-Analyse.....	56
3.2.8	Stimulation der Gehirndothelzellen mit Patienten-Plasma .....	69
4.	Diskussion.....	72
4.1	Voruntersuchungen.....	73
4.2	Effekt der Zytoadhäsion und Fieber auf die <i>P. falciparum</i> infizierten Erythrozyten.....	76
4.3	Effekt von Zytoadhäsion und erhöhter Temperatur auf die Gehirndothelzellen .....	81
4.4	Stimulation der Gehirndothelzellen durch Patienten-Plasma .....	95
4.5	Fazit .....	96
	Anhang .....	99
	Danksagung .....	100
	Literaturverzeichnis.....	102

## Abkürzungsverzeichnis

ATS	engl. <i>acidic terminal segment</i>
BAFF	engl. <i>B-cell activating factor</i>
BCL3	engl. <i>B-cell lymphoma 3-encoded protein</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMP	engl. <i>bone morphogenic proteins</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CIDR	engl. <i>cystein-rich interdomain regions</i>
CM	engl. <i>cerebral malaria</i>
CSA	Chondroitin Sulfat A
DBL	engl. <i>Duffy-binding like</i>
DUSP	engl. <i>dual-specific phosphatase</i>
ECM	<i>experimantelle CM</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
eNOS	<i>endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
EPCR	engl. <i>endothelial protein C receptor</i>
ERK	engl. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FGF	engl. <i>fibroblast growth factor</i>
GADD45	engl. <i>growth arrested DNA-damage 45</i>
GM-CSF	engl. <i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HSP	engl. <i>heat shock protein</i>
ICAM-1	engl. <i>intracellular adhesion molecule-1</i>
ID	engl. <i>inhibitor of DNA binding</i>
IKK	I $\kappa$ B-Kinasen
IL	Interleukin
I $\kappa$ B	engl. <i>inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>
JNK	engl. <i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KAHRP	engl. <i>knob-associated histidin-rich protein</i>
KAHsp40	engl. <i>knob-associated heat shock protein 40</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	engl. <i>magnetic cell separation</i>
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MESA	engl. <i>mature parasite-infected erythrocyte surface antigen</i>
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
mRNS	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
NF- $\kappa$ B	engl. <i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
NIK	engl. <i>NF-<math>\kappa</math>B-inducing kinase</i>
NLS	engl. <i>nuclear location sequence</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NTS	engl. <i>N-terminal segment</i>
PAM	engl. <i>pregnancy associated malaria</i>
PAMPs	engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PfEMP1	engl. <i>Plasmodium falciparum erythrozyte membrane protein 1</i>
PfEMP2	engl. <i>Plasmodium falciparum erythrozyte membrane protein 2</i>
PfEMP3	engl. <i>Plasmodium falciparum erythrozyte membrane protein 3</i>
PfSir2a/b	engl. <i>silent information regulator's A and B</i>
PHIST	engl. <i>Plasmodium helical interspersed subtelomeric</i>

PRR	engl. <i>pattern recognition receptor</i>
RESA	engl. <i>ring-infected erythrocyte antigen</i>
RIN	engl. <i>RNA integrity number</i>
RIP1	engl. <i>receptor interactin protein 1</i>
RT	Raumtemperatur
sCSA	engl. <i>solubleCSA</i>
SODD	engl. <i>silencer of death domain</i>
TAB	engl. <i>TAK1-binding proteins</i>
TADD	engl. <i>TNFR-associated death domain</i>
TAK1	engl. <i>TGF-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TEER	engl. <i>transendothelial electrical resistance</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNFR	TNF-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAF	engl. <i>TNF-receptor-associated factor</i>
USP	US-pharmazeutischen Units
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	engl. <i>vascular endothelial growth factor Rezeptor</i>
WHO	engl. <i>world health organisation</i>

## Zusammenfassung

Bei der Malaria handelt es sich um eine Infektionskrankheit, welche während der Blutmahlzeit einer weiblichen *Anopheles* Mücke auf den Menschen übertragen wird. Durch den Speichel gelangen Parasiten der Gattung *Plasmodium* in den menschlichen Wirt, wobei zum jetzigen Zeitpunkt fünf humanpathogene *Plasmodium* Arten bekannt sind. Dabei kann eine Malaria Infektion unterschiedlich schwere Verlaufsformen aufweisen und die zerebrale Malaria, welche durch *P. falciparum* Infektionen hervorgerufen werden kann, ist eine der schwersten Formen. Ein Hauptpathogenitätsfaktor der zerebralen Malaria (engl. ‚*cerebral malaria*‘ (CM)) ist die Sequestrierung, beziehungsweise die Zytoadhäsion *P. falciparum* infizierter Erythrozyten an Gefäßendothelzellen im Gehirn. Gebundene infizierte Erythrozyten stören den Blutfluss in den Gefäßen, was zu einer Unterversorgung an Sauerstoff und Nährstoffen im angrenzenden Gewebe führen kann. Zusätzlich aktivieren die adhärenen infizierten Erythrozyten das Gefäßendothel und induzieren eine Immunantwort, die den Verlauf der Infektion mit beeinträchtigen kann. Ziel der Arbeit war es mittels neuester *next generation sequencing*-Methoden transkriptionelle Veränderungen im Parasiten und in den Gehirndothezellen zu untersuchen, die durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Hierzu zählten die Zytoadhäsion, Fieber und Signalmoleküle im Plasma von Malariapatienten. Darüber hinaus sollte auf Seiten der Parasiten untersucht werden, inwieweit unterschiedliche Temperaturen das Bindungsverhalten der infizierten Erythrozyten beeinflussen.

Nachdem die Rahmenbedingungen der Transkriptom-Studie bestimmt wurden, wurden die transkriptionellen Veränderungen im infizierten Erythrozyten analysiert. Hierbei wurde untersucht, wie sich die Zytoadhäsion bei normaler Körpertemperatur, von der unter Fieberbedingungen unterschied. So zeigten Parasiten, die bei 40°C auf die Bindung auf Gehirndothezellen angereichert wurden, eine deutlich erhöhte Bindungskapazität im Vergleich zu den Parasiten, welche bei normaler Körpertemperatur angereichert wurden. Diese Veränderung im Bindungsphänotyp ließ sich auf zwei Faktoren zurückführen. Zum einen wurde die Expression der *var*-Gene und somit die Präsentation der *PfEMP1* Proteine auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten erhöht. Zum anderen induzierte die Anreicherung an Gehirndothezellen bei 40°C die Bildung von Knobs, in welchen die *PfEMP1* Proteine mit dem Zytoskelett der Wirtszelle verbunden werden. Es zeigte sich

ebenfalls, dass dieser erhöhte Bindungsphänotyp über mehrere Replikationszyklen erhalten bleibt und sich zumindest teilweise durch Zytoadhäsion an Gehirnendothelzellen bei 37°C reduzieren ließ. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass Endothelzellen, zumindest bei Fieber, die Transkription des Parasiten beeinflussen und somit den pathophysiologischen Verlauf einer CM mitbestimmt.

Im nächsten Abschnitt der Arbeit wurden die transkriptionellen Veränderungen nach Zytoadhäsion infizierter Erythrozyten bei 37°C und 40°C in den Gehirnendothelzellen untersucht. Durch die Kombination der beiden Stimuli, wurde die Zahl der differentiell exprimierten Gene in den Gehirnendothelzellen nahezu verdoppelt, verglichen mit der Zahl an differentiell exprimierten Genen, die jeder Stimuli isoliert induzierte. Dabei stellte sich allerdings heraus, dass durch die Zytoadhäsion induzierte transkriptionelle Veränderung unabhängig von der Temperatur ähnliche biologische Prozesse beeinflussten. So zeigte sich in Folge der Zytoadhäsion, dass die Bindung über Signalwege zu einer veränderten Genexpression führt. Die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B nahmen hierbei eine zentrale Rolle ein. Die veränderte Genexpression induzierte verschiedene biologische Prozesse, wobei eine inflammatorische Immunantwort, apoptotische Prozesse und Angiogenese im Fokus standen. Es wurde auch deutlich, dass bei 40°C die differentielle Expression der Gene in diesen biologischen Prozessen stärker ausfiel als bei 37°C. Ebenso zeigte sich, dass Patienten-Plasmen zu transkriptionellen Veränderungen führte, die mit ähnlichen biologischen Prozessen assoziiert sind. Allerdings ist die Zahl der differentiell exprimierten Gene, die durch Ko-Inkubation mit Patienten-Plasma in der Gehirnendothelzellen induziert wurden, deutlich geringer als zuvor bei der Zytoadhäsion beobachtet. Die Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass Fieber, beziehungsweise eine Kombination mehrerer Stress-Stimuli, die regulatorischen Mechanismen verschiedener biologischer Prozesse beeinträchtigen und so den Verlauf und die Schwere der Infektion beeinflussen.

# 1. Einleitung

## 1.1 Malaria – Erfolge und Rückschläge

Am 11. Juni 2018 war es wieder so weit. Mit Paraguay wurde das erste Mal seit 1973 wieder ein Land der WHO Region ‚Americas‘ als Malaria-frei erklärt. Seit 1950 entwickelte Paraguay Richtlinien und Programme, mit dem Ziel die Krankheit einzudämmen. Dies mit Erfolg, denn seit 2011 wurde keine weitere Malariaerkrankung in Paraguay registriert (WHO 2018). Das Beispiel Paraguay zeigt eindrücklich, dass durch koordinierte Investitionen in das Gesundheitssystem eines Landes, die Malaria eine beherrschbare Krankheit ist. Das Gegenbeispiel zu Paraguay ist Venezuela. Im Jahr 1961 wurden nördliche Regionen Venezuelas als Malaria-frei deklariert und Venezuela galt als Musterbeispiel für den Kampf gegen die Malaria. Seit Einsetzen der ökonomischen Krise im Jahr 2008 ist die Zahl der Malariafälle in Venezuela allerdings kontinuierlich gestiegen. Der größte Anstieg an Malariafällen wurde vom Jahr 2015 auf das Jahr 2016 registriert um 76% von 136.402 auf 240.613 (WHO 2017). Im gleichen Zeitraum, bedingt durch die ökonomische Krise, wurden die Ausgaben der Regierung im Kampf gegen Malaria von 10 Mio. USD auf 2,2 Mio. USD gesenkt (WHO 2017). Nach großen Erfolgen im Kampf gegen die Malaria in den letzten 15 Jahren ist die Zahl der weltweit registrierten Malariaerkrankungen leicht gestiegen. Seit 2015 ist die Zahl an Malariaerkrankten von 214 Mio. pro Jahr auf 219 Mio im Jahr 2017 gestiegen, dabei blieb die Inzidenzrate allerdings auf demselben Niveau (WHO 2018). Die meisten Malariafälle wurden in der WHO Region ‚Africa‘ registriert. Mit 200 Mio. Malariafällen im Jahr 2017, was 92% aller weltweit registrierten Malariafälle entspricht. In Folge der 219 Mio. Malariaerkrankungen weltweit starben 435.000 Menschen, davon 266.000 Kinder unter dem 5 Lebensjahr (WHO 2018).

Tab. 1: Geschätzte Zahl der Todesopfer durch eine Malaria-Infektion in den Jahren 2010 bis 2017 (Quelle: Daten basieren auf Zahlen aus dem ‚world malaria report 2018‘ der Weltgesundheitsorganisation (WHO))

WHO Region	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
African	555000	517000	489000	467000	446000	432000	413000	403000
Americas	480	450	400	400	300	320	460	630
Eastern Mediterranean	8070	7280	7340	6750	8520	8660	8160	8300
European	0	0	0	0	0	0	0	0
Sout-Est Asia	39800	32800	28400	21800	24100	25200	25600	19700
Western Pacific	3770	3340	3850	4600	4420	2860	3510	3620
World	607000	561000	529000	500000	483000	469000	451000	435000
World (Kinder unter 5 Jahren)	44600	405000	371000	344000	322000	302000	283000	266000

## 1.2 Krankheitsbild der Malaria

Die Malaria ist eine Infektionskrankheit, die durch das parasitische Protozon *Plasmodium* ausgelöst wird. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden 5 humanpathogene *Plasmodium*-Arten identifiziert, wobei *Plasmodium falciparum* für die meisten Todesfälle verantwortlich ist. Eine Infektion mit *P. falciparum* wird auch als Malaria *tropica* bezeichnet, die unterschiedliche Verlaufsformen hat. So kann eine *P. falciparum* Infektion asymptomatisch verlaufen. Bei einer milden Malariaerkrankung sind die Symptome oft unspezifisch und ähneln denen einer viralen Infektion. Die meisten Patienten entwickeln Fieber (>92% der Fälle), Schüttelfrost (79%), Kopfschmerzen (70%) und eine Diaphoresis (69%) (Trampuz et al., 2003). Eine Infektion mit *P. falciparum* kann auch einen schwereren Verlauf nehmen, wobei eine zerebrale Malaria (engl. *cerebral malaria (CM)*) mit zu den gefährlichsten Krankheitsverläufen zählt. Patienten mit einer CM können innerhalb von Stunden bis Tagen ins Koma fallen und versterben. Eine schwere Malaria ist definiert als eine Erkrankung bei der eine oder mehrere der folgenden Symptome oder Laborparameter vorkommen: Eingeschränktes Bewusstsein, Atemnot, Krämpfe, allgemeine Erschöpfung, Schock, pulmonales Ödem, abnormale Blutungen, Gelbsucht, schwere Anämie, Hypoglykämie, Azidose, Hyperlaktatämie, eingeschränkte Nierenfunktion und Hyperparasitämie (WHO severe malaria 2014). Durch wiederholende *P. falciparum* Infektionen, erlangen die Bewohner in Malaria-endemischen Regionen eine Semi-Immunität (Doolan et al., 2009). Diese schützt gegen den schweren Verlauf der Krankheit. Die Semi-Immunität baut sich allerdings erst in den ersten Lebensjahren auf, sodass bei Kindern unter 5 Jahren das Risiko einer schwer verlaufenden Malaria erhöht ist (Doolan et al., 2009). Eine weitere Risikogruppe sind Frauen während ihrer ersten Schwangerschaft. Diese können, trotz Semi-Immunität der Mutter, eine Schwangerschaft-assoziierte Malaria (engl. *„pregnancy associated malaria“* (PAM)) entwickeln (Moya-Alvarez et al., 2014).

Die Überlebenschancen eines Malaria *tropica* Patienten hängen von der zeitnahen und richtigen medizinischen Behandlung ab. Dafür ist eine richtige Diagnose der Erkrankung wichtig. Eine Malariadiagnose zielt auf die Identifizierung des Parasiten und/oder deren Antigene im Blut des Patienten ab (Tangpukdee et al., 2009). Am Anfang einer Erkrankung ist eine Schnelldiagnose aufgrund der klinischen Verdachtssymptome schwierig, da die meisten der oben genannten Symptome sehr unspezifisch sind. Über verschiedene labordiagnostische Verfahren (Tangpukdee et al., 2009) lässt sich eine Erkrankung als

Malariaerkrankung identifizieren. Die oft als „Goldstandard“ bezeichnete Nachweismethode ist der mikroskopische Nachweis. Dabei werden dünne oder dicken Blutaussstrichen („der dicke Tropfen“) des peripheren Bluts angefertigt (Tangpukdee et al., 2009). Durch eine anschließende Färbung mit Giemsa, Wright's oder Field *staining* lassen sich die Parasiten mikroskopisch nachweisen (Warhurst and Williams, 1996).

### 1.3 Der Lebenszyklus

Eine Infektion im menschlichen Wirt beginnt mit der Übertragung des Parasiten während der Blutmahlzeit einer weiblichen *Anopheles*-Mücke (Familie ‚*Culicidae*‘). Bei einer nicht-immunen Person dauert es 9-14 Tage bis erste Symptome auftreten (Bartoloni and Zammarchi, 2012). Diese Zeitspanne lässt sich aufgrund des komplexen Lebenszyklus des Parasiten erklären. Nachdem die Parasiten, in Form von Sporozoiten, während der Blutmahlzeit mit dem Insekten saliva in den menschlichen Wirt eingedrungen sind, gelangen diese innerhalb weniger Minuten in die Blutbahn (Sidjanski and Vanderberg, 1997). Über die Blutbahn gelangen die Sporozoiten in die Leber. Sobald sie die Lebersinusoiden (Kapillaren in der Leber) erreicht haben, verlassen die Sporozoiten den Blutstrom über die Endothelzellen oder Kupffer Zellen (Baer et al., 2007; Tavares et al., 2013). Es folgt eine Transmigration durch mehrere Hepatozyten, bis der Parasit eine geeignete Wirtszelle infiziert (Mota et al., 2001). Dabei bildet er eine parasitophore Vakuole, in der sich der Parasit entwickeln kann. In der intra-hepatozytischen Phase, entwickeln sich aus den Sporozoiten Trophozoiten und anschließend Schizonten (Kaushansky and Kappe, 2015). Während dieser Phase repliziert der Parasit sein Genom zwischen  $10^4$  bis  $10^5$  Mal (Kaushansky and Kappe, 2015). Am Ende dieses asexuellen Replikationszyklus bilden sich mehrere tausend Merozoiten, welche sich in abschnürenden Vesikeln, sogenannten Merosomen, wieder in die Lebersinusoide entlassen (Sturm et al., 2006). Nachdem sich die Membran der Merosomen aufgelöst hat, zirkulieren die Merozoiten frei in der Blutbahn und infizieren dort Erythrozyten. Somit beginnt die intraerythrozytäre Replikationsphase im Lebenszyklus des Parasiten. Erst ab dieser Phase können die oben genannten Symptome einer Erkrankung auftreten (Bartoloni and Zammarchi, 2012). Nach der Invasion des Erythrozyten entwickelt sich der Merozoit vom Ringstadium über ein Trophozoitenstadium zum Schizonten (Cowman et al., 2016). Am Ende der Entwicklung bilden sich im infizierten Erythrozyten bis zu 32 neuer Merozoiten, die beim Austritt des Parasiten aus der Zelle in die Blutbahn entlassen werden. Dort infizieren sie erneut Erythrozyten und der intraerythrozytäre Zyklus beginnt erneut. Insgesamt dauert ein

Zyklus ca. 48 Stunden und die Wiederholung diese Phase dient dazu, die Parasitenlast zu erhöhen. Bei einer *P. falciparum* Parasitämie (Verhältnis von infizierten Erythrozyten zu nicht-infizierten Erythrozyten) von 1% befinden sich in einem Milliliter Blut 40 000 000 Parasiten (Tripathi et al., 2009). Einige Merozoiten entwickeln sich im infizierten Erythrozyten auch in sexuelle Stadien, sogenannte Gametozyten. Nur diese können nach einer weiteren Blutmahlzeit durch eine weibliche *Anopheles* Mücke aufgenommen werden und den Lebenszyklus in der Mücke weiterführen (Nixon, 2016). Die weiblichen (Makrogametozyten) und männlichen (Mikrogametozyten) Gametozyten fusionieren im Mückendarm und bilden eine Zygote (Aly et al., 2009).

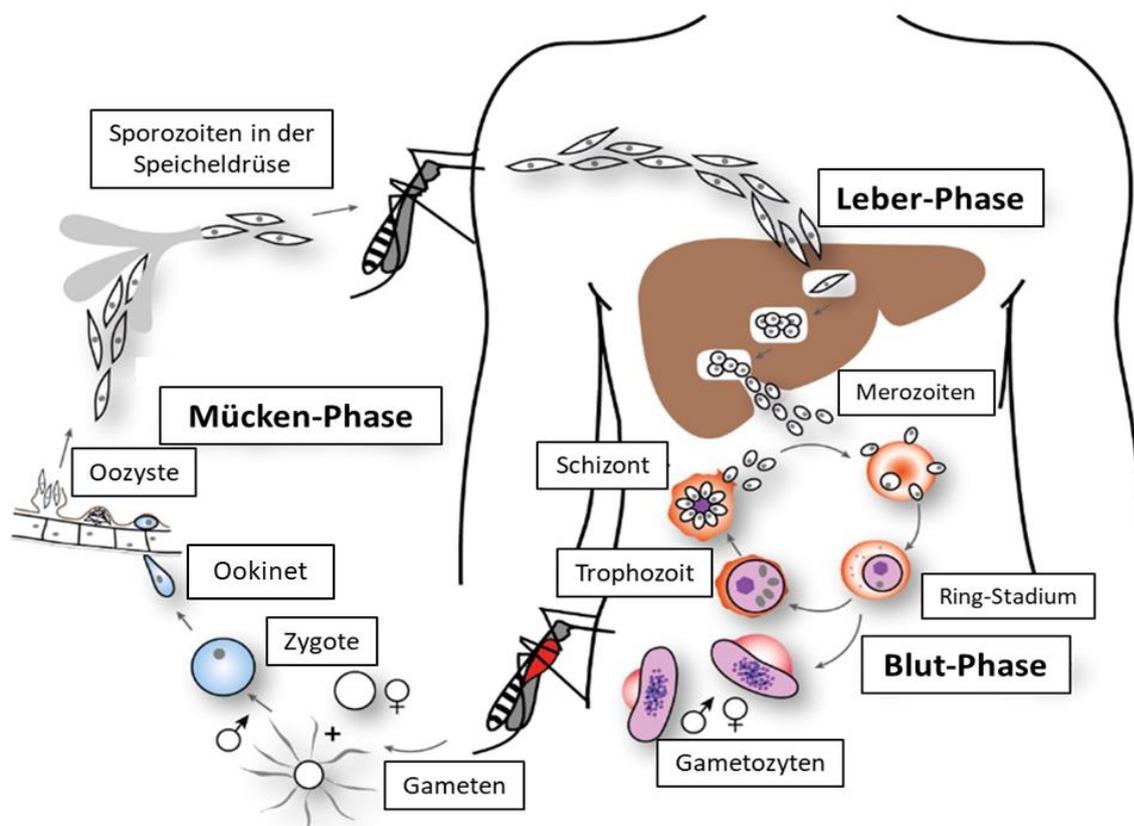


Abb. 1: Während der Blutmahlzeit einer weiblichen *Anopheles*-Mücke injiziert diese Sporozoiten in den menschlichen Wirt. Über den Blutkreislauf erreichen die Sporozoiten die Leber, wo sie Hepatozyten infizieren. In den Hepatozyten beginnt die Leber-Phase in der sich exoerythrozytäre Merozoiten bilden, welche in den Blutfluss entlassen werden. Merozoiten infizieren Erythrozyten und entwickeln sich von dem Ring-Stadium über das Trophozoit-Stadium bis zu Schizonten. Am Ende eines Replikationszyklus in der Blutphase werden Merozoiten in den Blutfluss entlassen, welche erneut nicht-infizierte Erythrozyten infizieren. Während der Blut-Phase entwickeln sich männliche und weibliche Gametozyten, die während der Blutmahlzeit einer weiteren *Anopheles*-Mücke und im Darm der Mücke zu Gameten. Nach der Befruchtung entwickeln sich die Zygote und der beweglichen Ookinete, welcher sich in der Wand des Mitteldarms zu einer Oozyste entwickelt. Reife Sporozoiten wandern nach der Ruptur der Oozyste in die Speicheldrüse der Mücke und von dort werden sie bei der nächsten Blutmahlzeit in den menschlichen Wirt injiziert (modifiziert nach Cowman et al., 2012)

Die Zygote, auch Ookinet genannt, invadiert die Mitteldarmwand der Mücke und entwickelt sich zu einer Oozyste (Aly et al., 2009). Diese wächst und entlässt beim Platzen Sporozoiten, welche zur Speicheldrüse migrieren (Aly et al., 2009). Bei einer anschließenden Blutmahlzeit gelangen die Sporozoiten erneut in einen menschlichen Wirt und der Lebenszyklus beginnt von neuem.

### 1.3.1 Der intraerythrozytäre Replikationszyklus

Merozoiten sind eine ovoide Form der Parasiten deren einzige Aufgabe darin besteht nicht-infizierte Erythrozyten zu finden und zu infizieren (Cowman and Crabb, 2006). Merozoiten haben alle konventionellen eukaryotischen Zellorganellen und besitzen zusätzlich für die Invasion wichtige Zellkompartimente. Diese sind typisch für die Mitglieder der *Apicomplexa*, zu der auch die *Plasmodium spp.* gehören. Am apikalen Pol der Merozoiten befindet sich der apikale Komplex, bestehend aus Mikronemen, Rhoptrien und *Dense Granules* (Cowman and Crabb, 2006). Die Invasion findet über mehrere koordinierte Schritte statt und beginnt mit einem ersten ungerichteten Kontakt zwischen Merozoiten und Erythrozyten (Cowman and Crabb, 2006). Anschließend reorganisiert sich der Merozoit, sodass der apikale Pol in Kontakt mit der Plasmamembran des Erythrozyten steht. Während der Interaktion bilden Proteine aus den Organellen des apikalen Komplexes ‚*tight junctions*‘ zwischen Parasiten und Erythrozyt (Keeley and Soldati, 2004). Daraufhin beginnt die Invasion bis der Merozoit komplett in die Wirtszellen eingedrungen ist. Zuerst bildet sich das parasitäre Ringstadium. 18-36 Stunden nach der Invasion entwickelt sich der Parasit aus dem Ringstadium in das Trophozoitenstadium. Das Trophozoitenstadium zeichnet sich durch ein schnelles Wachstum aus (Leech et al., 1984). Mikroskopisch lässt sich das Stadium daran erkennen, dass die Bildung eines Hämozoin-Pigments zu erkennen ist. Dieses entsteht durch die Metabolisierung des Hämoglobins. Dabei entsteht das toxische Häm, welches von dem Parasiten in Nahrungsvakuolen als unlösliches Hämozoin-Kristall gelagert wird (Slater, 1992) (Pagola et al., 2000). Aus dem Trophozoitenstadium bilden sich nach ca. 36 Stunden Schizonten (Gerald et al., 2011). Durch mitotische Kernteilung wird das Genom mehrfach repliziert, sodass ein syncytialer Schizont mit 16-22 Nukleoli entsteht (Gerald et al., 2011). Diese werden nach dem Platzen des infizierten Erythrozyten in die Blutbahn entlassen, sodass die Merozoiten erneut Erythrozyten infizieren können.

## 1.4 Modifizierung des infizierten Erythrozyten

Der Erythrozyt ist eine hochspezialisierte Zelle, dessen Aufgabe aus dem Transport von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid besteht. Durch das Fehlen von Zellorganellen, wie zum Beispiel den Zellkern, besitzt das Zytoplasma der Erythrozyten eine niedrige Viskosität. Zusammen mit der Anordnung des Zytoskeletts führen diese Eigenschaften zu einer großen Elastizität des Erythrozyten (Moxon et al., 2011). Darüber hinaus besitzen Erythrozyten große Mengen an Hämoglobin, sind allerdings arm an Nährstoffen und besitzen keine vesikulären Transportwege, die von vielen Pathogenen bei Ein- und Austritt in die Zelle genutzt werden (Elsworth et al., 2014). Eine Herausforderung für den Parasiten ist das Hämoglobin als einzige Nahrungsquelle im Erythrozyten. So fehlt im Hämoglobin die Aminosäure Isoleucin und es dient nur als limitierte Quelle für Cystein, Glutamat, Methionin, Prolin und Tyrosin (Divo et al., 1985; Guidotti et al., 1962; Hill et al., 1962). Allerdings besitzen Erythrozyten auch Vorteile für den Parasiten. Das Fehlen von ‚*major histocompatibility complexes*‘ (MHC) in der Wirtszelle verhindert, dass parasitäre Antigene prozessiert und auf der Oberfläche Immunzellen präsentiert werden. Der Parasit kann sich somit im Erythrozyten vor dem Immunsystem verstecken. Damit der Parasit in der Wirtszelle überleben kann, finden daher diverse molekulare Prozesse statt, in denen der infizierte Erythrozyt stark verändert wird (Maier et al., 2009).

### 1.4.1 Zytoadhäsion

Eine der wichtigen Modifikationen der Wirtszelle ist der Export von Membranproteinen. Wie bereits erwähnt, versteckt sich der Parasit in den Erythrozyten vor dem Immunsystem. Um in der Wirtszelle überleben zu können sind weitreichende Modifikationen des Erythrozyten notwendig. Der Parasit befindet sich nach der Invasion in einer parasitophoren Vakuole, die von einer parasitophoren Vakuolenmembran umschlossen ist. Davon ausgehend bilden sich Membransysteme; das tubovesikuläre Netzwerk und die Maurischen Spalten (Haldar and Mohandas, 2007). Diese übernehmen wichtige Funktionen in dem Proteintransport und der Aufnahme von Nährstoffen (Haldar and Mohandas, 2007; Lauer et al., 1997; Mundwiler-Pachlatko and Beck, 2013). Diese Veränderungen im infizierten Erythrozyten beeinträchtigen allerdings stark die Morphologie und die Elastizität der Wirtszelle. Diese veränderten Eigenschaften würden die Passage durch die Milz verhindern und der infizierte Erythrozyte würde durch phagozytierende Immunzellen aus dem Blutkreislauf entfernt werden (Del Portillo et al., 2012). Um einer Detektion durch das Immunsystem in der Milz zu entgehen,

haben die Parasiten eine Methode entwickelt, die Zytoadhäsion, beziehungsweise Sequestrierung, genannt wird. Die Immunevasion durch Zytoadhäsion ermöglicht es dem infizierten Erythrozyten an die Wände der Blutgefäße zu adhären und so den zirkulierenden Blutstrom zu verlassen. Die Zytoadhäsion ist ein Hauptpathogenitätsfaktor einer *P. falciparum* verursachten Malariaerkrankung. Durch die Sequestrierung in mikrovaskulären Gefäßen, kann es zur Blockierung des Blutstroms kommen. Dies wiederum kann zu Unterversorgung des angrenzenden Gewebes, mit Sauerstoff (Hypoxia) und essentiellen Nährstoffen führen (Dondorp et al., 2004). Eine Unterversorgung führt zu Gewebsschädigungen bis hin zum Versagen des gesamten Organs. So finden sich adhärierende, infizierte Erythrozyten in mikrovaskulären Gefäßen des Gehirns bei CM Patienten. Adhärenz infizierte Erythrozyten an pulmonale Gefäße, entwickelt der Patient Symptome wie Atemnot und pulmonale Ödeme (Taylor et al., 2012).

#### 1.4.1.1 Die Mediatoren der Zytoadhäsion: *var*-Gene und PfEMP1-Proteine

Vermittelt wird die Zytoadhäsion von Proteinen des Parasiten, die an die Oberfläche des infizierten Erythrozyten transportiert werden. Diese binden an Rezeptoren auf der Oberfläche der vaskulären Endothelzellen. Die Parasiten-Proteine gehören zu der ‚Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1‘ (PfEMP1) Protein-Familie (Smith et al., 2013). Diese werden durch die *var* Multigenfamilie kodiert. Diese Oberflächenmoleküle bieten allerdings einen Angriffspunkt für das Immunsystem des menschlichen Wirts. Um eine chronische Infektion zu etablieren, finden sich im haploiden Parasiten-Genom daher 60 verschiedene *var*-Gene (Kyes et al., 2001; Su et al., 1995). Hinzu kommt, dass die Sequenz der *var*-Gene in *P. falciparum*-Feldisolaten zusätzlich stark variiert (Pasternak and Dzikowski, 2009; Rask et al., 2010). Ebenfalls wird je intraerythrozytärer Replikationszyklus nur ein *var*-Gen zu selben Zeit exprimiert, sodass auch nur eine PfEMP1 Population auf der Oberfläche präsentiert wird. Die Expression findet hauptsächlich während des Ringstadiums statt, sodass ca. 16 Stunden nach der Invasion die Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche präsentiert werden (Gardner et al., 1996). Das aktive *var*-Gen ist epigenetisch markiert, sodass im nächsten Replikationszyklus sich die *var*-Gen Expression nicht ändert. Allerdings kommt es vor, dass vereinzelte Parasiten das *var*-Gen ‚switchen‘. Daraufhin wird ein bisher stilles *var*-Gen exprimiert und das bisher aktive *var*-Gen wird nicht mehr abgelesen (Scherf et al., 2008). Die genauen Mechanismen, die zum ‚switchen‘ des *var*-Gens führen, sind unklar. Dabei hängt die Häufigkeit, wie oft ein *var*-Gen gewechselt wird, unter

anderem von der Lokalisation auf dem Chromosom ab (Frank et al., 2007). Die *var*-Gene sind zwischen 6 bis 13 kb groß und kodieren auf zwei Exons das 200 bis 350 kDa große *PfEMP1* Protein. Dabei kodiert das erste Exon die variablen extrazellulären Bindungsdomänen zusammen mit der Transmembrandomäne, während das zweite Exon den konservierten intrazellulären Rest des Proteins kodiert (Kyes et al., 2007; Scherf et al., 2008). *Var*-Gene lassen sich in 4 Kategorien unterteilen (A, B, C und E), wobei die jeweilige Lokalisation auf dem Chromosom, die 5'-vorgelagerte Sequenz (*ups*) sowie die Transkriptionsrichtung Beachtung finden (Kyes et al., 2007). Dabei finden sich Gruppe A und B *var*-Gene in den subtelomeren Regionen, wohingegen Gruppe C *var*-Gene in zentralen Regionen auf dem Chromosom liegen. Die Gruppe E besteht nur aus einem *var*-Gen, welches auch *var2csa* genannt wird (Kyes et al., 2007). *PfEMP1* besitzen eine domänenbasierte Struktur. Allen *PfEMP1* gemein ist das am N-Terminus befindliche ‚*N-terminal segment*‘ (*NTS*). Darauf folgen eine variable Kombination von ‚*Duffy-binding like*‘ (*DBL*) Domänen, ‚*Cystein-rich interdomain regions*‘ (*CIDR*) Domänen und C2-Domänen (Smith, 2014). Auf Grundlagen von sequenziellen Unterschieden lassen sich die *DBL*-Domänen in 4 Unterkategorien ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) und die *CIDR*-Domänen in 3 Unterkategorien ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) einteilen. Die genannten Domänen machen den extrazellulären Teil des *PfEMP1* aus. Über eine Transmembrandomäne ist das Protein mit dem infizierten Erythrozyten verbunden. Am C-Terminus befindet sich der intrazelluläre Teil des Proteins, bestehend aus dem konservierten ‚*acidic terminal segment*‘ (*ATS*). Dieser verankert das *PfEMP1* über weitere Parasiten-Protein mit dem Zytoskelett der Wirtzelle (Mayer et al., 2012).

#### 1.4.1.2 Knobs

*PfEMP1* verteilen sich ungleichmäßig auf der Oberfläche des Erythrozyten. In sogenannten Knob-Strukturen sind die *PfEMP1* konzentriert und werden mit dem Aktinfilament der Wirtzelle verankert. Zu erkennen sind Knobs mit dem Elektronenmikroskop als elektronendichte Ausstülpungen der Erythrozytenmembran. Essentiell für die Bildung von Knobs ist das ‚*knob-associated histidine-rich protein*‘ (*KAHRP*). Parasiten, die durch eine Deletion des *kahrp*-Gens kein *KAHRP* bilden können, können auch keine Knobs mehr ausbilden und die Fähigkeit zur Zytoadhäsion unter Fließbedingungen ist stark eingeschränkt (Biggs et al., 1989; Crabb et al., 1997; Horrocks et al., 2005). Ein weiteres bei der Bildung von Knobs beteiligtes Protein ist *PfEMP3*, welches eine Funktion im Transport von *PfEMP1* an die Membran übernimmt (Waterkeyn et al., 2000). Weitere Knob-Proteine sind: ‚*ring-infected*

*erythrocyte antigen*' (RESA), *mature parasite-infected erythrocyte surface antigen*' (MESA/PfEMP2) und Pf332 (Maier et al., 2009). Zusätzlich konnten das *knob-associated heat shock protein 40*' (KAHsp40) und mindestens ein Mitglied der *Plasmodium helical interspersed subtelomeric*' (PHIST) Proteinfamilie als Knob-assoziierte Proteine identifiziert werden (Acharya et al., 2012; Oberli et al., 2014). Aufgebaut sind Knobs als eine Spiralstruktur, welche mit einem elektronendichten Mantel unter der Membran verknüpft ist. Dieser Mantel enthält unter anderem KAHRP und verbindet die knob-Struktur mit den PfEMP1 Proteinen mit dem umliegenden Zytoskelett des Erythrozyten (Watermeyer et al., 2016).

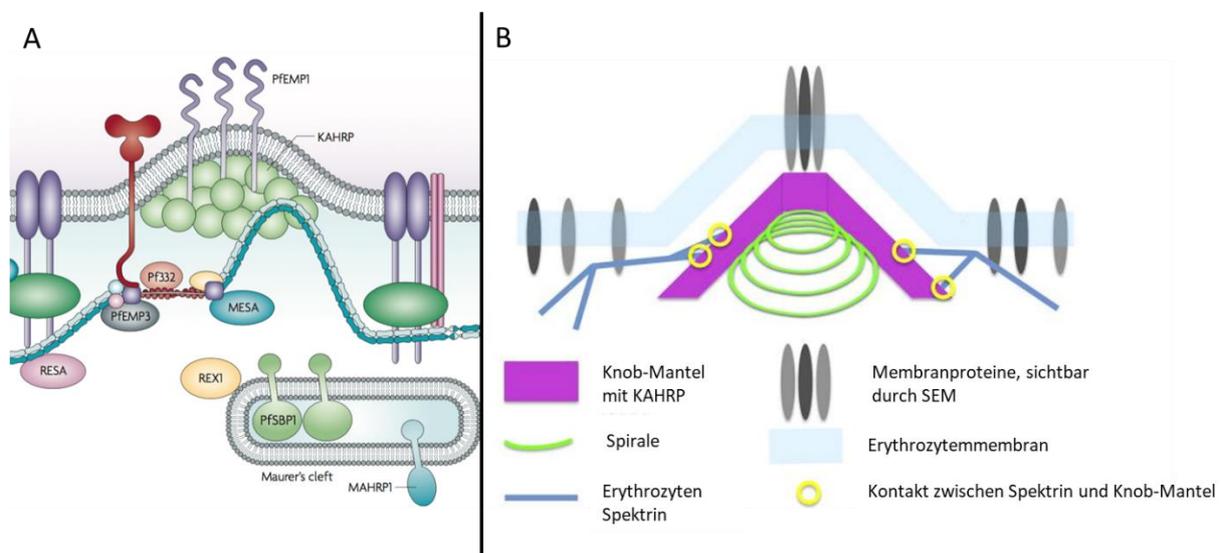


Abb. 2: (A) Aufbau der Knob-Struktur an der Membran der infizierten Erythrozyten. Die Knobs bestehen hauptsächlich aus KAHRP-Proteinen. Weitere Proteine sind PfEMP2/Mesa, PfEMP3, RESA und Pf332. Die Funktion der Knobs besteht in der Verankerung der PfEMP1 Proteine mit der Zytoskelett des infizierten Erythrozyten (Maier et al., 2009). (B) Schematische Darstellung der Organisation der Knob-Strukturen. Über einer Spirale liegt der Knob-Mantel, welcher KAHRP-Proteine beinhaltet und die Knob-Struktur mit dem Spektrin des infizierten Erythrozyten verbindet (modifiziert nach Watermeyer et al., 2016).

#### 1.4.1.3 Die Zytoadhäsion und Endothelzellen

Zum jetzigen Zeitpunkt wurden 23 endotheliale Rezeptoren oder Strukturen identifiziert, die mit infizierten Erythrozyten interagieren (Beeson et al., 2004; Esser et al., 2014; Rowe et al., 2009). Es wird angenommen, dass die Zytoadhäsion der infizierten Erythrozyten an die Gefäßwände unterschiedlicher Organe, durch die Präsentation verschiedener Klassen von PfEMP1-Proteinen vermittelt wird. Über 80% der PfEMP1 der *P. falciparum* Laborstämme 3D7 und FCR3/IT4 besitzen Domänen, die mit der Bindung an CD36 assoziiert sind (Robinson et al., 2003). Für PfEMP1 der Gruppe A mit der DBL $\beta$ -Domäne und PfEMP1 der Gruppe B und C mit der DBL $\beta$ 5-Domäne konnte die Vermittlung der Bindung zu *intracellular adhesion*

*molecule-1'* (ICAM-1) nachgewiesen werden (Bengtsson et al., 2013; Janes et al., 2011; Smith et al., 2000). Die Bindung an ICAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1'* (VCAM-1) und dem *endothelial protein C receptor'* (EPCR) sind mit einem schweren Verlauf einer Malaria-Infektion assoziiert (Avril et al., 2016; Lavstsen et al., 2012; Ockenhouse et al., 1992; Turner et al., 2013). Diese Rezeptoren kommen vermehrt auf mikrovaskulären Gehirndothelzellen und auf Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-stimulierten Endothelzellen vor. Es wird daher angenommen, dass sie für die Ausbildung einer CM mitverantwortlich sind (Kessler et al., 2017; Turner et al., 2013). Für VAR2CSA, das einzige Mitglied der Gruppe E, konnte die Bindung an das Glykosaminoglycan Polysaccharid Chondroitin Sulfat A (CSA) nachgewiesen werden (Rogerson et al., 1995). Im menschlichen Wirt findet die Zytoadhäsion der infizierten Erythrozyten über VAR2CSA an CSA hauptsächlich an die Syncytiotrophoblasten der Plazenta statt (Fried and Duffy, 1996). Die Bindung gilt somit als Hauptpathogenitätsfaktor für die PAM. Ähnlich wie bei Patienten mit einer PAM, konnten bei Autopsien von CM Patienten infizierte Erythrozyten nachgewiesen werden. Bei CM Patienten adhärten die infizierten Erythrozyten allerdings in den Venen und Kapillaren des Gehirns (Dorovini-Zis et al., 2011; Taylor et al., 2004). Die Zytoadhäsion an endotheliale Strukturen und Rezeptoren im Gehirn wird als wichtiger Pathogenitätsfaktor einer CM angesehen. Die CM ist eine der schwersten Verläufe einer Malaria tropica mit einer Mortalität von 15-20% (Storm and Craig, 2014). Es wird seit Jahrzehnten darüber diskutiert, ob die Zytoadhäsion der Hauptpathogenitätsfaktor für eine CM ist (Storm and Craig, 2014). Trotz der einzigartigen Fähigkeit des Parasiten zur Zytoadhäsion, ist es aufgrund der allgemeinen Symptome für behandelnde Ärzte schwer einer Malaria-Infektion von einer Influenza zu unterscheiden. So zeigte sich in post-mortem Untersuchungen in einer Studie mit malawischen Kindern, denen eine CM diagnostiziert wurde, dass 23% der Kinder an einer anderen Krankheit verstorben waren (Taylor et al., 2004). Als Folge des intraerythrozytären Replikationszykluses und der Zytoadhäsion, findet eine Aktivierung des Immunsystems statt, welche sich schwer von anderen Infektionskrankheiten unterscheiden lässt und ebenfalls Einfluss auf die Pathogenität einer Malariaerkrankung nimmt. So führt die Bindung infizierter Erythrozyten zu einer Aktivierung des Endothels. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren, wie Zytokine und Chemokine. Infolge dessen kann es zu endothelialen Dysfunktionen kommen und apoptotische Prozesse eingeleitet werden (Cunnington et al., 2013). Dabei unterscheiden sich die vaskulären

Endothelzellen je nach Lokalisation in der Genexpression, Morphologie und in der Reaktion auf Pathogene (Kallmann et al., 2002; Vadeboncoeur et al., 2003). Dysfunktionen von Gehirnendothelzellen können die Blut-Hirn-Schranke (BHS) beeinträchtigen. Diese verhindert normalerweise das Eindringen von großen Molekülen und Pathogenen in das angrenzende Gewebe (Cardoso et al., 2010). Eine geschwächte Integrität der BHS kann zum Eindringen von Flüssigkeit in das Gehirn und zytotoxische Ödeme und Gehirnschwellungen führen (Seydel et al., 2015).

#### 1.4.2 Zytoadhäsion und die dadurch induzierte Signaltransduktion

Durch bereits veröffentlichte Transkriptom-Studien, ist bekannt, dass die Zytoadhäsion mit weitreichenden transkriptionellen Veränderungen in den Gehirnendothelzellen einhergeht (Chakravorty et al., 2007; Tripathi et al., 2009). Diese Veränderungen werden ebenfalls in Verbindung mit den pathophysiologischen Vorgängen während einer CM gebracht. Die Zytoadhäsion ist hierfür das Ausgangssignal. Die Adhäsion, beziehungsweise der Kontakt zwischen den infizierten Erythrozyten und der Endothelzelle, wird in den Endothelzellen über verschiedene Signalwege in den Gehirnendothelzellen weitergeleitet. Dies führt zu den erwähnten weitreichenden transkriptionellen Veränderungen, welche verschiedene biologische Prozesse betreffen. Folgende Signal- und Stoffwechselwege werden in dieser Arbeit genauer betrachtet:

##### 1.4.2.1 NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren und Signalweg

Eine Transkriptomstudie von Tripathi und Kollegen untersuchte die Veränderungen der Genexpression von Gehirnendothelzellen nach der Zytoadhäsion von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten *in vitro* (Tripathi et al., 2009). Sie konnten zeigen, dass der ‚*nuclear factor- $\kappa$ B*‘ (NF- $\kappa$ B) Signalweg eine zentrale Rolle in der Koordination der Immun- und Stressantwort einnimmt. Die namensgebenden NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer fünf Mitglieder großen Proteinfamilie. Dazu gehören p65 (RelA), RelB, c-Rel (REL), p105/50 (NF- $\kappa$ B1) und p100/52 (NF- $\kappa$ B2) (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Transkriptionell aktiv sind sie allerdings nur als Homo- und Heterodimeren im Zellkern. In unstimulierten Zellen befinden sich die NF- $\kappa$ B Dimere in ihrer inaktiven Form im Zytosol (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). NF- $\kappa$ B inhibitorische Proteine (I $\kappa$ B) bewirken, dass die ‚*nuclear location sequence*‘ (NLS) des Dimers abgeschirmt und somit eine Translokation in den Zellkern verhindert wird (Huxford et al., 1998; Jacobs and Harrison, 1998). Bekannte inhibitorische

Proteine sind I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$  (Zhang et al., 2017). Darüber hinaus wirken die Vorläufer der NF- $\kappa$ B Proteine NF $\kappa$ B1 und NF $\kappa$ B2 (p105 und p100) inhibitorisch auf die Transkription der NF- $\kappa$ B Zielgene (Beg and Baldwin, 1993). Erst durch proteolytische Spaltung entstehen die aktiven Formen der Transkriptionsfaktoren. Das ‚*B-cell lymphoma 3-encoded protein*‘ (BCL-3) und I $\kappa$ B $\zeta$  sind atypische, inhibitorische Proteine, deren Expression in Folge der Stimulation der Zelle erfolgt (Bours et al., 1993; Yamamoto et al., 2004; Yamazaki et al., 2005). Die genauen Mechanismen der Inhibition sind bei den atypischen I $\kappa$ Bs allerdings nicht bekannt. Die Aktivierung der NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren erfolgt indirekt über die Phosphorylierung der I $\kappa$ Bs mittels I $\kappa$ B-Kinasen (IKKs) mit anschließender Ubiquitinierung und Degradation im Proteasom (Kanarek and Ben-Neriah, 2012). Dies führt zu einer Aufhebung der Interaktion mit dem NF- $\kappa$ B-Dimer und es findet eine Translokation der nun aktiven NF- $\kappa$ B-Dimere in den Zellkern statt und die Transkription der Zielgene wird induziert. Bei IKK handelt es sich um einen Proteinkomplex aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  (NEMO) (Hinz and Scheidereit, 2014). Je nach Stimulus wird zwischen zwei verschiedenen NF- $\kappa$ B Signalwegen unterschieden. Der ‚*canonical NF- $\kappa$ B*‘ Signalweg wird durch inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 (IL-1) und pathogen-assoziierten Molekülen, wie Lipopolysaccharide (LPS), stimuliert (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Die NF- $\kappa$ B Aktivierung erfolgt hauptsächlich über die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ . Über diesen Signalweg wird bevorzugt das Heterodimer aus p50/RelA aktiviert, es ist aber auch eine Aktivierung anderer Dimere möglich (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Der ‚*non-canonical NF- $\kappa$ B*‘ Signalweg wird von bestimmten Mitgliedern der TNF Zytokinfamilie, wie ‚*B-cell activating factor*‘ (BAFF), Lymphotoxin-beta oder CD40-Ligand, stimuliert (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass für die Aktivierung des IKK-Komplexes im diesem Signalweg, die Aktivierung der ‚*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*‘ (NIK) entscheidend ist (Xiao et al., 2004). Viele unterscheidliche Stimuli und Signalwege führen zu einer Aktivierung der NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren. Aufgrund dessen und der hohen Diversität in der Zusammensetzung der Dimere sind die Transkriptionsfaktoren in verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. NF- $\kappa$ B Ziel-Gene sind inflammatorische und immunregulatorische Gene, anti-apoptotische Gene, Gene, die sich positiv auf die Zellproliferation auswirken und Gene negativer *feedback* Regulatoren des NF- $\kappa$ B Signalwegs (Karin et al., 2002; Karin and Lin, 2002).

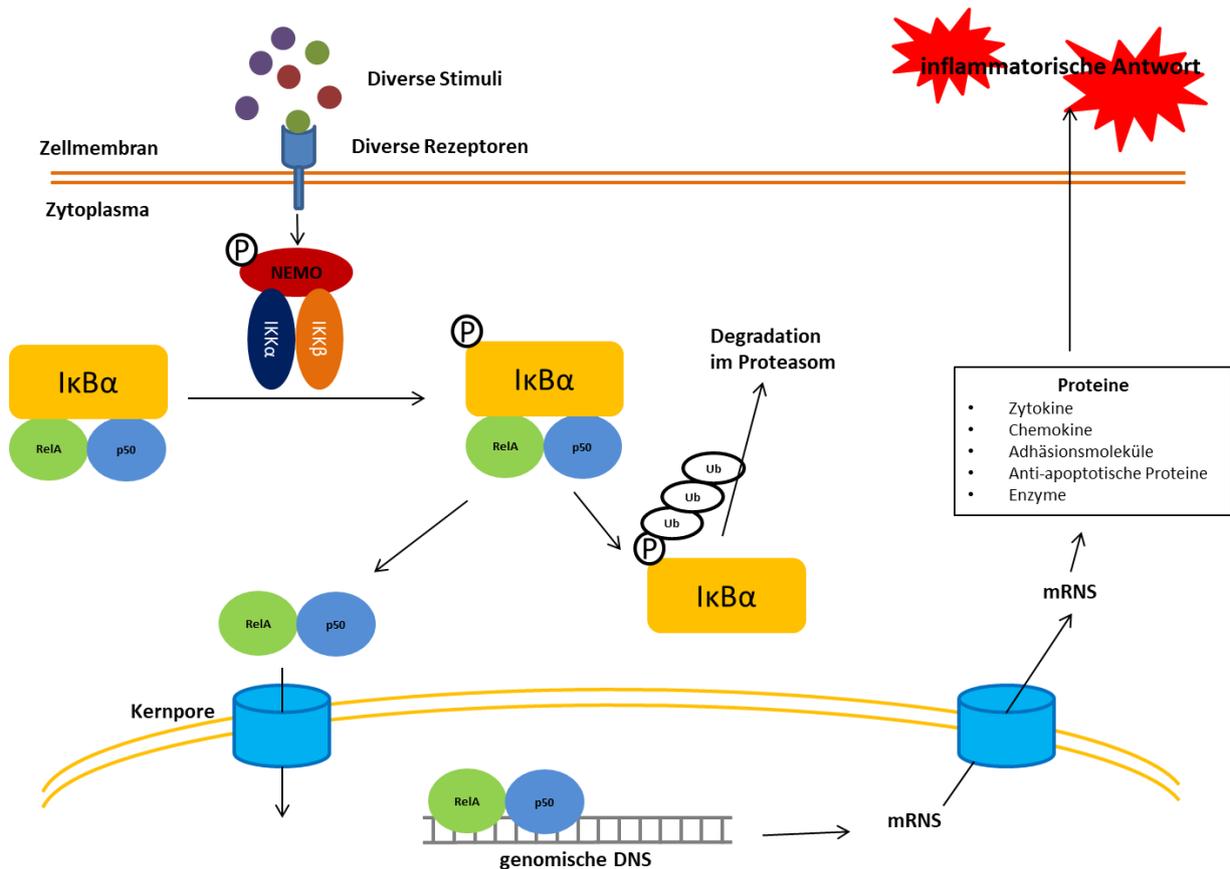


Abb. 3: NF-κB ist ein durch diverse Stimuli induzierbarer Transkriptionsfaktor. Die Bindung des Stimulus an den entsprechenden Rezeptor setzt eine Signalkaskade in Gang, welche zur Phosphorylierung der IKK-Kinase führt. Diese phosphoryliert das inhibitorische Protein IκB (hier exemplarisch IκBα), woraufhin sich dieses von dem NF-κB Dimer (hier exemplarisch RelA und p50/NFκB1) löst, ubiquitiniert und anschließend im Proteasom degradiert wird. Das NF-κB Dimer wandert in den Nukleus, wo es die Transkription diverser Gene induziert. Die mRNA wird in die entsprechenden Proteine umgewandelt und führt unter anderem zu einer inflammatorischen Antwort. (modifiziert nach Liu et al., 2017).

#### 1.4.2.2 Aktivierung von NF-κB durch den TNF Signalweg

Die meisten Signalwege, die zur Aktivierung der NF-κB Transkriptionsfaktoren führen, resultieren in einer Phosphorylierung/Aktivierung des IKK-Komplexes und somit zu der oben genannten Signalkaskade. Ein weitreichend untersuchter Signalweg ist der TNF-α Signalweg über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1). Die Bindung von TNF-α führt zu einem Zusammenschluss von drei TNFR1-Proteinen. Infolgedessen wird am intrazellulären Abschnitt des Proteins ein endogener Inhibitor des TNF-Rezeptors, die ‚silencer of death domain‘ (SODD), abgespalten (Jiang et al., 1999). Dies erlaubt die Bindung des ‚TNFR-associated death domain‘ (TADD) an den Rezeptor, womit die Signaltransduktion über weitere Adapterproteine ermöglicht wird (Ting and Bertrand, 2016). Solche Adapterproteine sind Proteine aus der ‚TNF-receptor-associated factor‘ (TRAF) Proteinfamilie und nehmen eine wichtige Funktion bei der TNF vermittelten Signaltransduktion ein. Eine Deletion von jeweils TRAF2 und TRAF5 hat zwar keinen Einfluss auf die NF-κB-Aktivität, doch ist die IKK-Aktivität bei TRAF2/5 Doppeldeletion

stark eingeschränkt (Yeh et al., 1997). Ein essentielles Adapterprotein für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung über den TNF-Signalweg ist das *receptor interactin protein 1* (RIP1), welches an das NEMO Protein des IKK-Komplexes bindet (Hsu et al., 1996). RIP1 bildet dabei den Kern bei der Ausbildung eines Signalkomplexes, welcher die IKK Aktivität induziert (Delhase et al., 1999). RIP-1 ist ebenfalls in der Lage mit TRAF2 zu interagieren, dabei ist TRAF2 für die Rekrutierung des IKK-Komplexes an den TNFR1-Rezeptor verantwortlich wohingegen RIP1 notwendig für die Aktivierung des Komplexes ist (Devin et al., 2000). Die Aktivierung des IKK-Komplexes über RIP1 wird über einen weiteren Proteinkomplex, bestehend aus *TGF- $\beta$ -activated kinase 1* (TAK1) und *TAK1-binding proteins* (TABs) (Dai et al., 2012) induziert. Neben TNFR1 gibt es den TNFR2 als weiteren Rezeptor, der den *canonical NF- $\kappa$ B* Signalweg (Rauert et al., 2010). TNFR2 kann NF- $\kappa$ B aber auch über den *non-canonical* NF- $\kappa$ B Signalweg aktivieren (Sun, 2011). Ein wichtiges Adapterprotein bei der Signaltransduktion ist auch hier TRAF2, welches an NIK binden kann und zur genannten Aktivierung von NIK führt (Borghi et al., 2016).

#### 1.4.2.3 MAPK Signalwege

Die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalkaskade ist ein komplexer Signalweg, der diverse Prozesse, wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung bis hin zur Apoptose reguliert (Geest and Coffey, 2009). Eine Aktivierung erfolgt über eine weite Bandbreite von Stimuli, infolgedessen es zur Phosphorylierung von unter anderem Transkriptionsfaktoren kommt (Qi and Elion, 2005). Der Signalweg wird in drei Komponenten unterteilt: Der *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), der *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs) und den p38 MAPK Signalweg. Eine Aktivierung dieser Komponenten kann sowohl unabhängig voneinander als auch überlappend sein (Sabio and Davis, 2014). Generell werden die ERKs durch Mitogene und Differenzierungssignale; JNKs und die p38 MAPKs durch Stressstimuli aktiviert (Sabio and Davis, 2014). TNF- $\alpha$  jedoch kann alle drei Komponenten aktivieren (Sabio and Davis, 2014). So können auch TNFR1 und TNFR2 zu einer Aktivierung des JNK MAPK Signalwegs führen (Borghi et al., 2016). Wie bei den Signalwegen zuvor, wird beim MAPK Signalweg ein extrazellulärer Stimulus in eine physiologische Antwort umgewandelt, indem nachgeschaltete Adapterproteine phosphoryliert werden, die wiederum Transkriptionsfaktoren (unter anderem NF- $\kappa$ B), Proteine für die Translation von messengerRNS (mRNS), Proteine des Zytoskeletts und weitere Proteinkinasen aktivieren (Sabio and Davis, 2014). So kann die NF- $\kappa$ B Aktivität über die Blockierung der p38 MAPK

Signalkaskade verringert werden, da MAPK-p38 die Aktivierung von p65 positiv beeinflussen kann (Saha et al., 2007; Vanden Berghe et al., 1998).

#### 1.4.2.4 TLR und NOD-like Rezeptoren und Signalwege

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind ‚*pattern recognition receptors*‘ (PRR), welche von Immunzellen exprimiert werden und Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. ‚*pathogen-associated molecular pattern*‘ (PAMPs)) erkennen. Üblicherweise wird TLR9 durch unmethylierte CpG Sequenzen in DNS Molekülen aktiviert (Kawasaki and Kawai, 2014). Es wurde allerdings gezeigt, dass das durch den Parasiten gebildete Hämozoin ebenfalls von TLR9 erkannt wird und eine Immunantwort hervorruft (Coban et al., 2005). In diesem Fall bindet Hämozoin DNS des Parasiten und vermittelt so indirekt die Bindung an TLR9 (Parroche et al., 2007). Ebenfalls wurde TLR7 als Rezeptor identifiziert, über den Muster von *Plasmodium* Parasiten erkannt werden können (Baccarella et al., 2013). TLR7 erkennt normalerweise GU-reiche Einzelstrang-RNS (Heil et al., 2004; Petes et al., 2017). TLR7/9 kommen nicht wie andere TLRs auf der Zelloberfläche vor, sondern werden nach der Synthese im endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat in die Lysosomen transportiert (Latz et al., 2004). Die Lysosomen fusionieren mit Endosomen und die Bindung von CpG oder Hämozoin an die TLRs setzt eine Signalkaskade über das Adapterprotein MyD88 in Gang (Coban et al., 2005; Takeshita et al., 2004). MyD88 aktiviert über eine Signalkaskade TAK1, dies führt wiederum zu einer bereits oben erwähnten Aktivierung des NF- $\kappa$ B und MAPK Signalweges (Kawai and Akira, 2007). NOD-like Rezeptoren gehören ebenfalls zu den PRR. Sie liegen im Zytosol vor und können über RIP2 und TAK1 zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B und des MAPK Signalweges führen (Shaw et al., 2010). Die Bedeutung der NOD-like Rezeptoren während einer *Plasmodium* Infektion ist umstritten. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei Tieren, bei denen das NLRP3 Inflammasom ausgeschaltet wurde, die Pathogenese einer zerebralen Erkrankung nicht so stark ausfiel, wobei die Parasitämie nicht beeinflusst wurde (Dostert et al., 2009; Shio et al., 2009). Im Gegensatz dazu zeigte eine weitere Studie von Reimer und Kollegen, dass eine CM unabhängig des NLRP3 Inflammasoms verlaufen kann (Reimer et al., 2010). Bei einem NLRP3 Inflammasom handelt es sich um einen Proteinkomplex, welcher sich nach der Bindung des Stimuli an den Rezeptor NLRP3 zu einem Proteinkomplex zusammenschließt, welcher über proteolytische Spaltung die Caspase-1 aktiviert (He et al., 2016). Die Caspase-1 wandelt die

Zytokin-Vorläufer pro-IL1 und pro-IL18 in ihre aktiven Formen, IL1 und IL18, um (Martinon et al., 2002).

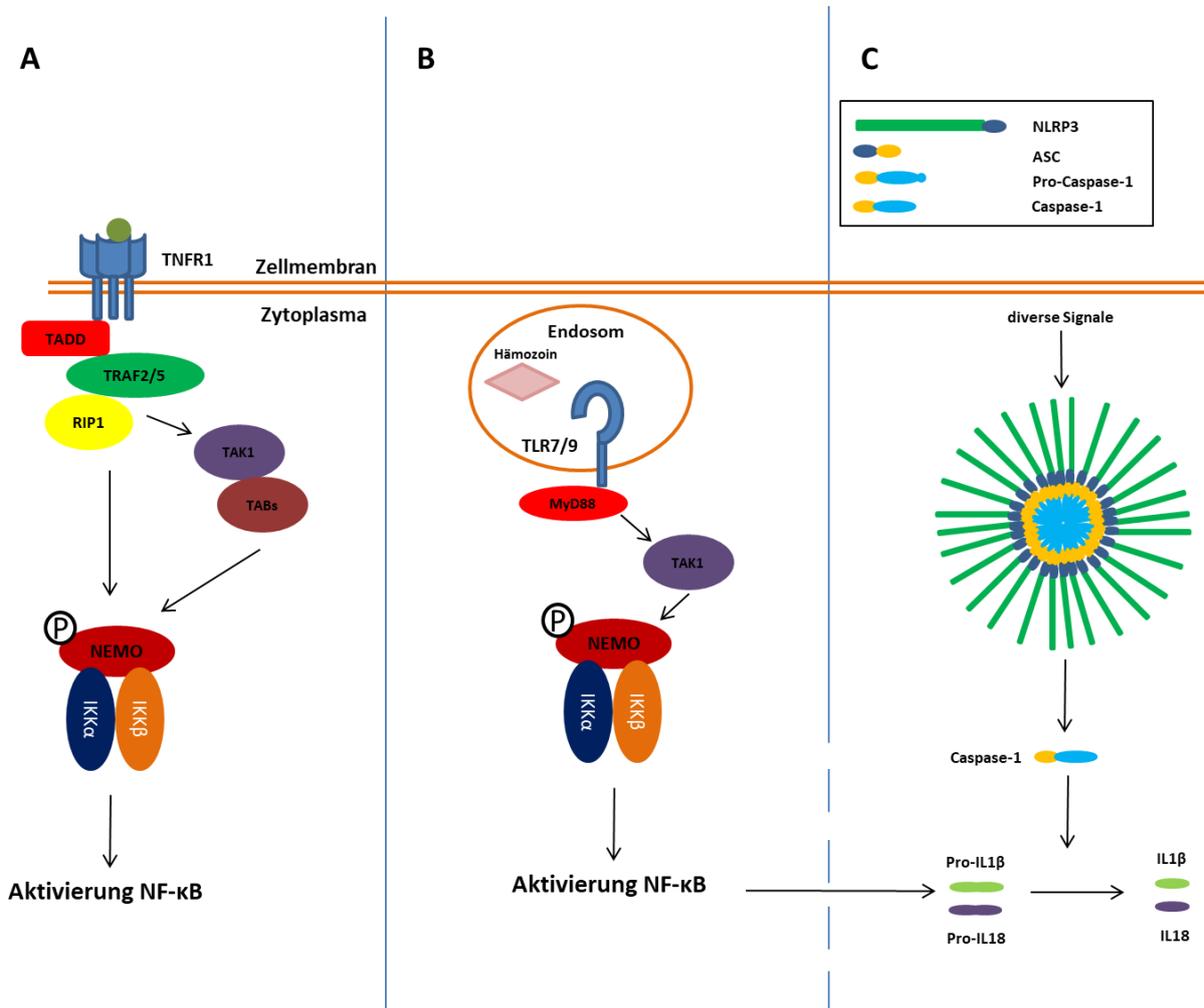


Abb. 4: (A) Die Aktivierung der NF-κB Transkriptionsfaktoren kann von TNFα induziert werden. Das Zytokin bindet an den Rezeptor TNFR1, welcher sich zu einem Komplex aus drei TNFR1-Proteinen zusammenschließt. Dies ermöglicht die Bindung des Adapterproteins TADD und anschließend TRAF2 und 5. Die Phosphorylierung des NEMO des IKK-Komplexes wird unter anderem über RIP1, TAK1 und TABs ermöglicht. Die aktivierte IKK-Kinase aktiviert den Transkriptionsfaktor NF-κB wie in Abb. 3 erklärt. (modifiziert nach Wong and Tergaonkar, 2009). (B) Im Zusammenhang mit einer *P. falciparum* Infektion konnten TLR7/9 als Rezeptoren identifiziert werden, welche ebenfalls zur Aktivierung der NF-κB Transkriptionsfaktoren führen. Im Endosom bindet Hämatozin an TLR9 und dies führt wiederum zur Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalweges. Die Signalkaskade führt zur Phosphorylierung des NEMO-Proteins im IKK-Komplex und induziert wie beschrieben zur Aktivierung der NF-κB Transkriptionsfaktoren. (modifiziert nach Kawai and Akira, 2007). (C) NF-κB induziert unter anderem die Transkription der Gene von NLRP3, proIL18 und proIL-18. Ein weiterer Stimulus führt zur Oligomerisierung von NLRP3, ASC und Pro-Caspase-1. Dieser Komplex bewirkt die Umwandlung der Pro-Caspase-1 zur Caspase-1, welche wiederum pro-IL18 und pro-IL18 in die aktiven Formen umwandelt (modifiziert nach Shao et al., 2015).

#### 1.4.2.5 TGF-beta signaling pathway

Benannt ist der Signalweg nach dem anti-inflammatorischen Zytokin TGF-beta, wobei es sich genaugenommen um eine Proteinfamilie mit über 30 Mitgliedern handelt. Bekannte Vertreter sind neben TGF-beta die Wachstumsfaktoren Activine, Nodals und ‚bone morphogenic proteins‘ (BMPs) (James et al., 2005; Poniatowski et al., 2015). Aufgrund der

Vielzahl der Mitglieder, sind auch die Effekte des TGF-beta Signalweges je nach Zelltyp vielfältig (Massague, 1998). SMAD Proteine (ein Akronym aus der Fusion der *Caenorhabditis elegans Sma* Gene und der *Drosophila Mad* Gen) nehmen bei der Signaltransduktion von TGF-beta eine wichtige Funktion ein. Die Signaltransduktion erfolgt über intrazelluläre SMAD Proteine, welche in den Nukleus akkumulieren, wo sie die Expression verschiedener Gene regulieren (Weiss and Attisano, 2013). Im Zusammenhang mit einer Malariaerkrankung ist die Produktion des Zytokins TGF-beta mit einer Reduzierung der Pathogenität verbunden. Dabei nimmt das Verhältnis anti-inflammatorischen Zytokinen (wie TGF-beta) zu pro-inflammatorischen Zytokinen, (wie TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL12) eine wichtige Rolle bei der Pathogenität einer Malariaerkrankung ein (Dodoo et al., 2002). Es wird angenommen, dass TGF-beta die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und somit die Pathogenität dieser Zytokine reguliert. So zeigte sich im Serum von Patienten mit einer schweren Malaria, dass die Menge an TGF-beta reduziert ist (Wenisch et al., 1995). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Activin B infolge eines inflammatorischen Stimulus Hecpidin (Protein zur Regulation des Eisenhaushaltes) über die Phosphorylierung der SMAD-Proteine 1/5/8 reguliert (Besson-Fournier et al., 2012). In *Plasmodium berghei* infizierten Mäusen ging eine erhöhte Hecpidin Regulation mit Veränderungen der Expression von BMP/SMAD Signalweg regulierten Gene einher (Spottiswoode et al., 2017) .

### 1.5 Zielsetzung

Eine *P. falciparum* Infektion kann unterschiedlich schwere Verlaufsformen haben, wobei eine CM eine der schwersten Krankheitsverläufe darstellt. Die Pathogenität einer CM lässt sich auf mehrere Faktoren zurückführen, wobei die Zytoadhäsion von infizierten Erythrozyten an mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns einer der Hauptpathogenitätsfaktoren ist. So stören adhärierende infizierte Erythrozyten den Blutfluss und können zu einer Unterversorgung des angrenzenden Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen führen. Die Zytoadhäsion setzt dabei eine Reihe von Mechanismen in Gang, die die Pathogenität mit beeinflussen. So werden die Endothelzellen aktiviert, was zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen und diverser pro-inflammatorischer Zytokine führt (Tripathi et al., 2006). Infolge einer Immunantwort zeigen sich die typischen Malariasymptome, wie beispielsweise Fieber. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Prozesse, die in den Parasiten und den Endothelzellen infolge der Zytoadhäsion aktiviert werden, mittels *next generation sequencing*-Methoden zu untersuchen. Auf Seiten der Parasiten soll untersucht werden,

inwieweit sich das Bindungsverhalten an Gehirnendothelzellen bei normaler Körpertemperatur von dem bei Fieber unterscheidet. Mittels der Transkriptom-Daten sollen daraufhin die Ursachen für die Veränderungen im Bindungsverhalten analysiert werden. Im Fokus sollen Veränderungen, die mit dem Bindungsverhalten direkt assoziiert sind, stehen. Auf Seiten der Gehirnendothelzellen sollen ebenfalls die unterschiedlichen Effekte der Zytotoxizität bei 37°C und 40°C untersucht werden. Um die Unterschiede im Transkriptom zu visualisieren, sollen die differentiell exprimierte Gene hinsichtlich biologischer Prozesse in GO-Terme geordnet und in KEGG Stoffwechsel- und Signalwege eingeordnet werden. Im Anschluss sollen vereinzelt Gene hinsichtlich pathophysiologischer Eigenschaften, während einer *P. falciparum* Infektion, analysiert werden. Aufgrund der erhöhten Menge an Signalmolekülen in dem Plasma von Malariapatienten, sollen die transkriptionellen Veränderungen in den Gehirnendothelzellen untersucht werden, welche durch diese Signalmoleküle hervorgerufen werden. Hierfür sollen die Gehirnendothelzellen in Medium mit Plasma von Patienten ko-inkubiert werden, welche zuvor in der Bernhard-Nocht-Ambulanz mit einer Malariaerkrankung diagnostiziert wurden. Die Analyse der transkriptionellen Veränderungen in den Gehirnendothelzellen soll erste Hinweise auf die Effekte des Immunsystems auf das Endothelium eines Malariapatienten geben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Alle hier aufgeführten Namen von Laborgeräten, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Kits, Enzymen, Medien und Antikörpern entsprechen denen der Hersteller und werden nicht ins Deutsche übersetzt.

#### 2.1.1 Laborgeräte

Agilent 2100 Bioanalyser System	Agilent, USA
Biomate 3 (NanoDrop)	ThermoScientific, USA
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Deutschland
Electrophoresis power supply EPS301	Amersham Pharmacia Biotech, USA
EVOS FL Auto	AMG/ThermoFisher, USA
EVOS XL cell imaging System	AMG/ThermoFisher, USA
Freezer (-80°C) FORMA 700 Series	ThermoFisher, USA
Function Line (Brutschank mit CO <sub>2</sub> )	Heraus Instruments, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Horizon 58 gel chamber	Biometra, Deutschland
IKA <sup>®</sup> MS 3 Vortexer	IKA-Labortechnik, Deutschland
Liquid nitrogen container	Thermo Scientific, USA
Mini Inertglas Exsikkator, Poplycarbonat	Sicco
Mr.Frosty freezing container	Thermo Scientific, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Deutschland
pH-Meter CG 840	Schott, Deutschland
Rotina 48 centrifuge	Hettich Lab Technology, Deutschland
SW 20 Wasserbad	Julabo
Tecnai Sprit TEM	FEI
Thermomixer compact	Eppendorf, Deutschland
Vario MACS <sup>a</sup>	Miltenyi Biotec, Deutschland

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

14 ml Polystyren Roundbottom tubes	Falcon, USA
Cell Culture Flask T25 and T75, Standard	Sarstedt, Deutschland
Cover slips ø13 mm	ThermiScientific, USA
Culture plates TC Plate 96 well, 24 well, 6 well Standard, F	Sarstedt, Deutschland
Falcon 15 mL und 50 mL Conical Centrifuge Tubes	ThermoScientific, USA
Micro tube 2 mL, PP	Sarstedt, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Deutschland
PCR-tubes	Sysmex-Partec, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien

6x Loading Dye	ThermoFisher, USA
Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Ampuwa	Frisenius Kabi, Deutschland
BD-Puffer (PCR)	Solis Biodyne, Estland
Bicoll Separating Solution	Millipore, Deutschland
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid	Carl Roth, Deutschland
dNTP	Invitrogen, USA
DPBS	PAN Biotech, Deutschland
Ethidium bromide	Carl Roth, Deutschland
Gelatine (100 ml)	Sigma, USA
Giemsa Azur-Eosin-Methylblaulösung	Millipore, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Deutschland
HEPES	Biomol, Deutschland
KCl	Merck, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Deutschland
KO <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Deutschland
Leica CV Mount (mounting medium)	Leica Biosystems, USA
Lösliches Chondroitin Sulfat A (sCSA)	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Roth, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Promega, USA
Milchpulver	Carl Roth, Deutschland
Na <sub>2</sub> -EDTA	Merck, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth, Deutschland
NaCl	Carl Roth, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth, Deutschland
Tris (pure)	Carl Roth, Deutschland
Triton-X 100	Carl Roth, Deutschland
TRIzol <sup>®</sup>	Ambion/ Life technologies
UltraPure™ Agarose	ThermoFisher, USA

Alle Chemikalien, deren Bezugsquelle nicht aufgeführt ist, wurden von Sigma-Aldrich (USA), Carl Roth (Deutschland) oder Merck (Deutschland) bezogen.

### 2.1.4 Kits

Agencourt RNAClean XP	Beckman Coulter, USA
OptEIA TMB Substrat Reagent Set	BD Bioscience, USA
Pico 6000 RNA Kit	Agilent Technologies, USA
PureLink RNA Mini Kit	ThermoFisher, USA
SuperScript II Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen, USA
SYBR Green PCR Master Mix	Quantitect SYBR Green PCR System, Quiagen, Deutschland
TURBO DNA-free Kit	Invitrogen, USA

### 2.1.5 Enzyme und Zytokine

Accutase	PAN Biotech, Deutschland
Chondroitinase ABC	Sigma-Aldrich, USA
Fire Pol (5U/ $\mu$ l)	Solis Biodyne, Estland
Human TNF- $\alpha$	PreproTech, USA
StemPro <sup>®</sup> Accutase <sup>®</sup> Cell Dissociation Reagent	ThermoFisher, USA

### 2.1.6 DNS-Standard

GeneRuler <sup>™</sup> 100bp DNA Ladder	ThermoFisher, USA
GeneRuler <sup>™</sup> 1kb DNA Ladder	ThermoFisher, USA

### 2.1.7 Medium und Zusätze

DMEM/F-12 (1:1) (1x) mit L-Glutamin und 2,438 g/L Natrium Bicarbonat	Gibco, USA
Endothelial Cell Growth Supplement	Millipore, Deutschland
Fetal Bovine serum Advanced, Heat inactivated, collected in South America	Capricorn, Deutschland
Gentamycin	Sigma, USA
Humanes A+ Serum	Interstate Bloodbank, USA
Hypoxanthine	Sigma, USA
Natriumbicarbonat (7,5%)	Gibco, USA
RPMI 1640 – Powder medium mit L-Glutamin, mt 25 mM HEPES	AppliChem, USA

### 2.1.8 Antikörper

Anti-human ICAM-1	eBioscience, USA
mouse anti-ATS-GHI-monoklonal	WEHI Antibody Facility, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia
Polyklonal rabbit anti-mouse Immunglobulin/HRP	DAKO, USA
rabbit anti-KAHRP	Zur Verfügung gestellt von Prof. Brain Cooke
rabbit anti-mouse HRP konjugiert	Dako, USA
rabbit anti-spectrin	Sigma, USA
swine anti-rabbit HRP konjugiert	Dako, USA

## 2.1.9 Puffer und Lösungen

### Coomassie-Lösung

- Methanol 50% (v/v)
- Eisessig 10%
- Coomassie Brilliant Blue R 0,05%(w/v)

### ECL-Lösung B

- DMSO [10 mL]
- Parahydroxycoumarinsäure [11 mg]

### 10x PBS

- NaCl [1.37 M]
  - KCl [28,6 mM]
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [80.6 mM]
  - KO<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [14.7 mM]
- auf pH to 7,4 einstellen

### SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

- Tris-Pure [0,5 M]
  - SDS [0,4% (w/v)]
- auf pH von 6,8 einstellen

### 50x TAE

- Tris (pure) [2 M]
  - Sodium-acetate [250 mM]
  - Na<sub>2</sub>-EDTA (wasserfrei) [100 mM]
- Destilliertes Wasser ad 2 l

### 1x Transferpuffer

- Glycin 192 mM
  - Tris Base 25 mM
  - SDS 1,3 mM
  - Methanol 20%
- Destilliertes Wsser ad. 1 l

### ECL-Lösung A

- Tris-HCL pH 8,6 [100 mM]
- Luminal [50 mg]

### 2x Laemmli-Puffer

- Tris-HCL pH 6,8 [100 mM]
- SDS [4 % (w/v)]
- Glycerol [20 % (v/v)]
- Bromphenolblau [0,02% (w/v)]

Vor Gebrauch Zugabe von 100 mM DTT

### 10x SDS-Elektrophoresepuffer

- Tris Base [250 mM]
  - SDS [1% (w/v)]
  - Glycin [1,92 M]
- pH auf 8,45 einstellen

### SDS-PAGE-Trenngelpuffer

- Tris-Pure [1,5 M]
  - SDS [0,4% (w/v)]
- auf pH von 8,8 einstellen

### 1x TBS

- NaCl [0,3 M]
  - Tris (pure) [20 mM]
- auf pH 7,5 einstellen

### Weisser-Puffer

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [2,18 g]
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [0,98 g]
- Destilliertes Wasser ad. 2 l

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zellkultur

##### 2.2.1.1.1 HBEC-5i (ATCC CRL-3245) Gehirndothelzelllinie

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Endothelzellen handelt es sich um eine mit dem SV40 large T antigen immortalisierte Gehirndothelzelllinie, welche aus dem zerebralen Cortex

gewonnen wurden. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre in Kulturmedium kultiviert und alle 2-4 Tage passagiert. Nach 12-15 Passagen wurden die in Kultur befindlichen Zellen verworfen und eine neues Aliquot aufgetaut. Bei einer Konfluenz von ca. 70-90% mussten die Zellen passagiert werden. Hierfür wurde eine frische Kulturflasche für mindestens 30 min mit einer 0,1% Gelatine-Lösung (in PBS) beschichtet und anschließend die überschüssige Gelatine-Verdünnung entfernt. Die Zellen wurden 2-mal mit DPBS gewaschen und anschließend mit einer Accutase-Lösung für 3-5 min bei 37°C behandelt. Die abgelösten Zellen wurden in 5 mL frischem Kulturmedium gründlich resuspendiert, nach Bedarf verdünnt und in die beschichteten Kulturflaschen überführt.

#### 2.2.1.1.2 CHO-745-Zelllinie (ATCC No. CRL 2242)

In dieser Arbeit wurde eine transgene CHO-745-Zelllinie verwendet. Transfiziert wurden die Zellen mit dem pAcGFP-N1 Plasmid, bei dem in der ‚multiple cloning side‘ die Sequenz vom humanen CD36 kloniert wurde. Die CHO-CD36 Zelllinie wurde von Lisa Roth kultiviert und mir für die Bindungs-Assays mit sCSA zur Verfügung gestellt.

Tab. 2: Verwendete Zellkulturmedien und ihre Zusätze

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze
HBEC-5i (ATCC® CRL-3245™)	DMEM/F-12 (Gibco) mit L-Glutamin und 2,438 g/L Natrium Bicarbonat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10% iFCS</li> <li>• 40 µg/mL endothelial cell growth supplement</li> <li>• Gentamycin 0,01 mg/mL</li> </ul>
Rekombinante CHO-745	HAM's-12 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10% iFCS</li> <li>• Penicillin/Streptomycin Mix 5 mL</li> </ul>
FCR3/IT4	RPMI 1640	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10% inaktivierten humanen A+ Serum</li> <li>• Gentamycin</li> <li>• Hypoxanthin</li> <li>• Natrium Bicarbonat</li> </ul>

#### 2.2.1.1.3 Kultivierung von Plasmodium falciparum

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Parasiten handelt es sich um den *Plasmodium falciparum* Laborstamm FCR3/IT4. Dieser Stamm wurde im Jahr 1976 aus einem Patienten in Fajara-Gambia (Westafrika) isoliert (Jensen and Trager, 1978). Zur Verfügung gestellt wurde dieses Isolat von Frau Mo Klinkert (BNITM, Hamburg). Die Parasiten wurden in 0+

Erythrozyten in RPMI 1640 Medium (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 2) mit 10% humanen A+ Serum nach dem Standardprotokoll kultiviert (Trager and Jensen, 1976). Inkubiert wurden die Parasiten bei 37°C in einem Mini Inertgas Exsikkator mit einem Gasgemisch aus 94% N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 1% O<sub>2</sub>.

#### 2.2.1.2 Bestimmung der Parasitämie

Die Parasitämie gibt an, wie hoch der prozentuale Anteil der infizierten Erythrozyten bezogen auf alle Erythrozyten in der Kultur ist. Hierfür wurde ein Ausstrich auf Objektträgern angefertigt, luftgetrocknet und die Parasiten für 2 min bei Raumtemperatur (RT) in Methanol fixiert. Anschließend wurden die infizierten Erythrozyten in einer 10% Giemsa-Lösung für 10 min gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

#### 2.2.1.3 Synchronisation

Für die Experimente war es wichtig, dass möglichst alle Parasiten sich in einem gleichen/ähnlichen Entwicklungsstadium befinden. Hierfür wurde die Synchronisations-Methode von Lambros und Vannderberg angewendet (Lambros and Vanderberg, 1979). Der membrangängige Zuckeralkohol D-Sorbitol lysiert mit Trophozoiten und Schizonten infizierte Erythrozyten, indem die Zellen durch osmotischen Druck zum Platzen gebracht werden. Bei infizierten Erythrozyten mit Parasiten im Ringstadium sind die Membranen noch flexibel genug, um dem osmotischen Druck standzuhalten. Die zu synchronisierende Parasitenkultur sollte daher mindestens eine Parasitämie von 1% Parasiten im Ringstadium haben. Zu Beginn der Synchronisation wurden die Parasiten in einer 5% D-Sorbitol Lösung (in DPBS) resuspendiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die verbliebenen intakten infizierten Erythrozyten mit Kulturmedium gewaschen, zentrifugiert und ein weiteres Mal gewaschen. Die Parasiten wurden dann, wie oben beschrieben kultiviert. Für die Transkriptom-Studien wurde die Parasitenkultur nach 4 Stunden nach dem gleichen Protokoll ein zweites Mal synchronisiert.

#### 2.2.1.4 Anreicherung (*panning*) von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten auf die Bindung an HBEC-5i Zellen

In dieser Arbeit sollten die Effekte der Zytoadhäsion auf die Parasiten und die Endothelzellen untersucht werden. Hierfür mussten zuerst jene Parasiten aus dem Laborstamm angereichert werden, die spezifisch an die HBEC-5i Gehirnendothelzelllinien adhärieren. Zu Beginn einer Anreicherungsrunde wurden synchronisierte Parasiten im Trophozoiten-

Stadium in RPMI 1640 (supplementiert mit 2% Glukose, (pH 7,2); im fortlaufenden Text wird dieses Medium als ‚Bindungsmedium‘ bezeichnet) aufgenommen. Die Parasitämie sollte mindesten 5% betragen und 10% nicht übersteigen. Die Parasitensuspension wurde daraufhin in die Kulturflaschen mit Gehirndothelzellen (Konfluenz bei 60-90%) überführt und für 90 min bei 37°C beziehungsweise 40°C und 5% CO<sub>2</sub> ko-inkubiert. Für die Anreicherung an Gehirndothelzellen bei 40°C wurden die Endothelzellen zuvor für 7 Stunden bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> vor-inkubiert. Nach 60 min, 75 min und 90 min Ko-Inkubation wurde die Kulturflasche orbital vorsichtig geschüttelt. Alle nicht gebundenen infizierten Erythrozyten wurden anschließend mittels Bindungsmedium aus der Kulturflasche gewaschen. Der Waschvorgang wurde mindestens 5-mal wiederholt. Die Zytoadhäsion wurde unter dem Inversmikroskop kontrolliert. Für den Fall, dass immer noch ungebundene infizierte Erythrozyten zu erkennen waren, wurden weitere 3 Waschschrirte durchgeführt. Die verbliebenen infizierten Erythrozyten in der Kulturflaschen wurden mit 10 mL RPMI 1640 Kulturmedium beschichtet und mit nicht-infizierten Erythrozyten (5% Hämatokrit) supplementiert. Nach ca. 24 Stunden wurden die angereicherten Parasiten (jetzt im Ring-Stadium) geerntet. Die Ernte fand mittels Dichtegradientenzentrifugation (Trennlösung: Biocoll) statt. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten der Gehirndothelzellen und der Erythrozyten lassen sich Gehirndothelzellen von der Parasitenkultur trennen. Hierfür wurde die Parasitenkultur aus der Zellkulturflasche vom Vortag resuspendiert und die Suspension vorsichtig auf 7 mL Biocoll geschichtet. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 1.300 x g für 20 min ohne Bremse setzten sich die Erythrozyten am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Der Überstand wurde anschließend entfernt und das Erythrozyten-Sediment in Kulturmedium resuspendiert und die wie oben beschrieben in Kultur genommen. Eine Anreicherungsrunde konnte frühestens wiederholt werden, wenn die Parasiten wieder eine Parasitämie von 5% erreicht hatten. Die Anreicherung der Parasiten bei 40°C an HBEC-5i Zelle wurde von Finn Fürstenwerth durchgeführt.

#### 2.2.1.5 Zell-ELISA

ICAM-1 ist ein typischer Aktivierungsmarker von Endothelzellen. Durch Stimulation durch TNF- $\alpha$  reagiert die Zelle mit einer erhöhten Exposition von ICAM-1 auf der Zytoplasmamembran. Dieser Anstieg an ICAM-1 auf der Zelloberfläche lässt sich mittels spezifischer Antikörper nachweisen. Hierfür wurden die Gehirndothelzellen 48 Stunden vor dem Experiment mit einer Zellzahl von 0,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro mL in eine 96-Lochplatte

ausgesät, sodass die Zellen am Tag des Experiments eine Konfluenz von 90-100% besaßen. Zum Start des Experiments wurden je Vertiefung die Zellen mit 1 µl (Stammkonzentration 80 µg/mL) TNF-α supplementiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit einer Fixierlösung (50% Methanol und 50% Aceton (v/v)) für 5 min fixiert. Die fixierten Zellen konnten bei -80°C gelagert werden und mussten im Anschluss für 5 min mit DPBS + 0,2% Triton-X 100 rehydriert werden. Unspezifische Bindungsmöglichkeiten wurden durch Zugabe von 200 µL Blockierlösung (5g BSA auf 500 mL DPBS) je Vertiefung für 1-2 Stunden geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde 50 µl der Primärantikörperverdünnung (anti-ICAM-1, 1:6000 in DPBS mit 0,1 % BSA) in jede Vertiefung gegeben. Die Inkubation fand über Nacht bei 4 °C statt. Nach weiteren 3 Waschschriften wurde die Sekundärantikörperverdünnung (anti-Maus-HRP 1:200, in DPBS mit 0,1% BSA) für 2 Stunden dazugegeben. Anschließend wurden die überschüssigen Sekundärantikörper durch 3 Waschschriften entfernt. Eine Quantifizierung der gebundenen Antikörper fand mittels des BD OptEIA TMB Substrat Reagent Set nach Angaben des Herstellers statt. Unmittelbar nach dem Abstoppen der Farbreaktion mit einer 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung konnte die Stärke der Verfärbung in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden.

#### 2.2.1.6 Bindungs-Assay

Um die Veränderungen des Bindungsverhaltens einer Parasitenpopulation quantitativ zu bestimmen, wurde ein statischer Bindungs-Assay durchgeführt. 72 Stunden vor dem Experiment fand eine Synchronisation der Parasiten statt. Zur gleichen Zeit wurden die Gehirndothelzellen auf 0,1% Gelatine-beschichtete Deckgläser mit einer Zelldichte von  $1.2 \times 10^6$  Zellen/mL ausgesät und mit frischem Kulturmedium versorgt. Am Tag des Experiments sollten die Zellen eine Monolage gebildet haben. Die Parasiten, welche sich im Trophozoiten-Stadium befanden (ca. 28-32 Stunden nach Invasion des Erythrozyten), wurden mit einer Parasitämie von 5% und einem Hämatokrit von 1% in Bindungsmedium resuspendiert. Für 30 min bei 37°C konnten sich die Parasiten an das Bindungsmedium adaptieren. Die Gehirndothelzellen wurden vor der Ko-Inkubation ebenfalls mit Bindungsmedium gewaschen. Die Ko-Inkubation der infizierten Erythrozyten mit der Gehirndothel-Monolage fand für 1 Stunde bei 37°C, beziehungsweise 40°C, und 5% CO<sub>2</sub> statt. Alle 15 min mussten die Zellen vorsichtig orbital geschwenkt werden. Anschließend wurden die Deckgläser in Bindungsmedium gewaschen, um ungebundene infizierte

Erythrozyten zu entfernen. Um sicher zu gehen, dass alle ungebundenen Erythrozyten von der Endothelzell-Monolage entfernt wurden, wurde eine weitere 24-Lochplatte mit je 500 µl Bindungsmedium je Vertiefung gefüllt und das Deckglas mit der zellbewachsenen Seite nach unten in einem 45° Winkel aufgestellt. So konnten die ungebundenen Erythrozyten durch die Schwerkraft auf den Boden fallen. Die verbliebenen infizierten Erythrozyten wurden mit einer 1% Glutaraldehyd in PBS Lösung für 30 min bei RT fixiert. Die fixierten Zellen wurden daraufhin mit einer gefilterten Giemsa/Weisser Puffer Lösung (1:10) für weitere 30 min gefärbt. Danach wurden die Deckgläser an der Luft getrocknet und mittels ‚*mounting medium*‘ mit der Zellseite auf einen Objektträger geklebt und über Nacht zum Trocknen gelagert. Am nächsten Tag konnte unter einem Inversen Mikroskop die Auszählung der gebundenen infizierten Erythrozyten stattfinden. Je Deckglas wurden die Anzahl der gebundenen infizierten Erythrozyten an 300 HBEC-5i gezählt. Die Experimente wurden jeweils als Triplikate durchgeführt. Die Bindungs-Assays wurden in dieser Arbeit von: Dr. Nahla Metwally, Lisa Roth, Michaela Sauer und Finn Fürstenwerth durchgeführt

#### 2.2.1.6.1 Inhibitions-Assay mit löslichem Chondroitin-4-sulfat

Eine Abwandlung des Bindungs-Assays ist der Inhibitions-Assay mit löslichem Chondroitin-4-Sulfat (sCSA). Hierbei wurden die Parasiten und die Gehirnendothelzellen wie beim Bindungs-Assay vorbereitet. Am Tag des Experiments fand eine Vor-Inkubation der infizierten Erythrozyten mit 10 µg/mL sCSA bei 37°C für 30 min statt. Nach der Vor-Inkubation wurden die infizierten Erythrozyten mit Bindungsmedium gewaschen und zur Ko-Inkubation zu den Gehirnendothelzellen gegeben. Das restliche Vorgehen entspricht dem eines Bindungs-Assays. Der Inhibitions-Assays mit sCSA wurde von Lisa Roth durchgeführt.

#### 2.2.1.6.2 Inhibitions-Assay mit Chondroitinase ABC

Eine weitere Abwandlung des Bindungs-Assays ist der Inhibitions-Assay mittels Chondroitinase ABC. Hierfür wurden die Parasiten und die Gehirnendothelzellen wie beim Bindungs-Assay vorbereitet. Am Tag des Experiments wurden die Gehirnendothelzellen für 30 min bei 37°C mit 0,1 U/mL Chondroitinase ABC in Bindungsmedium behandelt. Anschließend wurden die Gehirnendothelzellen mit Bindungsmedium gewaschen und mit der Ko-Inkubation mit den infizierten Erythrozyten konnte begonnen werden. Das weitere Vorgehen entsprach dem eines normalen Bindungs-Assays. Die Inhibitions-Assay mit Chondroitinase ABC wurden von Dr. Nahla Metwally und Michaela Sauer durchgeführt.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Mykoplasmen-PCR

Mykoplasmen sind parasitäre, intra- oder extrazellulär lebende Bakterien, welche Zellkulturen kontaminieren können. Diese Kontamination ist nicht unter dem Lichtmikroskop zu erkennen und die Bakterien töten die Zellen nur langsam. Da eine solche Kontamination einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der Experimente in dieser Arbeit nehmen würde, musste alle 4-8 Wochen eine Mykoplasmen-PCR durchgeführt werden. Hierfür wurden 1000 µL Zell-freier Zellkulturüberstand abgenommen, für 3 Min bei 10.000 x g zentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend wieder zentrifugiert. Das PBS wurde bis auf 20-50 µL abgenommen, das Pellet resuspendiert und anschließend bei 95°C für 5 min denaturiert. Zu 19 µL Mastermix wurde 1 µL der denaturierten Probe zugesetzt und das Temperaturprogramm gestartet.

Tab. 3: Zusammensetzung Mastermix

Reagenzien	Volumen je Ansatz
10x BD-Puffer	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 µl
Primer A	0,8 µl
Primer B	0,8 µl
Fire-Polymerase	0,16 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,4 µl
H <sub>2</sub> O	12,84 µl
Denaturierte Probe/positive Kontrolle	1 µl

Tab. 4: Verwendete Primer und deren Sequenzen

	Primer ID	Sequenz
Primer A	GPO-3 # 1821	5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCT-3'
Primer B	MGSO # 1822	5'-TGCACCATCTGCTACTCTGTTAACCTC-3'

Tab. 5: Temperaturprogramm für Mycoplasmen-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	1
95°C	20 sek	35
55°C	30 sek	35
72°C	30 sek	35
72°C	5 min	1
8°C	Lagerung	-

### 2.2.2.2 Quantitative real-time PCR

Für die qPCR Experimente wurden Primer designet, womit 100-120 Basenpaar-Fragmente amplifiziert wurden.

Tab. 6: Oligonukleotide, welche für die qPCR verwendet wurden

Gen Name	Gen ID	forward primer	reverse primer
<i>IT4_var04</i>	PFIT_1200200	GGTAAAGGAGGCGAGAAAC	CCCATAACTCTCCAACACATAA
<i>IT4_var13</i>	PFIT_0411400	AAACCGTAAGCCACAAGAG	GTACATGCTCCACCGTTATT
<i>IT4_var41</i>	PFIT_0900100	CCAATCGTAATCCTGCTCAA	CTTACCTGTTCTCCACCTTTC
<i>IT4_var02</i>	PFIT_bin08900	GGGAAAGACAACGACAAAGA	ACGAGGAGGTGTCGATTTA
<i>IT4_var28</i>	PFIT_0711000	TTCGTGACGCCGATAGT	GTCGAAACCACCAAGGTATAG
<i>fructose-bisphosphate aldolase</i>	PFIT_1446000	TGTACCACCAGCCTTACCAG	TTCCTTGCCATGTGTTCAAT
<i>skeleton-binding protein 1 (sbp1)</i>	PFIT_0501400	TTAGCCGACGAACCAACACA	TTCGGTTGTCTCTGGTACTGCA
<i>arginyl-tRNA-synthetase</i>	PFIT_1218300	TTCAAACACGAAGTGGAACAAC	AATTCTCTGCAGCAAGTCGC

Nachdem die RNS isoliert wurde, wurde cDNS mittels SuperScript II Reverse Transcriptase Kit mittels zufälligen Hexameren (Invitrogen) bei 50°C für 1 Stunde synthetisiert. Die komplementäre DNS (engl. *complementaryDNA* (cDNA)) wurden anschließend mit SYBR Green PCR Master Mix gemischt und jeweils 0,5 µM forward und reverse Primer in ein Reaktionsvolumen von 10 µL hinzugegeben. Folgendes Temperaturprogramm wurde durchgeführt:

Tab. 7: Temperaturprogramm qPCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	15 min	1
95°C	15 sek	40
55°C	15 sek	40
65-95°C	1 min	40
65°C	5 min	1

Die Spezifität von jedem Primerpaar wurde nach jeder qPCR mittels ‚*dissociation melting curve*‘ Analyse bestimmt. Das ausschließlich im Ring-Stadium exprimierte *sbp1* Gen und die ‚*housekeeping*‘ Gene ‚*fructose-bisphosphate aldolase*‘ und ‚*arginyl-tRNA synthetase*‘ wurden verwendet, um die *var*-Gen Expression zu normalisieren (als Kontrolle wurde die einzelsträngige RNS aus den IT4-EC37 Parasiten und IT4-EC40 Parasiten verwendet). Um das *var* Expressionsniveau der Proben miteinander zu vergleichen, wurde die relative Expression jedes einzelnen *var*-Gens im Vergleich zu den geometrischen Mittelwert der drei genannten Referenzen bestimmt, nachdem die Primereffizienz berechnet wurde (Livak and Schmittgen, 2001; Vandesompele et al., 2002). Für den statistischen Signifikanztest wurde

der ‚*Wilcoxon rank sum*‘-Test mittel GraphPad Prism 7 durchgeführt. Die qPCR wurde von Dr. Nahla Metwally und Vincent Jordan etabliert und durchgeführt.

#### 2.2.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Um die PCR Produkte ihrer Größe nach zu trennen, wurden diese mittels Gelelektrophorese auf einem 1 % Agarosegel mit 0.0001% Ethidiumbromid getrennt. Zuvor wurden die PCR Produkte mit 6xLadepuffer gemischt und zusammen mit einem DNS-Standard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE Puffer bei 90 V für 35 min laufen gelassen. Mittels UV-Licht ließen sich anschließend eventuelle PCR-Produkte sichtbar machen.

#### 2.2.2.4 Trypsin-Assay und Proteinnachweis mittels Western Blot

Um nachzuweisen, dass *PfEMP1*-Proteine auf die Oberfläche der infizierten Erythrozyten transportiert wurden, ist ein Trypsin-Assay durchgeführt worden. Trypsin schneidet jegliche Proteine von der Oberfläche der Erythrozytenmembran, darunter auch der extrazelluläre Teil der *PfEMP1* Proteine. Von diesem *PfEMP1* Proteinen bleibt somit nur die Transmembrandomäne sowie die konserviert intrazelluläre ATS Domäne in dem Erythrozyten zurück. Diese Domäne lässt sich mittels spezifischer Antikörper nachweisen und unterscheidet sich aufgrund der kleineren Proteingröße von den ATS-Domänen intakter intrazellulärer *PfEMP1*-Proteine. Diese Experimente wurden von Susann Ofori durchgeführt.

##### 2.2.2.4.1 Probenaufbereitung

Für den Trypsin-Assay mit anschließender SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Proteinnachweis wurden synchronisierte Parasiten in Trophozoiten-Stadium (ca. 24-28 Stunden nach Infektion des Erythrozyten) verwendet. Mittels magnetischer Zellsortierung (*magnetic cell separation* (MACS)) wurden die infizierten Erythrozyten aus der Parasitenkultur isoliert. Dies ist möglich, da die Parasiten im Laufe des intraerythrozytären Reproduktionszyklus, dass im Erythrozyten enthaltene Hämoglobin zur Energiegewinnung metabolisieren. Dabei werden toxische Mengen an Häm freigesetzt, welche der Parasit in kristallines Hämozoin umwandelt. Hämozoin ist paramagnetisch und wird vom Parasiten in Nahrungsvakuolen gelagert. Die mittels MACS separierten infizierten Erythrozyten wurden auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt und in zwei Fraktionen aufgeteilt. Während zu einer Fraktion für 30 min  $1 \mu\text{g/mL}$  Trypsin dazugegeben wurden, blieb die zweite Fraktion unbehandelt. Danach wurden beide Fraktionen in 10 mM HEPES Puffer (pH 7,2) resuspendiert und es fand ein Zellaufschluss mittels drei aufeinander folgender Zyklen

von Einfrieren (in flüssigem Stickstoff) und Auftauen statt. Die Zellysate wurden in 2xLaemmli Puffer aufgenommen und für 5 min auf 95 °C erhitzt.

#### 2.2.2.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Table 8: Zusammensetzung Sammelgel und Trenngel

Sammelgel		6% Trenngel		8% Trenngel	
H <sub>2</sub> O	3,05 mL	H <sub>2</sub> O	4,1 mL	H <sub>2</sub> O	3,6 mL
Tris-Cl/SDS, pH 6,8	1,25 mL	Tris-Cl/SDS, pH 8,8	1,88 mL	Tris-Cl/SDS, pH 8,8	1,88 mL
Acrylamid	0,65 mL	Acrylamid	1,5 mL	Acrylamid	2,0 mL
APS 25%	25 µL	APS 25%	25 µL	APS 25%	25 µL
TEMED	5 µL	TEMED	5 µL	TEMED	5 µL

Ein 6-8%iges SDS-Gel wurde mit einem Äquivalent von  $1 \times 10^7$  Zellen je Tasche beladen. Bei 400 mA fand die Auftrennung der Proteine nach Größe statt. Zur Überprüfung der Proteinlast wurde parallel ein zweites Gel beladen und anschließend ein Proteinnachweis mittels Coomassie durchgeführt. Das Coomassie Gel wurde später als Standard verwendet.

#### 2.2.2.4.3 Western Blot-Analyse

Nach dem Auftrennen der Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Um alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran für 30 min mit 5% Milchpulver in TBS Puffer inkubiert. Die Detektion der ATS-, und Spektrin- und KAHRP-Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Die Primärantikörper wurden wie folgt in 2,5% Milchpulver in TBS verdünnt: Maus anti-ATS-GHI monoklonal 1:500; Hase anti-Spektrin 1:2000; Hase anti-KAHRP 1:4000. Die geblockte Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4°C mit den entsprechend verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Nachdem die Primärantikörper von der Membran gewaschen wurden, fand eine Inkubation der Membran mit den Sekundärantikörpern für 2 Stunden bei RT statt. Die Sekundärantikörper wurden in 5% Milchpulver in TBS wie folgt verdünnt: Hase anti-Maus 1:5000; Schwein anti-Hase 1:10.000 (für den Nachweis von Spektrin) und 1:20.000 (für den Nachweis von KAHRP). Die Sekundärantikörper sind mit der Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Dies ermöglicht eine Visualisierung der gebundenen Antikörper durch Chemolumineszenz auf einem Hyperfilm-ECL. Die ECL-Entwicklung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine anschließende densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe der Programme ImageJ 1.52a und Adobe Photoshop CS3 Extended (Version 10.0.1) durchgeführt.

#### 2.2.2.5 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden synchronisierte Parasitenkulturen verwendet, die sich im Trophozoiten Stadium ca. 24-28 Stunden nach der Invasion in den Erythrozyten befanden. Mittels 80%, 60% und 40% Percoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden die Parasiten separiert und anschließend mit 2,5% Glutaraldehyd/ 2,5% Paraformaldehyd fixiert. Die Proben wurden danach mit 50 mM Natrium Cacodylat Trihydrat Puffer (pH 7,4) gewaschen und mit 2% OsO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O für 45-60 Min im Dunkeln auf Eis nach-fixiert. Nach der Schwermetallfärbung mittels 0,5-1% Uranylacetat für 45-60 Min bei RT, wurden die Proben mit steigenden Konzentrationen von Ethanol in H<sub>2</sub>O dehydriert. Für die anschließende Einbettung und Polymerisierung wurden steigende Konzentrationen *Epoxy resin* bei 60°C verwendet. Danach wurden die Proben in 55-60 nm breite Schnitte geschnitten, auf ein 300 Maschenkupfer-Gitter gelegt und anschließend mit dem Transmissions Elektronenmikroskop bei einer Voltzahl von 80 kV analysiert. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von Dr. Katarina Höhn und Lisa Roth durchgeführt.

#### 2.2.2.6 RNS-Isolation

Für die Untersuchung der Transkriptome der unterschiedlichen Parasitenpopulationen war es wichtig, dass sich möglichst alle Parasiten in der Kultur in einem ähnlichen Stadium des intraerythrozytären Lebenszyklus befanden. Hierfür wurden die Parasiten 48 Stunden (für Transkriptomuntersuchungen im Ringstadium), beziehungsweise 72 Stunden (für Transkriptomanalysen vor Parasiten im Trophozoiten-Stadium und Ko-Inkubation mit Gehirndothelzellen) vor der Probennahme synchronisiert. 4 Stunden später wurde die Parasiten ein weiteres Mal synchronisiert. Die Gehirndothelzellen wurden zur gleichen Zeit ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Probennahme eine Konfluenz von 70-90% hatten.

Zur Extraktion der RNS wurde die ‚*single-step*‘ Methode nach Chomczynski und Sacchi angewandt (Chomczynski and Sacchi, 1987). Zum Zeitpunkt der Probennahme wurden die Parasiten mittel Zentrifugation für 5 min bei 800 x *g* sedimentiert. Die sedimentierten Parasiten und Endothelzellen (ggf. mit den Parasiten während der Ko-Inkubation) wurden zügig in 4 mL vorgewärmten TRIzol<sup>®</sup> aufgenommen und gründlich resuspendiert. Danach wurde die Probe für 5 min in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Daraufhin konnten die Proben bei -70°C gelagert werden oder sie wurden direkt weiterverarbeitet. Zur RNS-

Isolierung wurden die Proben zu je 1 mL auf 4 RNase freie Reaktionsgefäße aufgeteilt, mit je 200 µL auf 4°C gekühltes Chloroform supplementiert, gut geschüttelt und für 3 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4°C und 12.000 x *g* für 30 min zentrifugiert und anschließend wurde der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNS wurde durch Zugabe einer äquivalenten Menge von 70% Ethanol gefällt. Anschließend wurde die RNS mittels PureLink RNS Mini Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert. Mögliche Kontamination genomischer DNS wurden mit Hilfe des TURBO DNA-free Kit entfernt. Anschließend wurde die RNS mittels Agencourt RNAClean XP Kit gereinigt. Abschließend musste noch eine Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der isolierten RNS durchgeführt werden. Zuerst wurde die RNS-Konzentration mittels NanoDrop bei 260 nm gemessen. Anschließend wurde die RNS-Konzentration mit RNase-freiem Wasser auf 200-5000 pg/µL eingestellt. Danach wurden die Proben mittels dem Agilent Bioanalyser System und dem Agilent 6000 Pico Kit nach den Angaben des Herstellers analysiert. Die *Library* Präparation und anschließende RNS-Sequenzierung wurde mit einer Illumina HiSeq 4000 PE100 Plattform durch die Firma BGI durchgeführt.

#### 2.2.2.7 Transkriptomanalyse

##### 2.2.2.7.1 Aufarbeitung der Transkriptom-Daten

Nachdem die Transkriptomanalyse von der Firma BGI durchgeführt wurde, wurde ein Qualitätstest mittels FASTQC durchgeführt (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Hier wurden unter anderem die Qualität der Basen und der GC-Gehalt der Sequenzen, die Längenverteilung der Sequenzen und das Vorkommen von Adaptersequenzen analysiert. Anschließend wurde ein Qualitätsfilter verwendet mit dem die Adaptersequenzen, sowie Sequenzen mit schlechter Qualität entfernt wurden. Hierfür wurde das Programm Trimmomatic benutzt (Bolger et al., 2014). Mit dem Programm Bowtie2 mussten die Sequenzen der Proben an das jeweilige humane beziehungsweise parasitäre Referenzgenom *aligned* werden (Langmead and Salzberg, 2012). Das FCR3/IT4-Referenzgenom wurde von der Internetseite <http://www.plasmoDB.org>, das humane Referenzgenom von der Internetseite [https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/igenome.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/igenome.html) bezogen. Die *Reads* wurden somit Positionen im Genom und damit bestimmten Genen zugeordnet. Hier kann es dazu kommen, dass manche Sequenzen zu mehreren Genen beziehungsweise, dass Sequenzen zu mehreren Isoformen desselben Gens passen. Mittels des Programms RSEM

wurden diese nicht eindeutigen Sequenzen nach einem statistischen Modell bestimmten Genen und Isoformen zugeordnet (Li and Dewey, 2011) . Anschließend fand eine Normalisierung der Sequenzen statt und die differenziell exprimierten Gene wurden mit DEseq bestimmt und die p-Werte wurden adjustiert (Anders and Huber, 2010) . In dieser Arbeit wurden zwei Arten von Vergleichen durchgeführt. Zum einen wurde ein paarweiser Vergleich durchgeführt, in dem die Gen-Expression einer Kontrolle zu der Genexpression einer Probe mit veränderten Kulturbedingungen verglichen wurde. Zum anderen wurde ein generelles lineares Modell verwendet, um die transkriptionellen Veränderungen zu untersuchen, welche durch Patienten-Plasma in den Gehirndothelzellen induziert wurde. Dabei wurden die Veränderungen mit denen verglichen, welche durch das Plasma einer gesunden Donors induziert wurden, sowie das Transkriptom der Kontrolle. Die Aufarbeitung der Transkriptom-Daten wurden von Dr. Stephan Lorenzen am BNITM durchgeführt.

#### 2.2.2.7.2 Funktionelle Analyse

Für die weitere Analyse der Transkriptomdaten sind nur differentiell exprimierte Gene mit einbezogen worden, die mehr als 2fach hoch- beziehungsweise runterreguliert waren und deren Veränderung einen adjustierten p-Wert unter 0,05 hatten. Eine Liste an Genen, die diesen Kriterien erfüllten wurden mittels des Online-Programms DAVID funktionell analysiert (<https://david.ncicrf.gov/>). Dabei wurden die Listen der hoch- und runterregulierten Gene getrennt analysiert. Die Analyse ermöglicht eine Prognose, in welchen KEGG-Signal- und Stoffwechselwege die differentiell exprimierten Gene vorkommen. Aber auch eine Zuordnung der Gene nach Gen Ontologien ist möglich. So konnten Gene GO-Termen für biologische Prozesse zugeordnet werden. Mittels des Online-Programms REVIGO wurden die GO-Terme bezüglich ihrer Verwandtschaft, Signifikanz und Spezifität visualisiert (<http://revigo.irb.hr/>).

### 3. Ergebnisse

Die Adhäsion *P. falciparum* infizierter Erythrozyten an Endothelzellen des Wirts ist ein kritischer Vorgang während einer Malariaerkrankung, da die Lokalisation der Bindung und die Quantität der gebundenen Erythrozyten entscheidenden Einfluss auf den Verlauf einer Erkrankung nehmen. Schwere Folgen haben adhärierende Erythrozyten in mikrovaskulären Gefäßen im Gehirn. Eine Obstruktion dieser Blutgefäße führt zu einer Unterversorgung des angrenzenden Gewebes mit schwerwiegenden Folgen für das gesamte Gehirn. Allerdings hat nicht nur die Zytoadhäsion Einfluss auf den Verlauf der Krankheit. So kann auch die Reaktion des Immunsystems im Gehirn schwerwiegende Folgen für den Patient haben. Malaria-Patienten entwickeln Fieberschübe infolge einer Infektion, welche ebenso den Verlauf und die Schwere der Erkrankung beeinflussen. Es ist daher essentiell zu verstehen, wie die Bindungspartner jeweils auf die Zytoadhäsion reagieren und inwieweit febrile Temperaturen Einfluss auf die Bindung und die Bindungspartner nehmen.

In dieser Arbeit wurde eine umfangreiche Transkriptom-Studie durchgeführt, mit dem Ziel die transkriptionelle Veränderungen nach der Zytoadhäsion, sowohl auf Seiten der Gehirndothelzellen als auch auf Seiten der Parasiten zu untersuchen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit eine erhöhte Körpertemperatur Einfluss auf die transkriptionellen Veränderungen der beiden Bindungspartner nehmen. Zu Beginn der Arbeit mussten Fragen hinsichtlich des Versuchsaufbaus für die Transkriptomstudie geklärt werden. Im Anschluss wurden die Transkriptomdaten nach Bindungspartner getrennt analysiert. Zuerst wurde der Fokus auf die Veränderungen im Transkriptom der Parasiten gesetzt, anschließend wurden dann die Transkriptomdaten der Gehirndothelzellen untersucht. Auf Seiten der Endothelzellen wurde ebenfalls untersucht, wie Signalmoleküle in Plasma von Malariapatienten die Transkription verändern.

#### 3.1 Voruntersuchungen

##### 3.1.1 Reaktionszeit der Gehirndothelzellen auf extrazelluläre Stimuli

Ein extrazellulärer Stimulus setzt in den Gehirndothelzellen einen genetischen Informationsfluss in Gang, bei dem zuerst die Informationen auf der DNS in mRNS umgeschrieben, oder transkribiert, wird. Diese kann post-trankriptional modifiziert werden und wird aus dem Zellkern zu den Ribosomen transportiert. Hier wird die Information von der mRNS auf Proteinebene übersetzt. Von dort muss das Protein noch zu seinem

Bestimmungsort transportiert werden. Für Transkriptomstudien ist es daher wichtig den richtigen Zeitpunkt für die Probennahme abzugleichen. Die verwendete Gehirndothelzelllinie HBEC-5i sollte daher auf die Reaktionszeit auf extrazelluläre Stimuli hin charakterisiert werden. Hierfür wurde die Menge an ICAM-1 als Aktivierungsmarker von Endothelzellen gemessen, welcher durch TNF- $\alpha$  induziert werden kann (Szmitko et al., 2003). In Abbildung 5 ist zu sehen das infolge einer Stimulation mit TNF- $\alpha$  die Menge an ICAM-1 auf der Zelloberfläche der HBEC-5i-Zellen nach 6 Stunden auf 150%, bezogen auf die nicht mit TNF- $\alpha$  behandelte Kontrolle, zunimmt. Nach 8 Stunden nimmt die Menge an ICAM-1 weiter zu und hat sich nach 24 Stunden verdoppelt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde entschieden, die Proben für die RNS-Analyse 7 Stunden nach dem Start der Ko-Inkubation von Endothelzellen mit infizierten Erythrozyten beziehungsweise Patienten-Plasma zu nehmen.

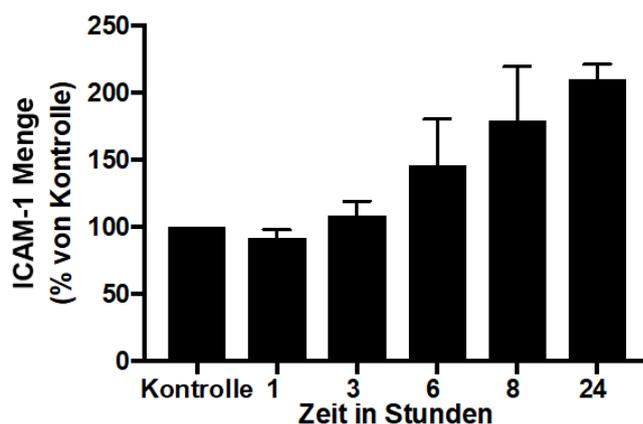


Abb. 5: Die relative Menge an ICAM-1 auf der Oberfläche der HBEC-5i Zellen nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  zu der angegebenen Zeit in Stunden. Bezogen wurde die Menge an ICAM-1 auf die nicht mit TNF- $\alpha$  stimulierten Kontrollzellen.

### 3.1.2 Bestimmung des optimalen Volumens für die Transkriptomanalyse

Der limitierende Faktor bezüglich der Größe der Kulturgefäße in dieser Transkriptomstudie war die Menge des zur Verfügung stehenden Patienten-Plasma. Von jedem Patienten waren nur Mengen zwischen 10-15 mL verfügbar. Wie in der Zellkultur üblich sollte das Kulturmedium mit 10% Plasma/Serum supplementiert und zur Ko-Inkubation auf die Zellen gegeben werden. Es musste eine Gefäßgröße gefunden werden, bei der die RNS-Ausbeute den Vorgaben der Firma BGI entsprach und nicht die Menge an zur Verfügung stehenden Patienten-Plasma überstieg. Wie aus Tabelle 9 entnommen werden kann, waren die Ausbeuten, beginnend von der 24-Lochplatte bis hin zur T75-Kulturflasche, allesamt über der geforderten Menge von 200 ng und daher ausreichend. Auch die Reinheit der RNS-Proben,

gemessen durch das Verhältnis der Absorptionsmaxima bei 260 nm zu 280 nm beziehungsweise 260 nm zu 230 nm, ist über dem vorgegebenen Grenzwert. Bei einer OD 260/280 von 2,0 gilt die RNS frei von Proteinen und bei einer OD 260/230 von 2,0 gelten RNS-Proben frei von Kontaminationen mit organischen Substanzen, wie Phenole. Die ‚RNA integrity number‘ (RIN), welche sich aus dem Verhältnis von 18S- zu 28S-rRNS errechnet, entsprachen bei allen Gefäßgrößen den Vorgaben der Firma BGI. Aus Gründen der Handhabung wurde entschieden, die Ko-Inkubationen und die Probenahme in T-25 Kulturflaschen durchzuführen. Bei einem Volumen von 5 mL Medium je Flasche wurden nur 500 µL Patienten-Plasma je Probe verwendet.

Tab. 9: Angaben zur Ausbeute in ng und Qualität der RNS sortiert nach Größe des Kulturgefäßes

Volumen	RNS [ng]	RNS Qualität			
		OD 260/280	OD 260/230	28S:18S	RIN
Vorgabe BGI	200 – 1000	≥1.8	≥1.8	≥1.0	≥7.0
24 Lochplatte	375	2,01	2,08	2,01	9,5
6 Lochplatte	1635	2,04	2,39	2,29	10
T-25 Flasche	4585	2,05	2,30	1,66	9,9
T-75 Flasche	11075	2,08	2,29	1,59	9,6

### 3.1.3 Supplementation der Patienten-Plasmen mit Heparin

Die in dieser Studie verwendeten Patienten-Plasmen wurden aus Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Blut gewonnen. Dies bedeutet, dass direkt bei der Entnahme das Blut mit dem Chelatbildner EDTA an der Gerinnung gehindert wurde. In Abbildung 6B ist zu sehen, dass die Gehirndothelzellen nach der Zugabe des EDTA-Plasmas lysierten und somit eine Transkriptomanalyse unmöglich machten. Dies lässt sich auf das Komplementsystem im Plasma zurückführen. In der Zellkultur wird Serum als Zusatz zum Kulturmedium hitzeinaktiviert, um das Komplementsystems zu inaktivieren. Dies ist in dieser Arbeit allerdings keine Option, da eine Behandlung der Patienten-Plasmen mit Hitze auch temperaturempfindliche Zytokine wie TNF-α instabilisieren würde (Aziz et al., 2016) . Daher wurde eine Heparinsalz-Lösung zu den Patienten-Plasmen gegeben. Sowohl EDTA als auch Heparin haben Komplementsystem-inaktivierende Eigenschaften (Sahu and Pangburn, 1993; Zapf and Loos, 1985). Allerdings führt nur eine Supplementation der EDTA-Plasmen mit Heparin zu einer ausreichenden Inaktivierung des Komplementsystems. In Abbildung 6C ist zu sehen, dass nach Zugabe von 100 US-pharmazeutischen Units (USP) die Lyse der Gehirndothelzellen verhindert werden konnte. Daher wurden alle in dieser Arbeit

verwendeten Patienten-Plasmen vor der Ko-Inkubation für 30 min mit 100 USP Heparin auf Eis vor-inkubiert.

### 3.1.4 Auswahl der Patienten-Plasmen für die Transkriptom-Studie

In dieser Arbeit standen 10 Plasmen von unterschiedlichen Malaria-Patienten zur Verfügung. Da aus wirtschaftlichen Gründen nur eine Untersuchung des Einflusses von 3 Patienten-Plasmen auf Gehirnendothelzellen möglich war, sollte das Aktivierungspotential jedes Plasmas auf die Gehirnendothelzellen untersucht werden. Hierfür wurden die Gehirnendothelzellen mit den unterschiedlichen Plasmen 7 Stunden ko-inkubiert und die Menge an ICAM-1 auf der Oberfläche der Gehirnendothelzellen mittels Zell-basierten ELISA gemessen. Nach einer ersten Messung zeigte sich, dass keines der Patienten-Plasmen die Menge des Aktivierungsmarkers ICAM-1 verändert (Abbildung 6D).

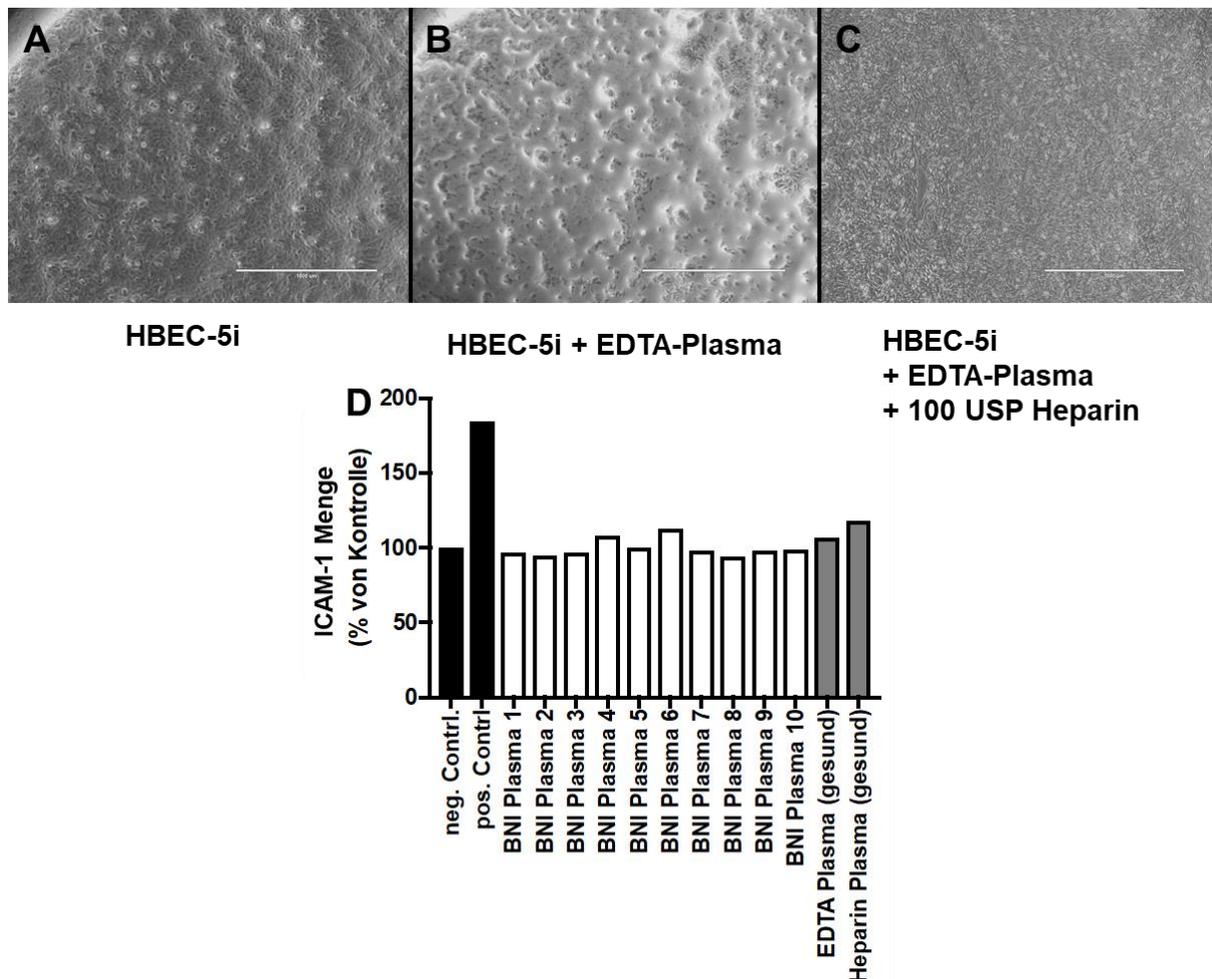


Abb. 6: (A) HBEC-5i Monolage ohne Zugabe von Plasma. (B) HBEC-5i Monolage nach Supplementierung mit EDTA-Plasma eines Malariapatienten. (C) HBEC-5i Monolage nach Supplementierung von EDTA-Plasma eines Malariapatientens, welches zuvor 30 min mit Heparinsalz vor-inkubiert wurde. (D) Die relative Menge an ICAM-1 auf der Oberfläche der HBEC-5i Monolage nach 7 Stunden Ko-Inkubation mit Heparinsalz behandeltem EDTA-Plasma von Malariapatienten und von einem gesunden Spender. Das Heparin-Plasma des gesunden Spenders wurde bei der Blutentnahme direkt in Röhrchen mit Heparin aufgefangen.

Um Plasma zu sparen wurden auf Wiederholungen des Experiments verzichtet. Daher wurden 3 Plasmen ausgewählt, bei denen die Infektion im gleichen Endemiegebiet stattfanden und die Parasitämie zwischen 2-7% lag. Ein Ethikantrag für die verwendeten Patienten-Plasmen liegt von der Ethik-Kommission der Ärztekammer vor (Beab.-Nr. PV3828). Angaben bezüglich Geschlechts, Nationalität, Wohnsitz und Symptome finden sich in Tabelle 10.

Tab. 10: Informationen zu den Patienten, die in dieser Transkriptom-Studie berücksichtigt wurden.

	Geschlecht	Nationalität	Wohnsitz in	Ort der Infektion	Parasitämie	Malariaepisoden	Symptome
BNI Plasma 1	männlich	Deutsch	Deutschland	Ghana	3%	3-4 malaria Episoden, letzte vor 15 Jahren	Fieber
BNI Plasma 2	männlich	Ghanaer	Deutschland	Ghana	2.5 %	keine	Fieber , Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Gelenkschmerzen
BNI Plasma 3	weiblich	Ghanaer	Deutschland	Ghana	7%	keine	Fieber, schwere Malaria (aufgrund hoher Parasitämie)

### 3.1.5 Anreicherung von Parasitenpopulationen auf die Gehirndothelzellen

Die Bindung von infizierten Erythrozyten an Endothelzellen wird über Proteine der *PfEMP1* Familie vermittelt, die von den *var*-Genen kodiert werden. Diese binden spezifisch an verschiedene Oberflächenrezeptoren auf den Endothelzellen. Der in dieser Arbeit verwendete Laborstamm IT4/FCR3 zeigte zu Beginn der Arbeit allerdings keine Bindung an die verwendete Gehirndothelzelllinie. Um den Einfluss der Zytoadhäsion untersuchen zu können, musste daher eine Parasitenpopulation angereicht werden, die spezifisch an die HBEC-5i Zellen bindet. Mittels mehrerer sogenannter *panning*-Runden konnten die Parasiten angereichert werden, welche die entsprechenden *PfEMP1*-Proteine zur Bindung an die Gehirndothelzellen exprimieren. In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass bei 37°C in der ersten Anreicherungsrunde nicht detektierbare Mengen an infizierten Erythrozyten an die Gehirndothelzellen gebunden hatten. Nach drei Anreicherungsunden konnte die Bindung vereinzelter infizierte Erythrozyten nachgewiesen werden. Die Anzahl der gebundenen Erythrozyten stieg mit jeder Anreicherungsrunde bis nach der siebten Runde eine Sättigung der Bindung zu erkennen war. Ebenfalls wurde eine Anreicherung der FCR3/IT4 Parasiten über Gehirndothelzellen bei 40°C durchgeführt. Bezugnehmend auf die Ergebnisse des Zell-ELISA (Abbildung 5) wurden die Endothelzellen zuvor für 7 Stunden bei 40°C vorinkubiert. Auch hier ließ sich mit jeder Anreicherungsrunde eine steigende Zahl an gebundenen infizierten Erythrozyten auf den Endothelzellen nachweisen. Eine Sättigung der Bindung ließ sich hier schon nach 5 Anreicherungsunden erkennen. In der folgenden Arbeit wurde zwischen drei Parasitenpopulationen unterschieden. Die nicht angereicherte

Stammkultur wird im Folgenden als IT4-NE (engl. für *not-enriched*) bezeichnet. Die Parasitenkultur, die bei 37°C über HBEC-5i Zellen angereichert wurde, wird als IT4-EC37 bezeichnet und die bei 40°C angereicherte Parasitenpopulation wird IT4-EC40 genannt.

Während der unterschiedlichen Anreicherungsrounden wurden Parasitensuspensionen mit unterschiedlicher Parasitämien eingesetzt. Daher lassen die Bilder keine quantitative Aussage über die Zahl der gebundenen infizierten Erythrozyten zu. Aus diesem Grund wurde ein statischer Bindungs-Assay mit den unterschiedlichen Parasitenpopulationen durchgeführt, bei den die gleiche Anzahl an Parasiten zu den Endothelzellen gegeben wurde. Abbildung 7B bestätigt, dass die IT4-NE Stammkultur nicht an die Gehirndothelzellen bindet. Nach 7 Anreicherungsrounden bei 37°C binden  $70 \pm 44$  IEs pro 100 HBEC-5i. Parasiten die bei 40°C angereicht wurden binden mit  $338 \pm 150$  IEs pro 100 HBECs in einer deutlich höheren Anzahl. Parasiten ‚switchen‘ die *var*-Gen Expression. Daher war es notwendig auch

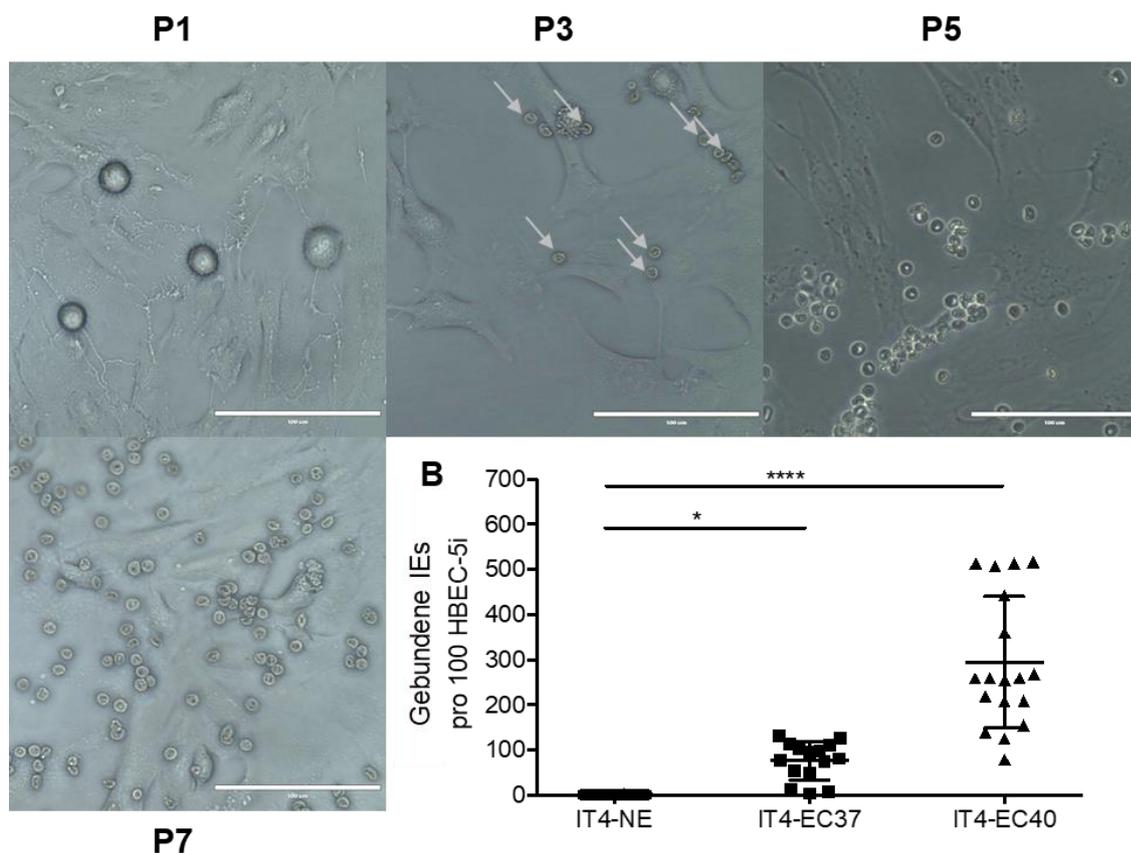


Abb. 7: Bindungsverhalten der IT4-EC37 Parasiten nach einer (P1), drei (P3), fünf (P5) und sieben (P7) Anreicherungsrounden mit unterschiedlichen Parasitämien. (B) Bindungskapazität der Parasitenpopulationen IT4-NE, IT4-EC37 und IT4-EC40 mit gleicher Parasitämie an HBEC-5i in einem statischen Bindungs-Assay. Jeder Punkt repräsentiert einen Bindungs-Assay. IT4-NE n=18; IT4-EC37 n=15; IT4-EC40 n=18. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels ‚ordinary one-way ANOVA‘ und anschließenden ‚Tukey’s post hoc test‘ analysiert (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). (IEs= infizierte Erythrozyten)

nach 5 beziehungsweise 7 Anreicherungsrounds zu späteren Zeitpunkten regelmäßig ein ‚panning‘ durchzuführen.

### 3.1.6 Experimenteller Aufbau

Aus den Voruntersuchungen ergab sich folgender Versuchsaufbau (Abbildung 8). Die Gehirndothelzellen wurden für 7 Stunden in T-25 Kulturflaschen entweder bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit IT4-NE und IT4-EC37 Parasitenpopulation ko-inkubiert oder bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> beziehungsweise bei 40°C zusammen mit IT4-EC40 Parasiten für 7 Stunden ko-inkubiert. Ebenfalls wurden 500 µL der 3 Heparin-behandelten Patienten-Plasmen mit 5 mL Human Serum-freiem Kulturmedium verdünnt und zu den Gehirndothelzellen gegeben. Die Inkubation fand bei 37°C für 7 Stunden statt. Anschließend wurden die Proben direkt in TRIzol® aufgenommen und die RNS isoliert. Eine anschließende Erstellung einer cDNA Bank und RNS-Sequenzanalyse wurde von der Firma BGI durchgeführt. Um genaue Aussagen über differentiell exprimierte Gene zu machen wurde jede Versuchsbedingung in vierfacher Ausführung und je mit einer Fragment-Zahl (*reads*) von 10 Millionen pro Ansatz durchgeführt.

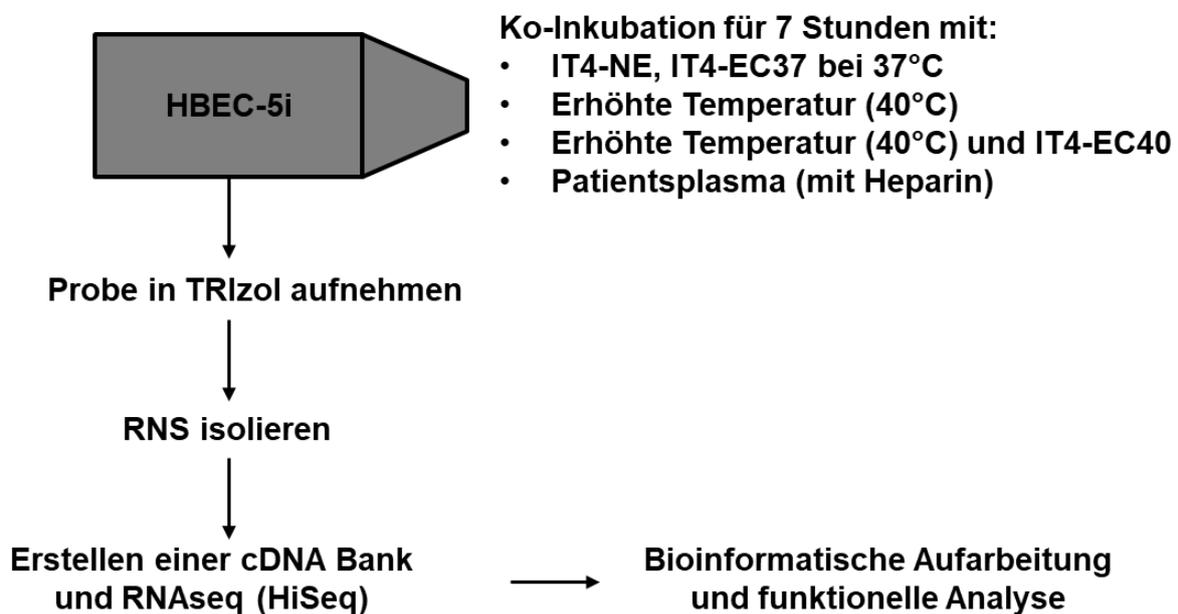


Abb. 8: Experimenteller Aufbau. Nach der Ko-Inkubation der HBEC-5i Zellen mit den verschiedenen Parasitenpopulationen und/oder erhöhter Temperatur, sowie Patienten-Plasma wurden die HBEC-5i (und infizierte Erythrozyten falls vorhanden) in Trizol® aufgenommen und bei -80°C gelagert. Anschließend fand die Aufreinigung der RNS statt, welche daraufhin zur Firma BGI verschickt wurden. Die Erstellung einer cDNA Bank, sowie die Sequenzierung wurden von der Firma BGI durchgeführt. Eine anschließende bioinformatische Aufarbeitung wurde von Dr. Stephan Lorenzen durchgeführt. Für die abschließende funktionelle Analyse wurden die durch die differentiell exprimierten Gene kodierten Proteine hinsichtlich ihrer Relevanz in biologischen Prozessen (GO-Terme) und Signal- und Stoffwechselwegen untersucht.

Abschließend wurden die Daten der Sequenzanalyse bioinformatisch aufgearbeitet. Daraufhin wurde eine funktionelle Analyse der Proteine durchgeführt, die von den identifizierten, differentiell exprimierten Genen kodiert werden.

### 3.2 Effekt der Zytoadhäsion an Gehirndothelzellen und febrilen Temperatur auf *P. falciparum*

Der Fokus der meisten bisher veröffentlichten Transkriptom-Studien, bezüglich der Effekte der Zytoadhäsion, liegt auf dem Einfluss der Bindung an die Endothelzellen. Es wurde gezeigt, dass Endothelzellen auf die Zytoadhäsion mit der Sezernierung verschiedener Zytokine und Chemokine reagieren und dass die Integrität des endothelialen Zellverbandes beeinträchtigt wird (Tripathi et al., 2009; Tripathi et al., 2006, 2007). Wie sich die Zytoadhäsion auf die Transkription des Parasiten auswirkt, ist bisher kaum untersucht. Auch wurde der Einfluss erhöhter Körpertemperaturen auf die Zytoadhäsion in Transkriptom-Studien wenig untersucht. Daher sollen die Expressionsprofile der drei Parasitenpopulationen IT4-NE, IT4-EC37 und IT4-EC40 im ersten Abschnitt der Transkriptomanalyse untersucht werden.

#### 3.2.1 Effekt der Zytoadhäsion an Gehirndothelzellen und febrilen Temperatur auf die *P. falciparum* var-Gen Expression

In Abbildung 7B ist zu sehen, dass fast 5-mal so viele infizierte Erythrozyten der IT4-EC40 Population an die Gehirndothelzellen binden im Vergleich zu der IT4-EC37 Parasitenpopulation. Wie bereits erwähnt wird die Zytoadhäsion über PfEMP1 Proteine, welche von *var*-Genen kodiert werden, an verschiedene Oberflächenproteine der Endothelzellen vermittelt. Daher sollte zunächst das *var*-Gen-Expressionsprofil der einzelnen Parasitenpopulationen miteinander verglichen werden. Hierfür wurden ausschließlich das Expressionsniveau der *var*-Gene in Parasiten im Ring-Stadium (ca. 6-10 Stunden nach Invasion der Erythrozyten) miteinander verglichen. In den Abbildungen 9A/B ist zu erkennen, dass die Stammkultur (IT4-NE) verschiedene *var*-Gene aus unterschiedlichen Gruppen exprimiert. Die meisten Parasiten in dieser Population exprimieren das Gruppe C *IT4\_var34* (79%) und das Gruppe A *IT4\_var35* (6%) *var*-Gen, gefolgt von *IT4\_var 23* (3%) und *IT4\_var59* (2%). Alle weiteren *var*-Gene wurden mit 1,5% oder weniger nur von wenigen Parasiten exprimiert. Von beiden Populationen, die an die Gehirndothelzelllinie angereichert wurden, wurde hauptsächlich das Gruppe E *var*-Gen *IT4\_var04* exprimiert. Mit 97% aller *var*-Fragmente war die Expression von *IT4\_var04* in IT4-EC40 noch dominanter als bei der IT4-

EC37 Population mit 93% aller *var*-Fragmente. Beide Populationen exprimierten zwar hauptsächlich das *var*-Gen *IT4\_var04*, doch unterschied sich die Zahl der Sequenzfragmente deutlich. Mit 94.134 Fragmenten in der IT4-EC40 Parasitenpopulation war die *var*-Gen Expression nahezu verdoppelt, verglichen mit den 49.285 Fragmenten in der bei 37°C angereicherten Parasitenpopulation.

Über die Regulationsmechanismen der *var*-Gen Expression ist bisher wenig bekannt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die paralogen Sirtuine Sir2a und Sir2b die Expression von Oberflächenproteinen-kodierenden Genen in *P. falciparum*, und hier im speziellen auch der *var*-Gene, reguliert (Merrick et al., 2010; Tonkin et al., 2009). Jedoch zeigte sich in den Transkriptomdaten, dass sich die Transkription des *pfSir2a* und des *pfSir2b* in den Populationen IT4-EC37 und IT4-EC40 nicht signifikant unterscheidet (Abbildung 9C).

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, ob eine erhöhte *var*-Gen Expression auch zu einem erhöhten Niveau an PfEMP1 Protein auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten führte. Mit Hilfe der Protease Trypsin, lassen sich alle auf der Oberfläche des Erythrozyten lokalisierten Proteine von der Zelle abspalten. Im Falle der PfEMP1 Proteine bedeutet dies, dass nach der Trypsin-Behandlung die extrazellulären Domänen abgespalten werden und nur noch die Transmembrandomäne sowie die konservierte intrazelluläre ATS-Domäne in der Zelle verbleiben. Das Trypsin-behandelte PfEMP1 ist somit deutlich kleiner als das mature PfEMP1 Protein. Die Proteine können ihrer Größe nach mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen die intrazelluläre ATS-Domäne, im Western Blot-Verfahren detektiert werden. In der Abbildung 9D ist zu sehen, dass im Vergleich zu den IT4-EC37 Parasiten die Menge an PfEMP1 um das 1,4fache (bei nicht trypsinierten Erythrozyten) erhöht war. Nach Trypsin-Behandlung war der Unterschied noch deutlicher. Hier war die Menge an PfEMP1, welches in der Zelle lokalisiert war, bei den IT4-EC40 um das 3,6fache erhöht. Bei den trypsinierten IT4-EC40 Parasiten war eine ATS-Proteinbande bei ca. 90 kDa zu erkennen. Eine solche Bande konnte bei der IT4-EC37 Population auf diesem Blot nicht nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass bei 37°C angereicherten Parasiten überhaupt PfEMP1 an die Oberfläche transportiert wird, wurde eine erneute SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot mit erhöhten Mengen an Parasitenlysat durchgeführt. Bei einer 3fach erhöhten Menge an Lysat konnte

auf dem anschließendem Western Blot auch bei der IT4-EC37 Population eine ATS-Proteinbande bei ungefähr 90 kDa detektiert werden (Abbildung 10).

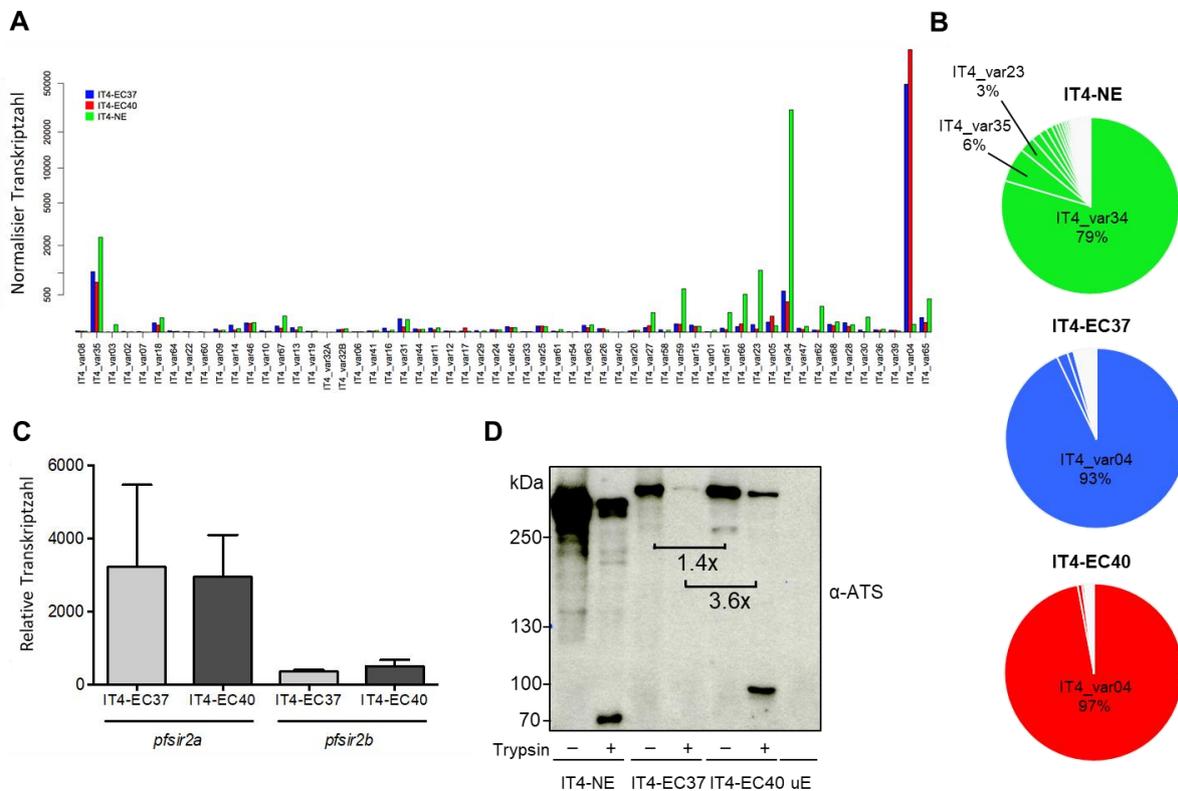


Abb. 9: var-Gen Profil und PfEMP1 Präsentation auf der Oberfläche der verschiedenen Parasitenpopulationen angereichert an HBEC-Si Zellen bei 37°C und 40°C. (A) Die Expression der var-Gene in den IT4-EC37 und IT4-Ec40 Parasiten verglichen mit dem nicht-angereicherten Laborstamm IT4 (IT4-NE). Angegeben ist die relative Transkriptzahl, welche sich aus den normalisierten Transkriptzahlen aus 4 unabhängigen Transkriptionsanalysen ergibt. (B) Verteilung der var-Gen Expression in den Parasitenpopulationen IT4-NE, IT4-EC37 und IT4-EC40. Jedes Stück des Tortendiagramms repräsentiert ein var-Gen. (C) Expressionsniveau des pfsir2a und pfsir2b Gene aus 4 unabhängigen Transkriptomanalysen. (D) Western Blot Analyse zum Nachweis von ATS wurde mit unbehandelten (-) und Trypsin-behandelten (+) infizierten Erythrozyten sowie nicht-infizierten Erythrozyten durchgeführt. Alle Proben wurden in Laemmli Puffer gelöst, mittel 6% SDS-PAGE getrennt und mittel Immunoblotting analysiert. Dabei wurde ein Äquivalent von  $1 \times 10^7$  Zellen in jede Gel-Tasche gegeben. Der ATS-Antikörper detektiert PfEMP1, welche an der Oberfläche lokalisiert ist, als Trypsin-gespaltenes intrazelluläre ATS-Domäne. Für den Vergleich der relativen Proteinmenge wurden die Proteinmengen mittels korrespondierenden Coomassie-Gels normalisiert.

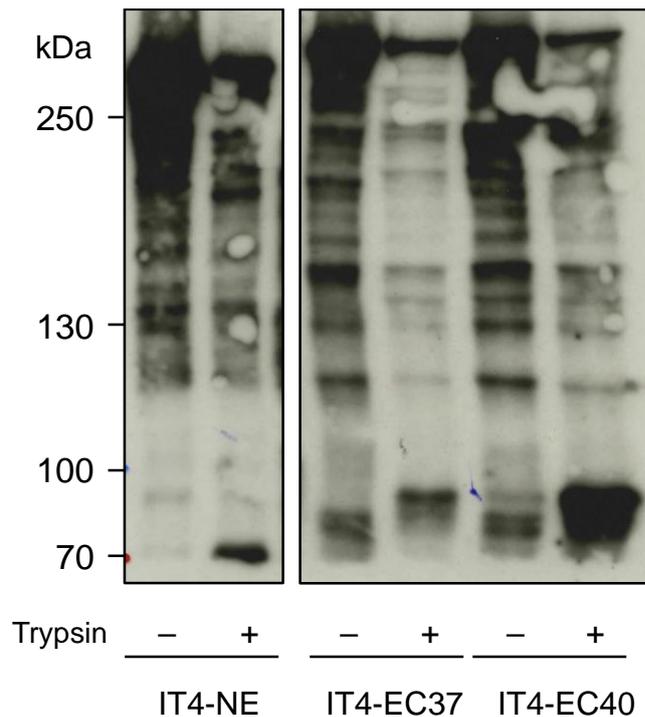


Abb. 10: Western Blot Analyse der ATS-Fragmente. Trypsin-behandelte oder nicht-behandelte infizierte Erythrozyten und nicht-infizierte Erythrozyten wurden in Laemmli Puffer aufgenommen in einem 6% SDS-PAGE getrennt und auf Immunoblots analysiert. Die Taschen des Gels wurden jeweils mit einem Äquivalent von  $3 \times 10^7$  infizierte, beziehungsweise nicht-infizierte Erythrozyten beladen. Der ATS Antikörper detektiert PfEMP1, welches an der Oberfläche lokalisiert ist, an der intrazellulären ATS-Domäne, die trotz der Behandlung mit Trypsin in dem infizierten Erythrozyten verbleibt.

Es sollte auch geklärt werden, ob die erhöhte *var*-Gen Expression in den IT4-EC40 Parasiten ausschließlich eine Reaktion auf die erhöhte Temperatur war. Daher wurde von dem eine quantitative real-time PCR etabliert, bei der die Expression ausgesuchter *var*-Gene untersucht wurde. Hierfür wurde die IT4-NE Parasitenkultur über den angegebenen Zeitraum wöchentlich für 90 min bei 40°C im Brutschrank kultiviert. In Tabelle 11 ist zu erkennen, dass das Expressionsniveau bei keinem der *var*-Gene stark verändert war.

Tab. 11: Relative Expression von ausgewählten *var*-Genen von IT4-EC37, IT4-EC40 und IT4-NE (Hitzeschock bei 40°C) verglichen mit IT4-NE.

Gen Name	Gen ID	IT4-EC37	IT4-EC40	IT4-NE 40°C
IT4_var04	PFIT_1200200	60,4	81,39	0,96 ± 0,8
IT4_var13	PFIT_0411400	0,36	0,82	0,88 ± 0,87
IT4_var41	PFIT_0900100	0,24	0,44	0,68 ± 0,41
IT4_var02	PFIT_bin08900	0,24	0,58	0,69 ± 0,93
IT4_var28	PFIT_0711000	0,15	0,38	0,35 ± 0,39

### 3.2.2 Erhöhte Bindungskapazität an Chondroitin-Sulfat A (CSA) bei Parasiten mit erhöhter *var*-Gen Expression

Bei den Parasiten, welche bei 40°C über Gehirnendothelzellen angereichert wurden, steigt die Menge an PfEMP1 Protein an der Oberfläche der infizierten Erythrozyten. Es konnte

bereits in den Voruntersuchungen gezeigt werden, dass diese Parasiten eine erhöhte Bindungskapazität aufweisen. Die Zahl der gebundenen IT4-EC40 infizierten Erythrozyten pro 100 Gehirnendothelzellen verglichen mit den IT4-EC37 Parasiten war um mehr als das 4fache erhöht (Abbildung 7B). In den Transkriptom-Daten zeigte sich, dass bei beiden angereicherten Parasitenpopulationen hauptsächlich *IT4-var04* exprimiert wurde (Abbildungen 9A und 9B). *IT4\_var04* kodiert ein PfEMP1, welches als VAR2CSA bekannt ist. Mehrere Studien mit VAR2CSA konnten zeigen, dass dieses PfEMP1 die Bindung an Chondroitin Sulfat A (CSA) auf den Endothelzellen vermittelt (Dahlback et al., 2011; Fried and Duffy, 1996; Obiakor et al., 2013). Um zu überprüfen, dass dies auch in dieser Arbeit der Fall war, wurden die infizierten Erythrozyten vor dem Bindungs-Assay mit löslichem CSA (engl. *solubleCSA*, (sCSA)) vor-inkubiert. In Abbildung 11A ist zu sehen, dass sCSA nicht allgemein die Bindung von Parasiten an die Gehirnendothelzellen unterbindet. IT4-NE infizierte Erythrozyten waren auch nach der Inkubation mit sCSA in der Lage in nahezu gleicher Anzahl an transgene CHO-CD36 Zellen zu binden. Mit  $250 \pm 101$  und  $199 \pm 79$  infizierte Erythrozyten pro 100 CHO-CD36 Zellen war keine signifikante Veränderung der Bindungskapazität nachweisbar. Anders war dies bei den beiden Parasitenpopulation IT4-EC37 und IT4-EC40. Beide Populationen verloren nach der Inkubation mit sCSA komplett die Fähigkeit an die Gehirnendothelzellen zu binden. Der gleiche Effekt war zu beobachten, wenn die Gehirnendothelzellen vor dem statischen Bindungs-Assay mit Chondroitinase ABC behandelt wurden (Abbildung 11B). IT4-EC37 und IT4-EC40 Parasiten waren nicht in der Lage an die Endothelzellen zu binden, welche kein CSA mehr auf der Oberfläche präsentierten. Die Ergebnisse beider Experimente und die Auswertung der *var*-Gen Expression mit Hilfe der Transkriptom-Daten lassen die Aussage zu, dass die Zytoadhäsion der angereicherten Parasitenpopulation an die Gehirnendothelzelllinie HBEC-5i über VAR2CSA an CSA erfolgte.

Temperaturen, die die normale Körpertemperatur übersteigen, beeinflussen die Stabilität von Proteinen. In einem weiteren statischen Bindungs-Assay sollte daher überprüft werden, ob die Inkubation bei 40°C Einfluss auf die Stabilität der Bindungsproteine nimmt und so zu einer erhöhten Bindungskapazität beiträgt. Die Ergebnisse des Bindungs-Assay mit beiden angereicherten Parasitenpopulationen bei 40°C zeigte keine signifikant veränderte Bindungskapazität (Abbildung 11C). Mit  $240 \pm 63$  (bei 40°C) und  $236 \pm 51$  (bei 37°C) gebundenen IT4-EC40 infizierten Erythrozyten und  $45 \pm 25$  (bei 40°C) und  $70 \pm 28$  (bei 37°C) gebundenen IT4-EC37 infizierten Erythrozyten ist das Bindungsverhalten durch die erhöhte

Temperatur nicht signifikant beeinträchtigt. Bei der IT4-NE Population konnte auch bei 40°C keine Bindung von infizierten Erythrozyten an die Gehirndothelzellen beobachtet werden.

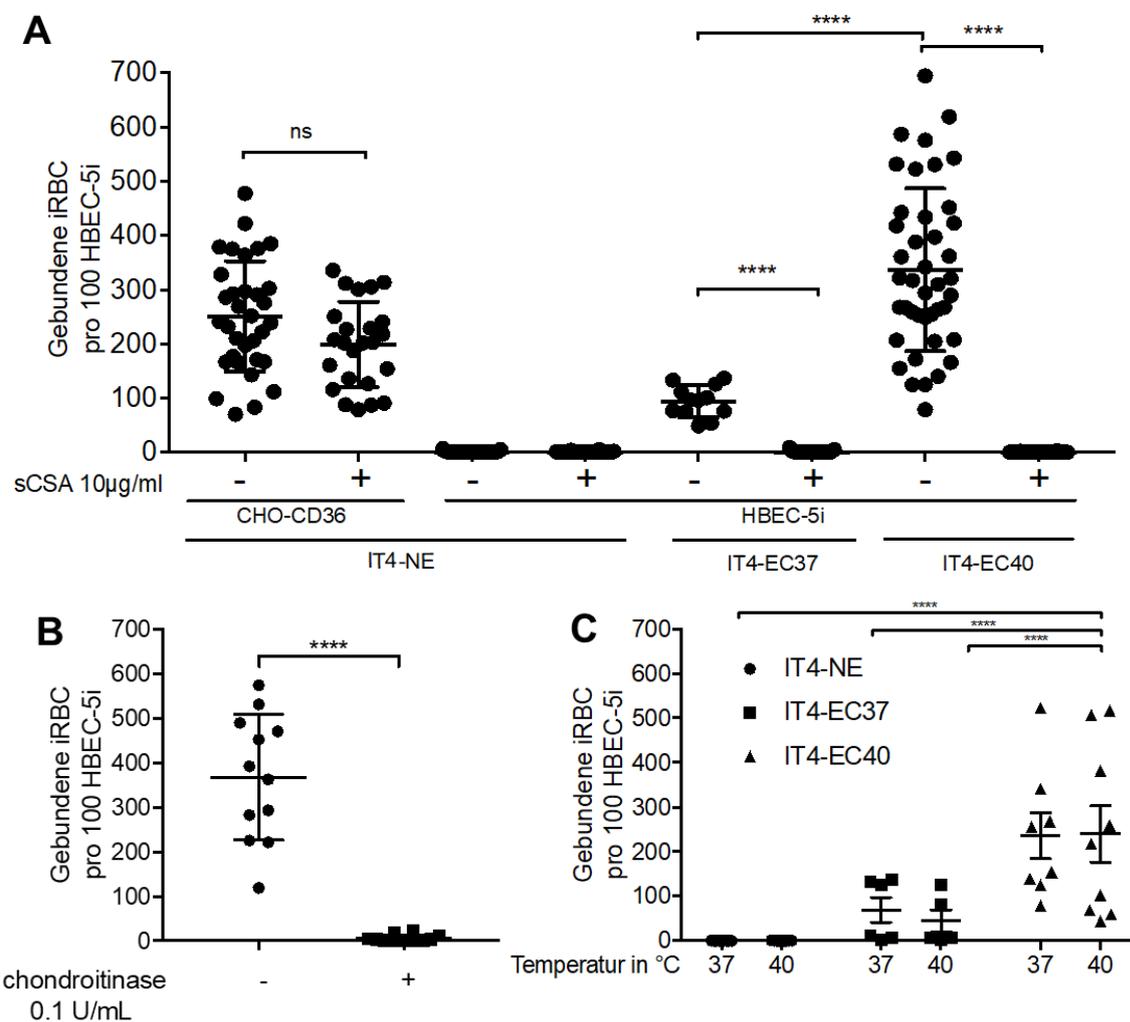


Abb. 11: Bindungskapazität der angereicherten Parasitenpopulationen sowie des nicht-angereicherten Laborstamms IT4 an HBEC-5i und transgene CHO-Zellen. (A) Bindungskapazität von IT4-NE Parasiten an transgene CHO-Zellen und HBEC-5i Zellen und die Bindungskapazität der Parasitenpopulationen IT4-EC37 und IT4-EC40 an HBEC-5i Zellen. Präinkubation der infizierten Erythrozyten mit (+) beziehungsweise ohne (-) 10 µg/ml löslichem CSA. Jeder Punkt repräsentiert einen Bindungs-Assay. IT4-NE/CHO-CD36: (-) n=33, (+) n=24; IT4-NE/HBEC-5i: (-) n=42, (+) n=32; IT4-EC37/HBEC-5i: (-) n=12, (+) n=29; IT4-EC40/HBEC-5i: (-) n=27, (+) n=36. (b) Statischer Bindungs-Assay von IT4-EC40 Parasiten an HBEC-5i Zellen welche zuvor ohne (-) beziehungsweise mit (+) 0,1 U/mL Chondroitinase ABC inkubiert wurden (n=12). Statischer Bindungs-Assay von IT4-NE, IT4-EC37 und IT4-EC40 Parasitenpopulationen durchgeführt bei 37°C und 40°C. n=9: IT4-NE 37°C/40°C, IT4-EC40-40°C; n=8: IT4-EC40-37°C; n=6: IT4-EC37-37°C; n=5: IT4-EC40-40°C. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels 'ordinary one-way ANOVA' und 'Tukey's post hoc test analysiert (ns p>0,05; \*\*\*\* p<0,0001).

### 3.2.3 Zytoadhäsion an Gehirndothelzellen bei Fieber induziert die Knob-Bildung

Die Zytoadhäsion kann von mehr als nur der Menge an PfEMP1 an der Oberfläche der Erythrozyten beeinflusst werden. Um mögliche andere Faktoren zu identifizieren, wurden die Transkriptom-Daten der beiden angereicherten Parasitenpopulationen im Ring-Stadium untersucht. Bei dem Vergleich (Tabelle 12) der Transkriptom-Daten fiel auf, dass 6 der 10 am Stärksten hochregulierten Gene in der subtelomeren Region des Chromosoms 2 lokalisiert

waren (PFIT\_0200800, PFIT\_0200900, PFIT\_0201000, PFIT\_0201100, PFIT\_0201200, PFIT\_0201300). Wiederum 4 der 6 genannten Gene kodieren Proteine, die für die Ausbildung von Knobs wichtig sind. Knobs sind Ausstülpungen der Erythrozytenmembran infizierter Erythrozyten, an denen die PfEMP1 Proteine verankert sind. Daher haben diese Strukturen direkten Einfluss auf die Bindungskapazität der infizierten Erythrozyten (Biggs et al., 1989; Horrocks et al., 2005; Luse and Miller, 1971; Rug et al., 2006).

Tab. 12: Liste der Gene, die in der IT4-EC40 Parasitenpopulation durch die Anreicherung um den Faktor 4 oder mehr (verglichen zur IT4-EC37 Parasitenpopulation) hochreguliert wurden.

Gen Name	Gen ID	IT4-EC37	IT4-EC40	x-fache Veränderung	Quelle
knob-associated histidine-rich protein	PFIT_0201300	0	148657	N/A	Rug 2006
erythrocyte membrane protein 3	PFIT_0201200	0	21077	N/A	Pasloske 1994
knob associated heat shock protein 40	PFIT_0201100	0	14136	N/A	Acharya 2012
DnaJ protein, putative	PFIT_0201000	0	4965	N/A	Goel 2014
PHISTb domain-containing RESA-like protein 1	PFIT_0200900	0	3861	N/A	Goel 2014
rifin	PFIT_0424300	0	2377	N/A	
Plasmodium exported protein (hyp9), unknown function	PFIT_0200800	0	388	N/A	Sargeant 2006
rifin	PFIT_bin10000	9	302	34	
Plasmodium exported protein (PHISTa), unknown function	PFIT_0423600	7	108	16	
ring-infected erythrocyte surface antigen 2, pseudogene	PFIT_1149700	102	1405	14	
Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function	PFIT_0423000	242	2535	10	
glycophorin binding protein	PFIT_1300400	272	2076	8	Alampalli 2018
Plasmodium exported protein (PHISTa), unknown function	PFIT_0423100	852	5709	7	
asparagine-rich antigen, putative	PFIT_0931800	25	158	6	
Plasmodium exported protein, unknown function	PFIT_0725000	789	4099	5	
acyl-CoA synthetase	PFIT_0801900	141	695	5	Alampalli 2018
virulence-associated protein 1	PFIT_0937100	67	307	5	
nucleoporin NUP116/NSP116, putative	PFIT_1474800	518	2248	4	
Plasmodium exported protein, unknown function	PFIT_1352100	362	1554	4	
conserved Plasmodium protein, unknown function	PFIT_1466700	37	155	4	
DnaJ protein, putative	PFIT_1402000	8666	34452	4	
Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function	PFIT_0219100	463	1835	4	

Bei der Ausbildung von Knobs ist KHARP essentiell (Culvenor et al., 1987; Rug et al., 2006). Im nächsten Schritt sollte daher die Translation der RNS auf Proteinebene überprüft werden. Mit SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western Blot-Analyse konnte verifiziert werden, dass bei der IT4-EC40 Population KAHRP in den Lysaten vorhanden war (Abbildung 12A). Dahingegen war eine Detektion von KAHRP bei den IT4-EC37 und IT4-NE Parasiten nicht möglich. Um anschließend noch zu zeigen, dass das Vorhandensein von KAHRP Proteinen zu einer Ausbildung von Knob-Strukturen führte, wurden die verschiedenen Populationen mit dem Elektronenmikroskop untersucht. Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung decken sich mit den Ergebnissen aus dem Western Blot. Alle IT4-NE (n=318) und IT4-EC37 (n=138) Parasiten zeigten keine elektronendichten Strukturen an der Erythrozytenmembran (Abbildung 12B und 12C). Dahingegen waren bei allen 268 untersuchten IT4-EC40 infizierten Erythrozyten

Ausstülpungen auf ihrer Oberfläche zu erkennen (Abbildung 12D). Um zu untersuchen, ob auch bei den Parasiten, die nur einem Hitzeschock ausgesetzt waren, Knob-Strukturen ausgebildet werden, wurde ein Teil der IT4-NE Population über den Zeitraum von 4 Wochen einmal wöchentlich für 90 min bei 40°C inkubiert. Dieses Experiment wurde von dem Masterstudenten Vincent Jordan durchgeführt. Die Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop ergab, dass auch hier keine Knob-Strukturen an der Oberfläche der infizierten Erythrozyten zu erkennen waren (Abbildung 12E). Diese Ergebnisse zeigten, dass nur eine Kombination aus Zytoadhäsion an Gehirnendothelzellen und Hitzeschock die Bildung der Knob-Strukturen induziert.

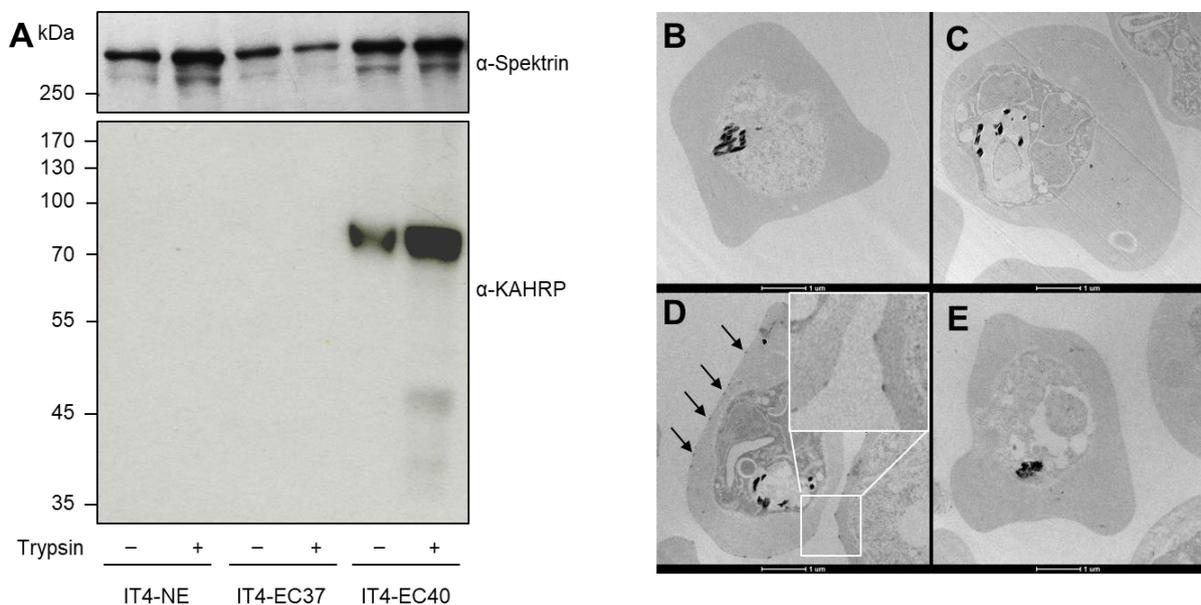


Abb. 12: KAHRP Expression und Knob-Bildung. (A) Der Nachweis von KAHRP mittels Western Blot wurde mit der Membranfraktion der infizierten Erythrozyten durchgeführt, wobei Spektrin als Kontrolle diente. Elektronenmikroskopische Bilder von (B) IT4-NE, (C) IT4-EC37, (D) IT4-EC40 und (E) IT4-NE (40°C Hitzeschock-behandelt). Durch die Pfeile sind Knob-Strukturen hervorgehoben. Es wurden mindestens 150 infizierte Erythrozyten je Parasitenpopulation untersucht.

### 3.2.4 Erhöhte Bindungskapazität durch Anreicherung bei febrilen Temperaturen bleibt über einen längeren Zeitraum erhalten

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Kombination aus Fieber und Zytoadhäsion einen starken Einfluss auf die Genexpression der Parasiten nahm und somit das Bindungsverhalten beeinflusst. Es sollte nun untersucht werden, ob die Veränderungen im Bindungsverhalten über einen längeren Zeitraum erhalten blieben oder reversibel sind. Hierfür wurde die IT4-EC40 Parasitenpopulation in der Sub-Populationen unterteilt. Die erste wurde wie bisher bei 40°C alle zwei Wochen über die Gehirnendothelzellen angereichert (IT4-EC40 P40°C). Diese Population diente als Kontrolle, zu der das Bindungsverhalten aller weiterer Sub-

Populationen bezogen wurde. Die zweite Population wurde ebenfalls alle zwei Wochen über Gehirndothelzellen angereichert. Jedoch fand die Anreicherung bei 37°C statt (IT4-EC40 P37°C). Die dritte Sub-Population wurde gar nicht mehr angereichert (IT4-EC40 no panning). Die IT4-EC37 wurde in zwei Sub-Populationen unterteilt. So wurde die erste Sub-Population weiter bei 37°C angereichert (IT4-EC37 P37°C) und die zweite wurde nicht mehr angereichert (IT4-EC37 no panning). Bei der IT4-EC40 Sub-Population, die über den Zeitraum des Experiments bei 37°C angereichert wurde, sank die Bindungskapazität bezogen auf die Kontrolle nach 2 Wochen auf 60% und veränderte sich daraufhin nicht mehr. Die IT4-EC40 Sub-Population, die nicht mehr angereichert wurde, veränderte ihre Bindungskapazität dahingegen nicht. Die Zahl der gebundenen Erythrozyten unterschied sich nur geringfügig von der Kontrolle. Das Gleiche war bei den IT4-EC37 Sub-Populationen zu beobachten. Auch hier blieb Zahl an gebundenen infizierten Erythrozyten über die 4 Wochen unabhängig von der Anreicherung auf einem gleichen Niveau (Abbildung 13).

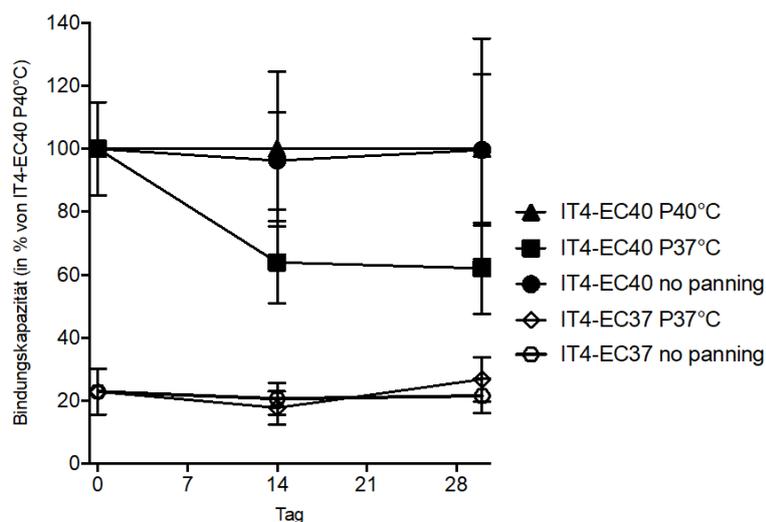


Abb. 13: Persistenz der Bindungskapazität der angereicherten Parasitenpopulationen. IT4-EC40 Parasiten wurden entweder weiter bei 40°C an HBEC-5i Zellen angereichert (IT4-EC40 P40°C), bei 37°C angereichert (IT4-EC40 P37°C) oder nicht weiter angereichert (IT4-EC40 no panning). IT4-EC37 Parasiten wurden entweder weiter bei 37°C angereichert (IT4-EC37 P37°C) oder nicht weiter angereichert (IT4-EC37 no panning). Die Symbole repräsentieren die durchschnittliche Zahl an gebundenen infizierten Erythrozyten  $\pm$  SD je 100 HBEC-5i Zellen verglichen mit der Kontrolle IT4-EC40 P40°C.

### 3.2.5 Effekte der Zytoadhäsion von *P. falciparum* und Fieber auf die Gehirndothelzellen

Der bisherige Fokus der Arbeit lag auf der Analyse der transkriptionellen Veränderungen, die durch die Zytoadhäsion und Fieber, in dem Parasiten induziert wurden. In diesem Abschnitt der Arbeit sollte der Fokus auf der Analyse der differentiell exprimierten Gene der Gehirndothelzellen liegen. Als ein differentiell exprimiertes Gen galten alle Gene, deren

Expression sich infolge des/der Stimulus/Stimuli mindestens um den Faktor 2 erhöhte (hochreguliert) oder mindestens um den Faktor 2 erniedrigte (runterreguliert). Dabei wurden nur Gene in die funktionellen Analysen mit einbezogen, wenn diese Veränderung auch mit einem adjustierten p-Wert von  $<0,05$  einherging. Ziel der Vergleiche der Transkriptom-Daten war es, aufzudecken, wie die Gehirnendothelzellen auf die jeweiligen Stimuli reagierten. Zusätzlich sollte untersucht werden, wie sich eine Kombination der Zytoadhäsion und der erhöhten Körpertemperatur auf die Zellen auswirkte und wie sich diese transkriptionellen Veränderungen von denen bei 37°C unterschieden.

Im normalen Blutstrom werden Erythrozyten aufgrund des Magnus-Effekts weg von den Gefäßwänden hin zur Flussachse des Blutflusses gedrückt. Allerdings kommt es aufgrund des eingeschränkten, beziehungsweise geblockten Blutflusses durch adhärierende infizierte Erythrozyten während eine *P. falciparum*-Infektion zu einem Kontakt zwischen Endothelzellen und nicht-infizierten Erythrozyten. Diese Erythrozyten können ebenfalls über Plasmafaktoren, wie Fibrinogen und Fibronektin, an Endothelzellen binden und *in vitro* im geringen Maße ICAM-1 induzieren (Brown et al., 2001; Wautier et al., 1983). Aufgrund dieser Veränderungen mussten die Transkriptom-Daten der Endothelzellen, die mit den Parasiten ko-inkubiert wurden, mit zwei Kontrollen verglichen werden. Als Kontrolle wurden einmal Transkriptom-Daten von Endothelzellen ohne Ko-Inkubation gewählt. Die zweite Kontrolle waren die Transkriptom-Daten der Endothelzellen, die mit nicht-infizierten Erythrozyten ko-inkubiert wurden. Bei den Kontrollen ohne Ko-Inkubation wurde ebenfalls die Temperatur angepasst. So wurden die transkriptionellen Veränderungen durch die Ko-Inkubation mit IT4-EC37 mit den transkriptionellen Veränderungen der Kontrolle ohne Ko-Inkubation bei 37°C (Vergleich 1, Tabelle 13) und die transkriptionellen Veränderungen durch die Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C mit den transkriptionellen Veränderungen durch die Kontrolle ohne Ko-Inkubation bei 40°C verglichen (Vergleich 2, Tabelle 13). Dahingegen wurde die Kontrolle mit den nicht-infizierten Erythrozyten ausschließlich bei 37°C durchgeführt und mit den transkriptionellen Veränderungen der Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C und IT4-EC40 bei 40°C verglichen (Vergleich 4 und 5, Tabelle 13). Ebenso wurde untersucht, wie der Hitzeschock die Transkription der Gehirnendothelzellen verändert (Vergleich 7).

Tab. 13: Überblick über die Vergleiche der Transkriptom-Daten. Alle Transkriptome beziehen sich ausschließlich auf die Gehirnendothelzellen (HBEC-5i), welche mit unterschiedlich Stimuli ko-inkubiert wurden. BM= Bindungsmedium; n-IE= nicht-infizierte Erythrozyten; 40°C= erhöhte Temperatur; IT4-EC37/40= Ko-Inkubation mit der entsprechenden Parasitenpopulation.

Transkriptom A	Transkriptom B	Vergleich Nr.
HBEC-5i + BM	HBEC-5i + BM + IT4-EC37	①
HBEC-5i + BM + n-IE	HBEC-5i + BM + IT4-EC37	④
HBEC-5i + BM + 40°C	HBEC-5i + BM + 40°C + IT4-EC40	②
HBEC-5i + BM + n-IE	HBEC-5i + BM + 40°C + IT4-EC40	⑤
HBEC-5i	HBEC-5i + 40°C	⑦

In der anschließenden Analyse wurden die veränderten Genexpressionen der Endothelzellen infolge der unterschiedlichen Stimuli untersucht und miteinander verglichen. Aus Gründen der Übersicht wurden die Vergleiche wie in Tabelle 13 angegeben nummeriert.

Bei der Gegenüberstellung der Anzahl an Genen, dessen Expression sich verändert hat, fällt auf, dass die Endothelzellen unterschiedlich auf die verschiedenen Stimuli reagieren. In Folge eines 7 stündigen Hitzeschocks bei 40°C wurden insgesamt 620 Gene von den Endothelzellen differentiell exprimiert (Vergleich 7, Abbildung 14A). Von diesen 620 Genen waren 190 transkriptionell hochreguliert und 430 waren herunterreguliert. Nach der Zytoadhäsion mit den IT4-EC37 Parasiten bei 37°C zeigten fast doppelt so viele Gene eine veränderte Expression. Im Vergleich zu Endothelzellen, die nur mit Bindungsmedium ko-inkubiert wurden, wurden nach der Zytoadhäsion bei 37°C 1115 Gene differentiell exprimiert (Vergleich 1, Abbildung 14B). Davon waren 531 hochreguliert und 584 runterreguliert. Beim Vergleich von Endothelzellen, die nur einem Hitzeschock ausgesetzt waren, mit Zellen, die beiden Stimuli ausgesetzt waren (Hitzeschock und Zytoadhäsion (in diesem Fall mit IT4-EC40)), wurde die Zahl der differentiell exprimierten Gene erneut nahezu verdoppelt (Vergleich 4, Abbildung 14C). Mit 1632 hochregulierten und 564 runterreguliert Genen waren insgesamt 2196 Gene differentiell exprimiert. Auffällig ist, dass nur 677 regulierte Gene in zwei und nur 39 davon in allen drei Versuchsansätzen reguliert wurden (Abbildung 14D). Bei den Gehirnendothelzellen, welche bei febriler Temperatur inkubiert wurden, wurden 72% aller regulierten Gene (444 Gene) ausschließlich bei einem Hitzeschock reguliert. Kommt zu dem Hitzeschock noch die Zytoadhäsion dazu, so wurden weitere 1577 Gene nur bei der Kombination dieser Stimuli differentiell exprimiert (entsprechen 71% der gesamten differentiell exprimierten Gene). Bei Endothelzellen, die mit den Parasiten bei 37°C ko-inkubiert wurden, wurden von den 1115 differentiell exprimierten Genen 517 Gene (entsprechen 46%) ausschließlich nach der Zytoadhäsion reguliert.

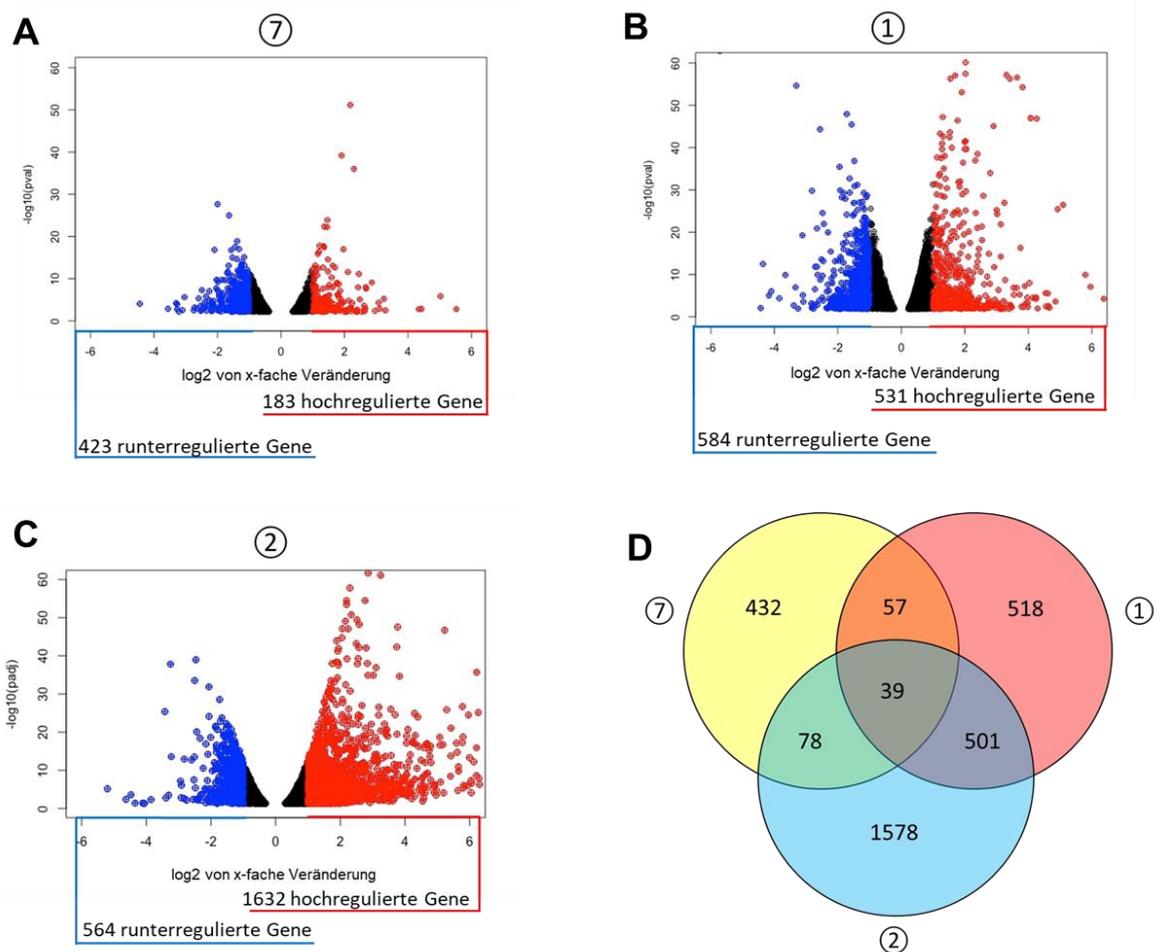


Abb. 14: Volcano-Plots und Venn Diagramm der von HBEC-5i Zellen differentiell exprimierten Gene nach Hitzeschock und/oder Ko-Inkubation mit infizierten Erythrozyten. Von HBEC-5i Zellen differentiell exprimierte Gene nach (A) Hitzeschock, (B) Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C und (C) Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C (rot= >2-fach hochreguliert; blau= >2-fach runterreguliert). Die Zahl der differentiell exprimierten Gene wird durch die Nummer in jedem Kreis angegeben. Die Nummer in den Überlappungen steht für die Zahl der differentiell exprimierten Gene, welche in den entsprechenden zwei/allen Vergleichen reguliert wurden. Es wurden sowohl hoch- als auch runterregulierte Gene mit einbezogen.

### 3.2.6 Einordnung der differentiell exprimierten Gene nach Gen Ontologien

Transkriptom-Daten können ebenfalls ausgewertet werden, indem die differentiell exprimierten Gene nach der Zugehörigkeit zu biologischen Prozessen geordnet werden. Das Internetprogramm ‚DAVID Gene Functional Classification Tool‘ ermöglicht es, die differentiell exprimierten Gene Gen Ontologien (GO-Terme) zuzuordnen, die biologische Prozesse beschreiben. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit, mit der ein GO-Term durch die Stimuli beeinflusst wird, in p-Werten angegeben. Anschließend kann die Liste an GO-Termen für biologische Prozesse mit dem Onlineprogramm ‚REVIGO‘ visualisiert werden. Das Programm ordnet GO-Terme bezüglich ihrer funktionellen Ähnlichkeit auf einem zweidimensionalen Diagramm an. Dabei werden GO-Terme, die ähnliche biologische Prozesse beschreiben, in räumlicher Nähe zueinander angeordnet. Ebenso werden GO-Terme mit funktionellen

Redundanzen übereinandergelegt. So entstehen funktionelle Gruppierungen (engl. ‚cluster‘), für die ein einzelner repräsentativer GO-Term in dem Diagramm angegeben wird (Supek et al., 2011). Da REVIGO ein englischsprachiges Programm ist und um Übersetzungsfehler zu vermeiden, wurde auf eine Übersetzung der Namen der GO-Terme verzichtet.

Bei der GO-Term Analyse wurden zuerst die transkriptionellen Veränderungen der jeweiligen Stimuli getrennt voneinander untersucht und anschließend die Kombination aus beiden Stimuli. Die genauen Versuchsbedingungen können der Tabelle 13 entnommen werden.

Infolge der Zytoadhäsion der IT4-EC37 Parasiten bei 37 °C an die Gehirndothelzellen, wurden die transkriptionellen Veränderungen 133 GO-Termen (Vergleich 4), beziehungsweise 246 GO-Termen (Vergleich 1) zugeordnet. Anschließend wurden die GO-Terme, wie in Abbildung 15A zu sehen, in einem REVIGO-Diagramm zusammengefasst. Da die GO-Terme bezüglich ihrer Ähnlichkeit positioniert wurden, waren mehrere übergeordnete Prozesse (‚cluster‘) zu erkennen (Abbildung 15, zusammengefasst in Kreisen mit den Buchstaben a, b, c, d). Die Adhäsion der infizierten Erythrozyten wurde innerhalb der Zelle über Signalwege weitergeleitet (Abbildung 15, Kreis a). Dies führte zu einer Veränderung in der Genexpression (Abbildung 15, Kreis b). Die veränderte Genexpression manifestierte sich in einer Immun- beziehungsweise einer inflammatorischen Antwort (Abbildung 15, Kreis c). Zusätzlich wurden viele Gene differentiell exprimiert, deren Proteine bei Neubildung von Blutgefäßen wichtig sind (Angiogenese) (Abbildung 15, Kreis d). Dem gegenüber standen die Gene, deren Proteine in apoptotischen Prozessen eine Funktion übernehmen. Für apoptotische Prozesse bildete sich aber kein übergeordnetes ‚cluster‘, wie bei der Angiogenese. Ebenfalls fiel auf, dass biologische Prozesse durch die Zytoadhäsion aktiviert wurden, deren Funktion in der Interaktion mit der extrazellulären Matrix lagen. Mit Ausnahme von Vergleich 4 waren die biologischen Prozesse ‚*extracellular matrix organization*‘ und ‚*extracellular matrix disassembly*‘ nach der Zytoadhäsion präsent. Ebenfalls im Zusammenhang mit der Zytoadhäsion interessant war der GO-Term ‚*cell adhesion*‘. Die durch einen Hitzeschock bei 40°C differentiell exprimierten Gene konnten 81 GO Termen zugeordnet werden (Vergleich 7). Gehirndothelzellen, welche einem Hitzeschock ausgesetzt waren, reagierten mit biologischen Prozessen, welche bereits zuvor bei der Zytoadhäsion beobachtet werden konnten. So führte der Hitzeschock zu biologischen Prozessen, die mit der Neubildung von Blutgefäßen zusammenhingen und auch Einfluss auf

den programmierten Zelltod nehmen. Zusätzlich wurden die transkriptionellen Veränderungen in den Endothelzellen zu bekannten Hitzeschock-assoziierten biologischen Prozessen, wie zum Beispiel ‚*respond to heat*‘, geordnet. Weitere biologische Prozesse, die durch Hitze induziert wurden, waren protein-stabilisierende Prozesse. So reagierten die Zellen auf eventuelle fehlgefaltete Proteine, wie an dem GO-Term ‚*protein refolding*‘ zu sehen war. Die, durch die Kombination von Zytoadhäsion und Hitzeschocks, in ihrer Expression spezifisch regulierten Gene konnten in 293 GO-Terme zusammengefasst werden (Vergleiche 2 und 5). Bei der Kombination der beiden Stimuli (Zytoadhäsion und Hitzeschock), waren diese Protein-stabilisierenden biologischen Prozesse auch der Unterschied zu den transkriptionellen Veränderungen, welche durch die Zytoadhäsion bei 37°C induziert wurden. Dementsprechend ist in Vergleich 2 und 5 auch der GO-Term ‚*protein refolding*‘ aufgeführt. Alle weiteren GO-Terme wurden auch bei der Zytoadhäsion bei 37°C identifiziert.

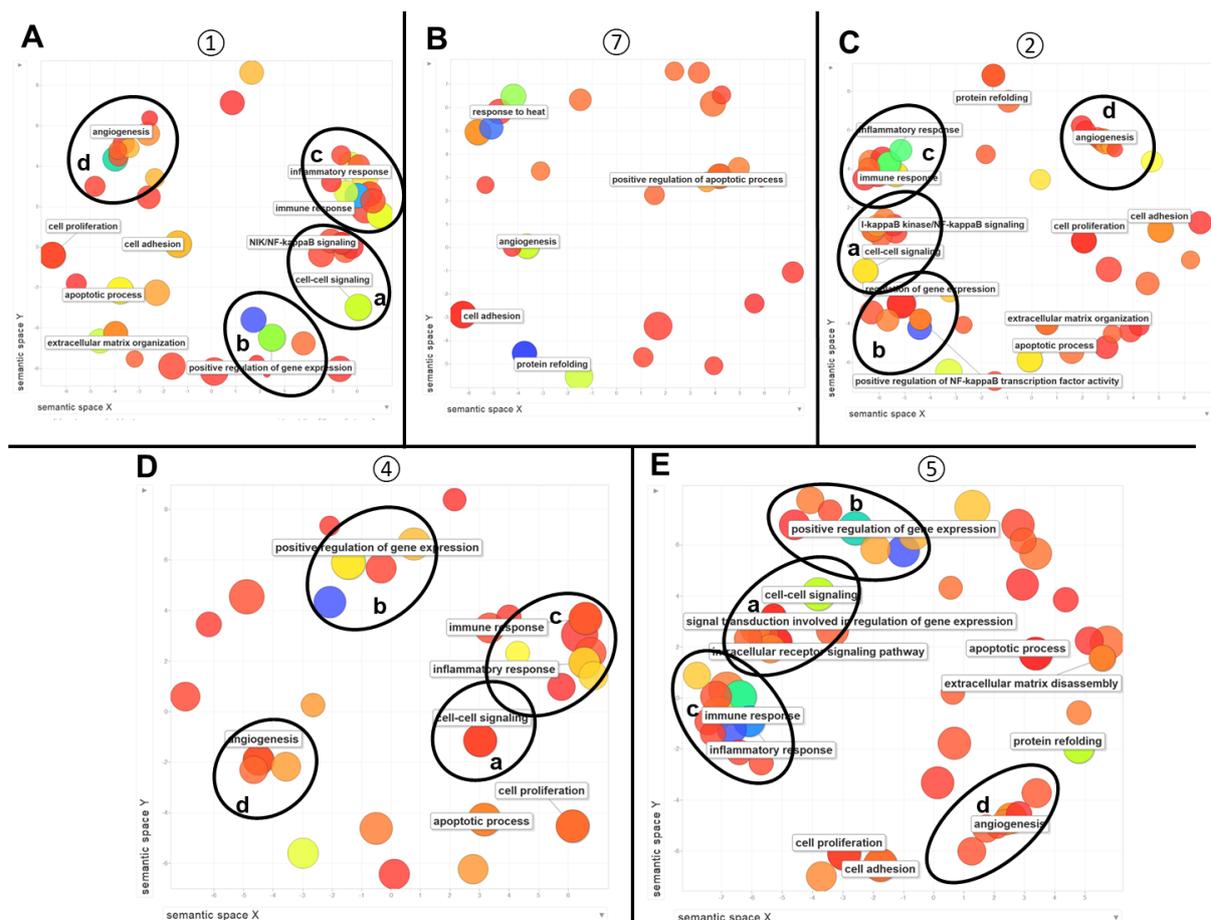


Abb. 15: REVI GO Diagramme der GO Terme (biologische Prozesse). REVI GO Diagramm nach (A) Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C (Vergleich 1), (B) Hitzeschock bei 40°C (Vergleich 7), (C) Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C (Vergleich 2), (D) Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C (Vergleich 4), (E) Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C (Vergleich 5).

### 3.2.7 Stoffwechselweg-Analyse

Der erste Überblick über die Transkriptomdaten konnte zeigen, dass der/die Stimulus/Stimuli als extrazelluläres Signal in eine zelluläre Antwort umgewandelt wurden. So werden viele Gene differentiell exprimiert, deren Funktion einer Immun- und inflammatorischen Antwort zugeordnet werden. Bevor es zu einer Immunantwort in den Gehirndothelzellen kommt, wird die Zytoadhäsion als Stimulus über verschiedene Signalwege in der Zelle verarbeitet. Die Signaltransduktion führt wiederum zu den beobachteten Unterschieden in der Genexpressionen. Mit Hilfe der *„Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)“*, einer öffentlich zugänglichen Datensammlung zu Stoffwechselwegen in der aus verschiedenen Quellen Informationen zu diversen Stoffwechselwegen zusammengetragen wurden, können individuelle Gene einem Stoffwechselweg zugeordnet werden. Diese Zuordnung der Gene hinsichtlich ihrer Funktion, beziehungsweise Vorkommen in Stoffwechselwegen wurde mit dem Internetprogramm *„DAVID Gene Functional Classification Tool“* durchgeführt. Somit konnte Informationen gesammelt werden, über welche Signal- und Stoffwechselwege die Zytoadhäsion und der Hitzeschock in den Gehirndothelzellen verarbeitet wurde. Verglichen wurden die differentiell exprimierten Gene von Gehirndothelzellen, nach der Zytoadhäsion mit IT4-EC37 bei 37°C bezogen auf Gehirndothelzellen, die nur mit Bindungsmedium (Vergleich 1, Tabelle 13)) und nicht-infizierten Erythrozyten inkubiert wurden (Vergleich 4, Tabelle 13). Ebenso wurden die differentiell exprimierten Gene von den Gehirndothelzellen, die bei 40°C mit IT4-EC40 ko-inkubiert wurde, mit Gehirndothelzellen, die mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C (Vergleich 5, Tabelle 13) oder mit Bindungsmedium bei 40°C (Vergleich 2, Tabelle 13) inkubiert wurden, verglichen. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass für die funktionale Analyse die hochregulierten und runterregulierten Gene getrennt voneinander analysiert wurden. Im ersten Schritt wurde überprüft in welchen Stoffwechselwegen die von den differentiell exprimierten Genen kodierten Proteine vermehrt vorkommen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass ein Protein in mehreren Signalwegen vorkommen kann. In Tabelle 14 sind alle Stoffwechselwege aufgeführt, bei denen die differentiell exprimierten Gene bei mindestens einem der vier Vergleiche signifikant (p-Wert <0,05) angereichert waren. Um Übersetzungsfehler zu vermeiden, wurden die englischen Namen der Stoffwechselwege beibehalten. Betrachtet man zuerst die p-Werte, so fällt auf, dass der *„TNF signaling pathway“*, der *„NF-kappa B signaling pathway“* und der *„MAPK signaling pathway“* bei allen 4

Vergleichen p-Werte haben, die deutlich unter dem Schwellenwert von 0,05 lagen. Weitere Stoffwechselwege, die bei der Signaltransduktion der extrazellulären Stimuli von Bedeutung sein konnten, waren: der *„Toll-like receptor signaling pathway“*, der *„NOD-like receptor signaling pathway“* und der *„TGF-beta signaling pathway“*. Der *„Cell adhesion molecule (CAMs)“* und der *„Leukocyte transendothelial migration“* KEGG Stoffwechselweg wurde ausschließlich bei der Zytoadhäsion bei 40°C signifikant angesprochen. In der folgenden Analyse wurden diese Stoffwechselwege detailliert untersucht, da die Zytoadhäsion über Adhäsionsmoleküle auf der Endothelzelloberfläche vermittelt wird und die Leukozytenmigration durch das Endothel ein wichtiger Mechanismus der Immunantwort ist. Für die anschließende Analyse wurden Stoffwechselwege nicht beachtet, wenn die differentiell exprimierten Gene innerhalb einer Stoffwechselweges nur bei einem der 4 Vergleiche signifikant angereicht waren. Ebenso wurden Stoffwechselwege, die mit anderen Krankheitsbildern assoziiert sind, nicht weiter berücksichtigt. Ebenso wurde der *„Malaria“* Stoffwechselweg nicht weiter untersucht, da es sich hierbei um keinen klassischen Stoffwechselweg handelt. Bei der Stoffwechselweg-Analyse der Listen aller runterregulierten Gene konnte kein einzelner Stoffwechselweg, der bei mehr als einem Vergleich signifikant angereicht war, gefunden werden (Tabelle 15). Aus diesem Grund wurden die Stoffwechselwege mit den runterregulierten Genen nicht weiter untersucht.

Tab. 14: KEGG Signal- und Stoffwechselweg Analyse der hochregulierten Gene. Dargestellt sind alle Signal- und Stoffwechselwege, in denen die differentiell exprimierten Gene in einem oder mehreren Vergleichen signifikant angereichert waren (Nummerierung nach Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C.) signifikant angereichert waren. Fett gedruckt sind die Signal- und Stoffwechselwege, auf die im Verlauf dieser Arbeit eingegangen wird.

KEGG pathways	①	②	④	⑤	KEGG pathways	①	②	④	⑤
African trypanosomiasis	5.4E-4	0.003	1.1E-4	0.01	Jak-STAT signaling pathway	0.042	ns	ns	ns
Alcoholism	1.2E-5	0.004	2.6E-7	ns	Legionellosis	8.9E-8	2.8E-7	1.2E-5	1.2E-6
Aldosterone synthesis and secretion	ns	ns	ns	0.039	Leishmaniasis	0.001	6.9E-5	ns	6.9E-4
Allograft rejection	ns	3.4E-4	ns	ns	Leukocyte transendothelial migration	ns	0.004	ns	0.007
Amoebiasis	ns	0.003	ns	0.0276	Malaria	1.4E-4	0.003	7.4E-5	0.01
Antigen processing and presentation	0.034	0.002	ns	0.004	<b>MAPK signaling pathway</b>	<b>5.8E-6</b>	<b>3.5E-6</b>	<b>0.001</b>	<b>2.2E-6</b>
Autoimmune thyroid disease	ns	0.016	ns	ns	Measles	0.003	0.047	7.3E-4	0.01
B cell receptor signaling pathway	ns	0.036	ns	ns	<b>NF-kappa B signaling pathway</b>	<b>1.8E-5</b>	<b>1.6E-6</b>	<b>0.009</b>	<b>6.4E-5</b>
Bladder cancer	2.7E-4	ns	ns	0.031	<b>NOD-like receptor signaling pathway</b>	<b>3.2E-4</b>	<b>0.057</b>	<b>0.001</b>	<b>0.007</b>
Calcium signaling pathway	ns	ns	ns	0.015	Osteoclast differentiation	2.6E-4	3.6E-4	0.044	ns
<b>Cell adhesion molecules (CAMs)</b>	<b>ns</b>	<b>4.6E-9</b>	<b>ns</b>	<b>1.7E-5</b>	Oxytocin signaling pathway	ns	ns	ns	0.003
cGMP-PKG signaling pathway	ns	0.015	ns	0.042	p53 signaling pathway	0.020	ns	0.003	ns
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.050	ns	0.018	0.023	Pathways in cancer	0.001	0.001	ns	0.001
Chemokine signaling pathway	0.002	ns	ns	0.012	Pertussis	5.9E-4	0.004	0.024	0.001
Cholinergic synapse	ns	ns	ns	0.019	Phagosome	ns	0.024	ns	ns
Circadian entrainment	ns	ns	ns	0.025	PI3K-Akt signaling pathway	ns	ns	ns	0.041
Circadian rhythm	0.016	ns	ns	ns	Prion diseases	0.020	0.037	ns	5.4E-4
Complement and coagulation cascades	ns	ns	ns	0.005	Protein processing in endoplasmic reticulum	ns	ns	0.038	0.007
<b>Cytokine-cytokine receptor interaction</b>	<b>0.001</b>	<b>0.005</b>	<b>0.053</b>	<b>4.1E-5</b>	Rheumatoid arthritis	6.1E-7	4.7E-7	0.009	3.4E-7
Dilated cardiomyopathy	ns	ns	ns	0.049	Salmonella infection	2.8E-4	0.004	0.001	0.008
Dorso-ventral axis formation	ns	0.051	ns	ns	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.005	0.010	0.017	0.033
Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	ns	ns	0.016	ns	Small cell lung cancer	0.005	ns	ns	ns
Epstein-Barr virus infection	ns	0.033	ns	ns	Staphylococcus aureus infection	ns	0.007	ns	3.1E-5
ErbB signaling pathway	ns	0.033	ns	ns	Synaptic vesicle cycle	ns	0.050	ns	ns
Estrogen signaling pathway	ns	ns	ns	3.6E-4	Systemic lupus erythematosus	2.1E-5	2.4E-5	3.8E-6	1.4E-4
FoxO signaling pathway	3.3E-4	0.003	0.003	0.043	<b>TGF-beta signaling pathway</b>	<b>0.005</b>	<b>0.001</b>	<b>2.2E-4</b>	<b>4.4E-4</b>
Glutamatergic synapse	ns	ns	ns	0.046	Tight junction	ns	ns	ns	0.051
Graft-versus-host disease	0.020	2.0E-5	ns	0.010	<b>TNF signaling pathway</b>	<b>9.1E-11</b>	<b>1.3E-5</b>	<b>3.6E-7</b>	<b>4.4E-8</b>
Hematopoietic cell lineage	ns	0.005	ns	0.004	<b>Toll-like receptor signaling pathway</b>	<b>5.3E-4</b>	<b>0.015</b>	<b>0.020</b>	<b>0.012</b>
Hepatitis B	0.042	ns	ns	ns	Toxoplasmosis	0.013	0.018	0.030	0.003
Herpes simplex infection	0.014	0.006	ns	0.010	Transcriptional misregulation in cancer	8.5E-5	2.5E-5	7.9E-4	3.0E-4
HTLV-I infection	ns	2.5E-4	ns	0.005	Tuberculosis	ns	0.016	ns	0.043
Inflammatory bowel disease (IBD)	9.1E-4	9.5E-4	ns	7.9E-4	Type 1 diabetes mellitus	0.010	1.5E-6	ns	1.9E-4
Influenza A	0.009	0.013	0.014	3.5E-5	Viral carcinogenesis	2.8E-4	0.004	2.0E-4	ns
Insulin resistance	ns	0.036	ns	ns	Viral myocarditis	ns	2.9E-4	ns	0.025
Intestinal immune network for IgA production	ns	0.025	ns	0.002					

Tab. 15: KEGG Signal- und Stoffwechselweg Analyse der runterregulierten Gene. Dargestellt sind alle Signal- und Stoffwechselwege, in denen die differentiell exprimierten Gene in einem oder mehreren Vergleichen signifikant angereichert waren (Nummerierung siehe Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C.) angereichert waren.

KEGG pathways	①	②	④	⑤
beta-Alanine metabolism	ns	ns	ns	ns
Chemical carcinogenesis	ns	ns	0.04	ns
Fanconi anemia pathway	ns	0.003	ns	ns
Herpes simplex infection	ns	0.05	ns	ns
Mineral absorption	ns	0.001	ns	ns
Pathways in cancer	0.04	ns	ns	ns
Proteoglycans in cancer	ns	ns	ns	0.04
Pyrimidine metabolism	ns	0.04	ns	ns
Pyruvate metabolism	ns	0.04	ns	ns
RNA polymerase	ns	0.02	ns	ns
RNA transport	ns	0.01	ns	ns
Toll-like receptor signaling pathway	ns	0.04	ns	ns
Tryptophan metabolism	ns	ns	ns	0.04
Wnt signaling pathway	0.05	ns	ns	ns

Tripathi *et al.* konnte bereits zeigen, dass in Folge der Zytoadhäsion in Gehirndothelzellen der NF-κB Signalweg angesprochen werden (Tripathi *et al.*, 2009). NF-κB sind Transkriptionsfaktoren aus einer 5 Mitglieder starken Proteinfamilie. In Tabelle 16 ist zu

sehen, dass in den Vergleichen 1, 3 und 5, 4 der 5 Mitglieder signifikant hochreguliert waren. Nur bei dem Gen *rela* wurde die Expression runterreguliert, beziehungsweise nicht signifikant verändert. Bei Vergleich 4 wurden nur die Expression der drei Mitglieder *nfkb1*, *relb* und *rel* hochreguliert und *rela* wie bei den anderen Vergleichen runterreguliert. Die relative Transkriptzahl in der letzten Spalte gibt die kleinste hochregulierte Transkriptzahl in einem signifikant veränderten Vergleich an. Diese Angabe ist wichtig, da transkriptionelle Veränderungen bei niedrigen relativen Transkriptzahlen deutlich höher ausfallen als bei hohen Zahlen. So ist die transkriptionelle Veränderung von 90 Sequenzfragmenten von 10 auf 100 mit dem Faktor 10 deutlich höher als die Veränderung von 100 auf 190 mit dem Faktor 1,9. Dies könnte zu einer Fehlinterpretation der Daten führen.

Tab. 16: Differentielle Expression der Mitglieder der Proteinfamilie der NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Die angegebenen Zahlen entsprechen der x-fachen transkriptionelle Veränderung. ns= nicht signifikante transkriptionelle Veränderung

	①	②	④	⑤	rel. Trans.zahl
NFKB1	2,1	2,2	1,6	2,6	>1100
NFKB2	2,4	3,0	ns	2,0	>840
RELA	0,8	ns	0,8	0,7	>1300
RELB	3,6	6,0	1,5	2,9	>260
REL	1,7	2,5	2,3	4,1	>170

Für den ‚NF-kappaB signaling pathway‘ wurden in der Tabelle 17 alle Gene gegenübergestellt, die bei mindestens einem Vergleich signifikant (p-Wert <0,05) um den Faktor 2 hochreguliert wurde. Auch hier wurden 3 der 5 NF- $\kappa$ B Untereinheiten aufgeführt. Die Aktivität von NF- $\kappa$ B wird über inhibitorische Proteine, sogenannte ‚inhibitory  $\kappa$ B‘ (IkB) Proteine, reguliert. Mit *nfkbia* ist ein solches Gen, welches für ein inhibitorisches Protein kodiert, bei allen Vergleichen um den Faktor 2,3 bis 4,4 hochreguliert. Darüber hinaus fielen in dieser Gegenüberstellung die Gene *birc3*, *cxcl8*, *ptgs2* und *tnfaip3* auf. Sie waren in jedem Vergleich signifikant, um mindestens den Faktor 3,2 bis 50,2 hochreguliert und die relative Transkriptzahlen waren mit >600, >4100, >340, >2400 hoch. Neben *birc3* waren noch weitere Gene, die für Inhibitoren der Apoptose kodieren, hochreguliert. So war *birc2* in allen 4 Vergleichen zumindest um den Faktor 2 hochreguliert, ebenso wie *bcl2*. Bei *bcl2* war die Transkription allerdings nur bei Gehirndothelzellen verändert, bei denen die Zytoadhäsion bei 40°C stattfand. Ebenfalls waren die Gene für die Aktivatoren des NF- $\kappa$ B Signalweges *bcl10* (Faktor 2,2 und 2,3), *il1b* (Faktor 9,1 und 2,2) und *Ita* (Faktor 25,9 und 4,7)

ausschließlich bei 40°C signifikant hochreguliert. Die beiden Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sind bekannte Bindungspartner für infizierte Erythrozyten (Berendt et al., 1989; Ockenhouse et al., 1992). Auch hier fällt auf, dass die Veränderung der Expression von *icam1* und *vcam1* in den Endothelzellen, die mit den infizierten Erythrozyten bei 40°C ko-inkubiert wurden, deutlich höher ausfielen. Mit Veränderungen der Transkription von 2,3 bis 6,8 war *vcam1* in allen Vergleichen signifikant hochreguliert, während *icam1* nur bei 40°C ko-inkubierten Gehirndothelzellen um den Faktor 3 hochreguliert wurde. Eine Interpretation der Daten, erfolgt bei dieser Arbeit in der Diskussion. Es ist ebenfalls anzumerken, dass Gene, die in mehreren Stoffwechselwegen differentiell exprimiert wurden, nicht jedes Mal erneut aufgezählt wurden.

Tab. 17: Liste der differentiell exprimierten Gene im ‚NF-κB signaling pathway‘. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Fett gedruckte Zahlen weisen auf eine signifikante x-fache transkriptionelle Veränderung hin, wohingegen kursiv gedruckte Zahlen auf nicht-signifikante x-fache Veränderungen hinweisen.

Gen-Name	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤	rel. Trans.zahl
B-cell CLL/lymphoma 10	BCL10	1,2	2,2	1,3	2,3	>850
B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	1,3	1,4	1,2	2,1	>210
BCL2-related protein A1	BCL2A1	18,9	10,8	1,4	6,7	>25
baculoviral IAP repeat containing 2	BIRC2	2,2	1,8	1,7	1,7	>2700
baculoviral IAP repeat containing 3	BIRC3	9,4	18,7	3,3	14,7	>600
Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	BTK	-6,3	6,8	-3,3	3,1	>7
caspase recruitment domain family, member 11	CARD11	3,5	3,7	-1,4	1,9	>4
chemokine (C-C motif) ligand 4	CCl4	1,0	3,8	1,0	4,6	>3
CD14 molecule	CD14	2,0	2,1	1,1	1,7	>60
CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	CD40	1,7	3,6	1,0	3,3	>35
interleukin 8	CXCL8	34,2	50,2	4,5	24,0	>4100
intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	1,4	3,3	1,1	3,1	>1100
interleukin 1, beta	IL1B	7,5	9,1	-1,2	2,2	>2600
lymphotoxin alpha	LTA	3,1	25,9	-3,2	4,7	>25
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	2,1	2,2	1,6	2,6	>1100
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	NFKB2	2,4	3,0	1,2	2,0	>840
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	4,4	3,8	2,3	2,8	>1200
phospholipase C, gamma 2	PLCG2	3,2	3,2	3,3	7,8	>150
prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	14,1	12,0	3,2	10,9	>340
v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	RELB	3,6	6,0	1,5	2,9	>260
toll-like receptor adaptor molecule 2	TICAM2	1,6	2,1	1,0	1,1	>320
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	7,0	12,6	4,5	10,5	>2400
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	TNFSF13B	2,4	1,6	3,4	3,3	>30
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	TNFSF14	-1,2	3,8	-1,9	3,7	>25
TNF receptor-associated factor 1	TRAF1	2,4	2,5	1,1	2,2	>60
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	2,3	3,1	3,2	6,8	>90

In der Studie von Tripathi *et al.* wurde der ‚NF-kappaB signaling pathway‘ als Signalweg identifiziert, der bei der Aktivierung der Gehirndothelzellen eine zentrale Rolle einnimmt (Tripathi et al., 2009). Daher sollten die Transkriptomdaten hinsichtlich der veränderten Expression der Gene, die von NF-κB reguliert werden, untersucht werden. In Tabelle 18 wurden nach Kategorie alle NF-κB Zielgene (engl. *target genes*) geordnet, welche signifikant ( $p$ -Wert<0,05) um mindestens den Faktor 2 hochreguliert wurden. Die Gene wurden einer Liste der Universität Boston (<https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>)

entnommen. Von den 433 dort aufgeführten Genen wurden 148 in mindestens einem der Vergleiche signifikant reguliert. Im Besonderen die Kategorien ‚Cytokines/Chemokines and their modulators‘ und ‚Enzymes‘ mit je 25 differentiell exprimierten Genen, sowie ‚Transcription factors and their modulator‘ mit 23 differentiell regulierten Genen, wiesen auf eine Aktivierung einer Immunantwort in den Gehirndendothelzellen hin. Wie in Tabelle 1 und 17 gezeigt werden konnte, zeigte sich auch hier, dass die transkriptionellen Veränderungen bei Endothelzellen, die bei 40°C mit den Parasiten ko-inkubiert wurden, deutlich höher ausfielen. So wurden 63 Gene ausschließlich nach Ko-Inkubation bei 40°C

Tab. 18: Liste aller differentiell exprimierten Gene, welche durch die Transkriptionsfaktoren NF-κB induziert werden. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Die Zahlen zeigen die x-fach veränderte Transkription, ein X entspricht einer nicht signifikanten Veränderung.

Kategorie/GenName	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤	Kategorie/GenName	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤
<b>Cell adhesion molecules</b>						<b>Immunoreceptors</b>					
intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	X	3,3	X	3,1	bradykinin receptor B1	BDKRB1	X	8,9	X	9,5
tenascin C	TNC	X	2,4	X	X	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	CD40	X	3,6	X	3,3
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	2,3	3,1	3,2	6,8	CD83 molecule	CD83	X	3,9	X	3,2
<b>Cell-surface receptors</b>						<b>Chemokine (C-C motif) receptor 7</b>					
adenosine A1 receptor	ADORA1	X	-2,1	X	X	CCR7	CCR7	3,1	X	X	-2,7
adenosine A2a receptor	ADORA2	X	3,4	X	X	major histocompatibility complex, class I, B					
adrenoreceptor alpha 2B	ADRA2B	X	6,6	X	X	HLA-B	HLA-B	X	2,3	X	X
ATP binding cassette subfamily A member 1	ABCA1	X	X	X	X	solute carrier family 3, member 2					
ATP-binding cassette, sub-family A, member 1	ABCI1	X	X	X	3,4	TLR9	TLR9	X	4,1	X	2,4
bradykinin receptor B1	BDKRB1	X	8,9	X	9,5	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9					
glutamate receptor, metabotropic 2	GRM2	X	2,7	X	2,2	TNFRSF9	TNFRSF9	X	4,1	X	3,9
platelet-activating factor receptor	PTAFR	X	X	X	2,2						
<b>Cytokines/Chemokines and their modulators</b>						<b>Miscellaneous</b>					
c-c motif chemokine ligand 2	CCL2	-2,1	X	X	X	Apolipoprotein E	APOE	2,3	4,2	X	X
chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	18,8	31,1	16,8	25,2	BRCA2, DNA Repair Associated	BRCA2	-2,2	X	X	X
chemokine (C-C motif) ligand 3	CCL3	16,6	78,8	21,1	135,7	Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1					
chemokine (C-C motif) ligand 4	CCL4	X	3,8	X	4,6	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	2,9	3,9	2,0	3,3
chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	X	X	X	2,1	guanylate binding protein 1	GBP1	4,2	X	2,2	X
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	CXCL1	2,2	4,7	X	4,0	interferon-induced protein 44-like	IFI44L	8,8	X	X	2,5
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	13,7	X	X	4,7	factotransferin	ITF	X	5,4	X	X
chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11	8,8	X	X	3,3	myelin basic protein	MBP	-2,8	X	-2,4	-4,4
chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	10,7	8,0	2,2	6,6	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta					
chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	19,2	13,8	2,8	12,1	PPARGC1B	PPARGC1B	X	X	-2,2	X
chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	4,1	3,5	X	5,0	PPARGC1B beta					
chemokine (C-X-C motif) ligand 6	CXCL6	9,6	5,3	X	7,1	recombination activating gene 1	RAG1	X	2,7	X	2,8
Epstein-Barr virus induced 3	EBI3	X	3,0	X	2,5	ST00 calcium binding protein A4	ST00A4	X	5,6	X	X
interferon, beta 1, fibroblast	IFNB1	X	18,8	X	X	serpin peptidase inhibitor, clade A member 1	SERPINA1	X	3,1	X	4,0
interleukin 1, receptor antagonist	IL1RN	4,8	19,4	X	X	solute carrier family 6, member 6	SLC6A6	X	2,5	X	X
interleukin 1, alpha	IL1A	30,3	13,1	2,9	8,1	Tissue Factor Pathway Inhibitor 2	TFPI2	3,9	X	X	X
interleukin 1, beta	IL1B	7,5	9,1	X	2,2	TNFAIP3 interacting protein 1	TNIP1	X	2,3	X	X
interleukin 11	IL11	2,6	2,8	X	X	<b>Proteins involved in antigen presentation</b>					
interleukin 12A	IL12A	3,3	3,0	3,5	5,4	complement component 3	C3	X	9,4	X	16,0
interleukin 6	IL6	24,2	23,9	5,4	14,7	Proteasome subunit beta 2	PSMB9	2,3	X	X	X
interleukin 8	CXCL8	34,2	50,2	4,5	24,0	<b>Regulators of apoptosis</b>					
lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	LTA	X	25,9	X	4,7	B-cell CLL/Lymphoma 2	BCL2	X	X	X	2,1
TNF superfamily member 15	TNFSF15	-3,9	X	X	X	BCL2-like 11	BCL2L11	X	2,6	X	X
trefol factor 3	TF3	X	X	X	162,5	BCL2-related protein 1	BCL2L1	18,9	10,8	X	6,7
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	TNFSF13B	X	X	X	3,3	CD274 molecule	CD274	6,9	7,2	4,0	7,5
<b>Early response genes</b>						TNF receptor-associated factor 1					
immediate early response 3	IER3	3,4	2,2	X	X	TRAF1	TRAF1	2,4	2,5	X	2,2
Kruppel-like factor 10	KLF10	4,2	4,1	2,3	3,7	TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain	TIFA	X	2,2	X	X
<b>Enzymes</b>						<b>Stress response genes</b>					
Activation induced Cytidine Deaminase	AICDA	-3,6	X	X	X	Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	CYP2E1	24,9	X	X	X
Aldo-keto reductase family 1, member C1	AHK1C1	X	2,4	X	X	Heat shock protein 90Da alpha, class A member 1	HSP90AA1	X	X	X	4,5
alpha-methylacyl-CoA racemase	AMACR	X	X	X	-2,0	phospholipase A2 group IVA	PLA2G4A	4,4	X	X	X
Argininosuccinate Synthase 1	ASS1	-2,1	X	X	X	phospholipase A2 group IVC	PLA2G4C	X	5,5	X	3,4
Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	BTK	X	6,8	X	X	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	14,1	12,0	3,2	10,9
cyclin-dependent kinase 6	CDK6	X	X	X	2,3	superoxide dismutase 2	SOD2	2,4	3,0	X	2,7
deoxyribonuclease II-like 2	DNASE1L2	X	X	X	2,3	<b>Transcription factors and their modulators</b>					
dihydropyrimidine dehydrogenase	DHDPD	2,4	X	2,1	X	androgen receptor	AR	-2,9	X	X	X
dual specificity phosphatase 1	DUSP1	3,6	10,5	2,5	4,4	B Cell CLL/Lymphoma 3	BCL3	3,4	2,6	X	X
guanylate cyclase 1 soluble Subunit alpha 2	GUCY1A2	-4,2	X	X	X	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD	3,1	4,5	2,8	4,1
heme oxygenase (hemoxylin) 1	HMOX1	2,4	X	X	4,6	E74-like factor 3	ELF3	X	73,8	X	10,8
hyaluronan synthase 1	HAS1	19,6	6,8	X	6,4	FBI murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	3,2	11,0	X	7,8
iodothyronine Deiodinase 2	DIOD2	-4,8	X	X	X	Human proto-oncogene myc mRNA, 5' end, clone DMyc.	MYC	X	2,8	X	2,3
lipase, endothelial	LIPG		4,1	X	7,1	interferon regulatory factor 4	IRF4	X	12,2	X	4,4
matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	119,6	4,8	X	4,1	Jun B proto-oncogene	JUNB	8,0	3,5	3,3	2,2
matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	MMP3	7,6	3,2	X	8,4	NLR family, pyrin domain containing 2	NLRP2	X	-4,2	X	-2,3
matrix metalloproteinase 9	MMP9	83,2	X	X	3,2	nuclear factor kappa B subunit 2	NFKB2	2,4	3,0	X	X
NUAK family, SNF1-like kinase, 2	NUAK2	X	2,7	X	X	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	2,1	2,2	X	2,6
parathyroid hormone-like hormone	PTHLH	5,1	3,9	X	5,6	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	4,4	3,8	2,3	2,8
phospholipase C, delta 1	PLCD1	X	2,4	X	X	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	NFKBIE	X	3,1	X	2,2
pim-1 oncogene	PIM1	2,9	6,8	3,4	2,6	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	NFKBIZ	3,5	3,5	2,7	4,3
platelet-activating factor acetylhydrolase 2	PAFAH2	X	2,6	X	X	nuclear receptor subfamily 3 group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	NR3C1	X	X	X	2,1
serpinidase/serpinin N1-acetyltransferase 1	SATI	2,4	2,0	2,0	2,1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NRA2	47,7	134,9	27,6	36,6
uridine phosphorylase 1	UPP1	X	X	X	2,1	snail family zinc finger 1	SNAI1	4,3	2,5	3,1	2,8
xanthine dehydrogenase	XDH	X	2,0	X	X	SRV (sex determining region Y)-box 9	SOX9	X	4,5	X	3,4
<b>Growth factors, ligands, and their modulators</b>						transcription factor EC					
bone morphogenetic protein 2	BMP2	X	18,1	X	11,6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	7,0	12,6	4,5	10,5
bone morphogenetic protein 4	BMP4	X	X	X	3,1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	7,0	12,6	4,5	10,5
brain-derived neurotrophic factor	BDNF	X	2,5	X	2,1	basic helix-loop-helix transcription factor 1	TWIST1	X	2,4	2,2	2,0
colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	CSF2	X	30,2	X	26,6	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	REL	X	2,5	2,3	4,1
colony stimulating factor 3 (granulocyte)	CSF3	X	12,3	X	X	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	RELB	3,6	6,0	X	2,9
inhibin, beta A	INHBA	3,9	3,7	X	2,2						
insulin-like growth factor binding protein 1	IGFBP1	-2,2	X	X	-6,7						
insulin-like growth factor binding protein 2	IGFBP2	X	X	X	-2,1						
interleukin 32	IL32	X	2,8	X	2,3						
IT1 ligand	IT1LG	X	2,1	X	2,1						
midkine (neurite growth-promoting factor 2)	MDK	X	2,1	X	X						
proenkephalin	PENK	X	4,9	X	3,0						
secreted phosphoprotein 1	SPP1	2,8	2,2	X	2,0						
Thrombospondin 1	THBS1	2,1	X	X	X						
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	TNFSF13B	X	X	X	3,3						
vascular endothelial growth factor C	VEGFC	2,1	2,6	X	2,4						

differenziell exprimiert.

Der ‚*NF-kappaB signaling pathway*‘ ist eng mit dem ‚*TNF signaling pathway*‘ verknüpft, welcher bei 3 der 4 Vergleiche der Stoffwechselwege mit den niedrigsten p-Wert war. Bei der Untersuchung der regulierten Gene fiel auf, dass weniger Gene reguliert wurden, deren Genprodukte eine Funktion in der Signaltransduktion im ‚*TNF signaling pathway*‘ einnehmen (Tabelle 19). Es wurden hauptsächlich Gene differenziell exprimiert, von denen bekannt ist, dass ihre Expression über den ‚*TNF signaling pathway*‘ induziert werden kann. So wurden Gene, die für inflammatorische Zytokine kodieren, wie *il1b* (um den Faktor 2,2 bis 9,1), *il6* (um den Faktor 5,4 bis 24,2), *lif* (um den Faktor 1,8 bis 5,1) in allen Vergleichen hochreguliert. *Ita* wurde dabei nur nach Ko-Inkubation bei 40°C um den Faktor 4,7 bis 25,9 hochreguliert. Aber auch Gene, die für Chemokine, wie *cxcl1*, *cxcl2*, *cxcl3*, *ccl20* und *ccl5* (nur bei Ko-Inkubation bei 40°C) kodieren zeigten eine verstärkte Expression. Wobei *cxcl1* bei Vergleich 4 nicht signifikant verändert exprimiert wurde. *Cxcl3* wurde mit einem Faktor von bis zu 19,2 am Stärksten verändert exprimiert. Die hohe faktorielle Veränderung bei *ccl20* waren auf die niedrigen relativen Transkriptzahlen von >15 zurückzuführen. Es wurden auch regulatorische Gene vermehrt exprimiert. Unabhängig von der Temperatur wurden die Proto-Oncogene und Transkriptionsfaktoren *bcl3*, *fos* (beide ausgenommen Vergleich 3) und *junb* hochreguliert.

Tab 19: Liste der differentiell exprimierten Gene im ‚TNF signaling pathway‘. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Fett gedruckt Zahlen weisen auf eine signifikante x-fache transkriptionelle Veränderung hin, wohingegen kursiv gedruckte Zahlen auf nicht-signifikante x-fache Veränderungen hinweisen.

Gen-Name	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤	rel. Trans.zahl
B-cell CLL/lymphoma 3	BCL3	3,4	2,6	1,6	1,7	>340
baculoviral IAP repeat containing 2	BIRC2	2,2	1,8	1,7	1,7	>2700
baculoviral IAP repeat containing 3	BIRC3	9,4	18,7	3,3	14,7	>600
chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	18,8	31,1	16,8	25,2	>15
chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	2,9	1,8	2,2	2,1	>890
cAMP responsive element binding protein 5	CREB5	1,8	3,3	2,3	3,0	>570
colony stimulating factor 2	CSF2	4,5	30,2	0,5	26,6	>85
chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	CX3CL1	1,5	2,2	2,1	7,2	>9
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	2,2	4,7	-1,4	4,0	>450
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	13,7	1,7	3,8	4,7	>20
chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	10,7	8,0	2,2	6,6	>280
chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	19,2	13,8	2,8	12,1	>160
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	3,2	11,0	1,3	7,8	>180
intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	1,4	3,3	1,1	3,1	>1100
interleukin 18 receptor 1	IL18R1	3,0	1,3	1,8	3,7	>25
interleukin 1, beta	IL1B	7,5	9,1	-1,2	2,2	>2600
interleukin 6	IL6	24,2	23,9	5,4	14,7	>590
jun B proto-oncogene	JUNB	8,0	3,5	3,3	2,2	>1400
leukemia inhibitory factor	LIF	5,1	3,5	1,8	2,8	>1200
lymphotoxin alpha	LTA	3,1	25,9	-3,2	4,7	>25
mitogen-activated protein kinase 10	MAPK10	1,6	1,1	2,3	1,7	>45
matrix metalloproteinase 3	MMP3	7,6	3,2	1,0	8,4	>55
matrix metalloproteinase 9	MMP9	83,2	1,9	-1,3	3,2	>20
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	2,1	2,2	1,6	2,6	>1100
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	4,4	3,8	2,3	2,8	>1200
prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	14,1	12,0	3,2	10,9	>340
suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3	1,4	2,4	1,4	3,3	>700
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	7,0	12,6	4,5	10,5	>2400
TNF receptor-associated factor 1	TRAF1	2,4	2,5	1,1	2,2	>60
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	2,3	3,1	3,2	6,8	>90

Ein weiterer Stoffwechselweg der mit dem ‚TNF signaling pathway‘ und dem ‚NF-kappaB signaling pathway‘ eng verknüpft ist, ist der ‚MAPK signaling pathway‘ (Tabelle 20). Auch hier wurden Gene, die inflammatorisch Zytokine kodieren, reguliert. So waren *il1α* (2,9-30,3fach) und *il1β* in allen Vergleichen hochreguliert. Mit mehreren Mitgliedern der ‚dual-specific phosphatase‘ (DUSP) Proteinfamilie, wurden ebenfalls Gene exprimiert, die eine wichtige Funktion in der Regulation von Zytokinen und Chemokinen einnehmen (Huang and Tan, 2012). Wie zu erwarten war, waren Hitzeschock Proteine (engl. *heat shock proteins (HSP)*) in den Endothelzellen, die bei 40°C ko-inkubiert wurden, hochreguliert. Mit einer 25 bis 153,8-fach und 25,8 bis 123,8-fach hochregulierten Expression waren *hspa1a* und *hspa1b* sehr stark reguliert. Allerdings waren diese beiden Gene auch nach der Zytoadhäsion bei 37°C um den Faktor 3,5 und 5,1 beziehungsweise 5,2 hochreguliert. Es fällt auf, dass Gene, die für Wachstumsfaktoren kodieren in nahezu allen Vergleichen differentiell exprimiert wurden. *bdnf*, *fgf2*, *fgf5*, *myc* und *rac2* wurden mit hohen relativen Transkriptzahlen (>480) verändert exprimiert. Eine weitere Gruppe von Genen ist bekannt durch Stress-induzierten DNS-Schaden exprimiert zu werden. Mit *ddit3* (um den Faktor 4,2 bis 8,6 hochreguliert) und *gadd45a/b/g* (um den Faktor 2,0 bis 14,8 hochreguliert) wurden, unabhängig von der

Temperatur, Gene exprimiert, die eine wichtige Rolle in apoptotischen Prozessen einnehmen (Marciniak et al., 2004; Tamura et al., 2012).

Table 20: Liste der differentiell exprimierten Gene im ‚MAPK signaling pathway‘. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Fett gedruckt Zahlen weisen auf eine signifikante x-fache transkriptionelle Veränderung hin, wohingegen kursiv gedruckte Zahlen auf nicht-signifikante x-fache Veränderungen hinweisen.

Gen-Name	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤	rel. Trans.zahl
brain-derived neurotrophic factor	BDNF	1,6	2,5	1,8	2,1	>1700
calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	CACNA1A	1,9	2,1	1,8	2,8	>80
calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	CACNA1C	1,7	1,3	1,9	2,1	>160
calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	CACNA1G	4,1	11,2	1,4	8,1	>35
calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	CACNA2D2	2,9	3,8	1,6	2,5	>25
calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 4	CACNA2D4	-1,0	4,2	-2,5	11,4	>4
calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	CACNB2	-1,7	1,8	-1,5	2,8	>20
CD14 molecule	CD14	2,0	2,1	1,1	1,7	>60
DNA-damage-inducible transcript 3	DDIT3	6,8	8,6	4,2	6,6	>1100
dual specificity phosphatase 1	DUSP1	3,6	10,5	2,5	4,4	>9600
dual specificity phosphatase 10	DUSP10	2,8	6,7	1,7	5,5	>260
dual specificity phosphatase 16	DUSP16	2,1	3,3	1,9	3,5	>520
dual specificity phosphatase 2	DUSP2	5,4	4,5	2,2	2,1	>410
dual specificity phosphatase 5	DUSP5	1,1	3,4	2,0	2,1	>3600
dual specificity phosphatase 6	DUSP6	2,2	2,5	1,2	2,0	>400
dual specificity phosphatase 8	DUSP8	1,2	3,5	1,3	2,1	>220
epidermal growth factor	EGF	3,2	3,2	1,4	2,8	>25
fibroblast growth factor 12	FGF12	1,1	3,9	1,2	2,4	>25
fibroblast growth factor 18	FGF18	-1,4	3,2	-2,3	2,4	>20
fibroblast growth factor 2	FGF2	2,3	1,8	1,8	1,9	>12500
fibroblast growth factor 5	FGF5	1,1	1,8	1,1	2,0	>4700
fibroblast growth factor 7	FGF7	2,3	6,5	1,0	5,4	>25
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	3,2	11,0	1,3	7,8	>180-1200
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	2,9	5,6	2,3	4,6	>2100
growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	2,9	3,9	2,0	3,3	>1300
growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	GADD45G	14,8	4,8	3,9	2,4	>150
heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A	3,5	25,0	3,5	153,8	>6100-300000
heat shock 70kDa protein 1B	HSPA1B	5,2	26,8	5,1	123,8	>6800
heat shock 70kDa protein 1-like	HSPA1L	-1,1	8,8	-1,1	21,6	>370
heat shock 70kDa protein 6	HSPA6	19,2	200,7	10,4	2668,9	>35000
heat shock 70kDa protein 8	HSPA8	1,3	1,2	1,7	5,0	>39900
heat shock 27kDa protein 1	HSPB1	1,0	3,6	1,2	1,0	>5300
interleukin 1, alpha	IL1A	30,3	13,1	2,9	8,1	>95
interleukin 1, beta	IL1B	7,5	9,1	-1,2	2,2	>2600
interleukin 1 receptor, type II	IL1R2	3,2	30,6	2,4	5,5	>8
jun D proto-oncogene	JUND	1,3	3,7	1,3	1,2	>1100
mitogen-activated protein kinase 10	MAPK10	1,6	1,1	2,3	1,7	>45
myocyte enhancer factor 2C	MEF2C	7,7	6,7	2,2	4,8	>15
muscle RAS oncogene homolog	MRAS	1,1	1,4	1,4	2,5	>150
Human proto-oncogene myc mRNA	MYC	1,0	2,8	1,1	2,3	>6200
nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	NFATC1	1,4	2,2	-1,1	-1,2	>25
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	2,1	2,2	1,6	2,6	>1100
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	NFKB2	2,4	3,0	1,2	2,0	>840
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NR4A1	12,8	48,9	6,8	20,3	>1400
neurotrophin 3	NTF3	-2,2	77,9	0,2	4,6	>15
neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	NTRK2	-2,3	1,9	1,5	3,3	>15
phospholipase A2, group IVA	PLA2G4A	4,4	1,5	1,5	1,4	>120
phospholipase A2, group IVC	PLA2G4C	1,3	5,5	-1,1	3,4	>40
protein kinase C, gamma	PRKCG	-1,1	15,3	-1,6	1,5	>10
protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	PTPRR	4,4	4,0	1,4	1,9	>55
ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC2	1,4	1,6	1,1	2,2	>480
Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2	RASGRF2	5,4	1,6	1,4	1,3	>10
v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	RELB	3,6	6,0	1,5	2,9	>260
ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 6	RPS6KA6	-1,4	2,1	-1,8	1,3	>40

Der Transkriptionsfaktor NF-κB spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Antwort der Zelle auf die Zytoadhäsion bei 37°C und 40°C. NF-κB reguliert die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine (Baeuerle and Henkel, 1994; Hayden et al., 2006). Die indirekte Aktivierung von NF-κB durch Phosphorylierung und Degradation von IκB Proteinen

wird allerdings nicht ausschließlich durch den TNF-stimulierten Signalweg ausgelöst. So können Stimuli auch über die Toll-like Rezeptoren und über die NOD-like Rezeptoren zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren führen. So fanden sich in den Tabellen 21 und 22 viele Zytokine und Chemokine, die in den vorherigen Vergleichen schon genannt wurden. Zusätzlich zu diesen Genen fiel in Tabelle 21 auf, dass das immun-modulatorische Gen *spp1* (um den Faktor 2) hochreguliert war. Ebenso fiel die erhöhte Expression von *tlr9* bei den Vergleichen 2 und 4 auf, auch wenn die relative Transkriptzahl mit >15 niedrig war.

Tab. 21: Liste der differentiell exprimierten Gene im ‚Toll-like receptor signaling pathway‘. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Fett gedruckt Zahlen weisen auf eine signifikante x-fache transkriptionelle Veränderung hin, wohingegen kursiv gedruckte Zahlen auf nicht-signifikante x-fache Veränderungen hinweisen

Gen-Name	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤	rel. Trans.zahl
chemokine (C-C motif) ligand 3	CCL3	16,5	78,8	21,1	135,7	>15
chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	CCL3L1	18,5	16,6	25,0	20,1	>15
chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	CCL3L3	17,9	139,4	7,4	36,9	>100
chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	2,9	1,8	2,2	2,1	>890
CD14 molecule	CD14	2,0	2,1	1,1	1,7	>60
CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	CD40	1,7	3,6	1,0	3,3	>10
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	13,7	1,7	3,8	4,7	>20
chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11	8,8	1,0	4,3	3,3	>25
interleukin 8	CXCL8	34,2	50,2	4,5	24,0	>4100
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	3,2	11,0	1,3	7,8	>180
interferon, beta 1	IFNB1	3,1	18,8	2,8	4,2	>5
interleukin 12A	IL12A	3,3	3,0	3,5	5,4	>210
interleukin 1, beta	IL1B	7,5	9,1	-1,2	2,2	>2600
interleukin 6	IL6	24,2	23,9	5,4	14,7	>590
mitogen-activated protein kinase 10	MAPK10	1,6	1,1	2,3	1,7	>45
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	2,1	2,2	1,6	2,6	>1100
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	4,4	3,8	2,3	2,8	>1200
secreted phosphoprotein 1	SPP1	2,8	2,2	1,5	2,0	>80
signal transducer and activator of transcription 1	STAT1	2,6	1,3	2,2	1,4	>8300
toll-like receptor adaptor molecule 2	TICAM2	1,6	2,1	1,0	1,1	>320
toll-like receptor 9	TLR9	-2,6	4,1	-1,7	2,4	>15

In Tabelle 22 wurden die beiden Chaperone-kodierenden Gene *hsp90aa1* und *hsp90ab1* in fast allen Vergleichen mit einer hohen Transkriptzahl um den Faktor 1,2 bis 4,5 vermehrt exprimiert. NLRP3 ist ein Rezeptor, der pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennt und bei Aktivierung einen Proteinkomplex bildet, der zur Aktivierung von Zytokinen führt (Martinon and Tschopp, 2005). Das entsprechende kodierende Gen was nach der Zytoadhäsion bei 40°C um den Faktor 3,6 und 3,0 verstärkt exprimiert.

Tab. 22: Liste der differentiell exprimierten Gene im ‚NOD-like receptor signaling pathway‘. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Fett gedruckt Zahlen weisen auf eine signifikante x-fache transkriptionelle Veränderung hin, wohingegen kursiv gedruckte Zahlen auf nicht-signifikante x-fache Veränderungen hinweisen.

Gen-Name	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤	rel. Trans.zahl
baculoviral IAP repeat containing 2	BIRC2	<b>2,2</b>	<b>1,8</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	>2700
baculoviral IAP repeat containing 3	BIRC3	<b>9,4</b>	<b>18,7</b>	<b>3,3</b>	<b>14,7</b>	>600
caspace 1, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP1	<b>2,7</b>	<i>-1,8</i>	<b>1,9</b>	<i>1,2</i>	>75
chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	<b>2,9</b>	<b>1,8</b>	<i>2,2</i>	<b>2,1</b>	>890
interleukin 8	CXCL8	<b>34,2</b>	<b>50,2</b>	<b>4,5</b>	<b>24,0</b>	>4100
heat shock protein 90kDa alpha, class A member 1	HSP90AA1	<i>1,1</i>	<i>1,6</i>	<i>1,2</i>	<i>4,5</i>	>39000
heat shock protein 90kDa alpha, class B member 1	HSP90AB1	<i>1,6</i>	<i>1,9</i>	<i>1,4</i>	<i>3,2</i>	>27000
interleukin 1, beta	IL1B	<b>7,5</b>	<b>9,1</b>	<i>-1,2</i>	<b>2,2</b>	>2600
interleukin 6	IL6	<b>24,2</b>	<b>23,9</b>	<b>5,4</b>	<b>14,7</b>	>590
mitogen-activated protein kinase 10	MAPK10	<i>1,6</i>	<i>1,1</i>	<b>2,3</b>	<i>1,7</i>	>45
Mediterranean fever	MEFV	<i>1,3</i>	<b>2,4</b>	<b>1,1</b>	<i>1,7</i>	>15
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	<b>2,1</b>	<b>2,2</b>	<b>1,6</b>	<b>2,6</b>	>1100
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	<b>4,4</b>	<b>3,8</b>	<b>2,3</b>	<b>2,8</b>	>1200
NLR family, pyrin domain containing 3	NLRP3	<i>1,6</i>	<b>3,6</b>	<i>-1,3</i>	<b>3,0</b>	>20
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	<b>7,0</b>	<b>12,6</b>	<b>4,5</b>	<b>10,5</b>	>2400

Signifikant differentiell exprimierte Gene fanden sich in weiteren Signalwegen angereichert. So wies der ‚TGFbeta signaling pathway‘ ebenfalls einen niedrigen p-Wert auf. Der ‚TGFbeta signaling pathway‘ kann neben TGFβ auch durch andere Wachstumsfaktoren der ‚TGFbeta superfamily‘ aktiviert werden. Wie in Tabelle 23 zu sehen, war hauptsächlich nach der Zytoadhäsion bei 40°C die Wachstumsfaktoren-kodierenden Gene *bmp2* (um den Faktor 18,1 und 11,6), *bmp4* (um den Faktor 1,9 und 3,4) und *bmp6* (um den Faktor 4,7 und 2,5) hochreguliert. Dies führte ebenfalls zu einer erhöhten Expression der Gene ‚inhibitor of DNA binding (ID) 1-4‘, welche durch BMPs induziert werden (Hollnagel et al., 1999). Bei diesen Transkriptionsfaktoren spielte die Temperatur während der Zytoadhäsion für die Stärke der transkriptionellen Veränderung keine Rolle. Ausgenommen davon war *id4*, das mit den Faktoren 16,5 und 22,5 bei 40°C verglichen mit den Faktoren 4,1 und 4,4 bei 37°C deutlich stärker exprimiert wurde. Anzumerken ist, dass die relative Transkriptzahl von >30 niedrig war. Ebenfalls zu der ‚TGFbeta superfamily‘ gehörend, waren die Gene für Aktivin A und B (*inhba* und *inhbb*) und deren Rezeptoren *acvr1c*, *acvr2a*, *acvr2b* nach der Zytoadhäsion bei 40°C hochreguliert. Ausgenommen *inhba*, welches auch nach der Zytoadhäsion bei 37°C um den Faktor 3,9 und 1,7 hochreguliert wurde. Gene, die für Inhibitoren dieses Signalweges kodieren, wie *bambi* und *fst* waren bei beiden Temperaturen hochreguliert (beide um den Faktor 2). Mit *nog* war ein weiteres Gen, welche für einen Inhibitor des Signalweges kodiert, hochreguliert. Dieser wurde allerdings nur bei 40°C um die Faktoren 5,0 und 1,6 hochreguliert.

Tab. 23: Liste der differentiell exprimierten Gene im ‚TGF $\beta$  signaling pathway‘. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Fett gedruckt Zahlen weisen auf eine signifikante x-fache transkriptionelle Veränderung hin, wohingegen kursiv gedruckte Zahlen auf nicht-signifikante x-fache Veränderungen hinweisen.

Gen-Name	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤	rel. Trans.zahl
activin A receptor, type IC	ACVR1C	2,4	<b>6,2</b>	1,8	<b>4,7</b>	>60
activin A receptor, type IIA	ACVR2A	-1,2	<b>1,7</b>	-1,2	<b>2,1</b>	>130
activin A receptor, type IIB	ACVR2B	1,1	<b>4,5</b>	1,1	<b>2,9</b>	>340
BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog	BAMBI	<b>2,0</b>	<b>2,1</b>	<b>1,7</b>	<b>2,6</b>	>310
bone morphogenetic protein 2	BMP2	3,0	<b>18,1</b>	-2,2	<b>11,6</b>	>75
bone morphogenetic protein 4	BMP4	-1,5	<b>1,9</b>	-1,1	<b>3,1</b>	>65
bone morphogenetic protein 6	BMP6	1,0	<b>4,7</b>	1,1	<b>2,5</b>	>45
bone morphogenetic protein 8a	BMP8A	1,5	1,3	1,3	<b>2,7</b>	>35
bone morphogenetic protein receptor, type IB	BMPR1B	-1,2	<b>3,1</b>	-1,5	-1,2	>75
E2F transcription factor 5, p130-binding	E2F5	1,5	1,3	1,2	<b>2,1</b>	>80
folliculin	FST	<b>1,3</b>	<b>3,0</b>	<b>2,2</b>	<b>2,3</b>	>960
inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID1	<b>2,4</b>	-1,6	<b>1,6</b>	-1,2	>340
inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	ID2	<b>3,3</b>	<b>2,6</b>	<b>2,3</b>	<b>2,6</b>	>340
inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	ID3	<b>5,0</b>	<b>2,2</b>	<b>3,8</b>	<b>5,0</b>	>4000
inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	ID4	<b>4,1</b>	<b>16,5</b>	<b>4,4</b>	<b>22,5</b>	>30
inhibin, beta A	INHBA	<b>3,9</b>	<b>3,7</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	>1600
inhibin, beta B	INHBB	-1,3	<b>8,9</b>	-1,6	<b>2,7</b>	>140
inhibin, beta E	INHBE	<b>3,5</b>	1,4	1,7	1,3	>25
Human proto-oncogene myc mRNA, 5' end,	MYC	1,0	<b>2,8</b>	1,1	<b>2,3</b>	>6200
nodal growth differentiation factor	NODAL	<b>6,2</b>	4,3	<b>21,6</b>	6,0	>3
noggin	NOG	-1,1	<b>5,0</b>	1,2	<b>1,6</b>	>140
paired-like homeodomain 2	PITX2	-1,7	<b>5,7</b>	-2,8	<b>4,0</b>	>30
SMAD family member 6	SMAD6	<b>1,7</b>	-1,5	<b>2,2</b>	1,0	>55
SMAD family member 9	SMAD9	<b>1,7</b>	1,2	<b>2,0</b>	<b>1,7</b>	>130
TGF $\beta$ -induced factor homeobox 1	TGIF1	<b>2,2</b>	<b>2,3</b>	<b>2,1</b>	<b>1,9</b>	>1100
thrombospondin 1	THBS1	<b>2,1</b>	<b>1,8</b>	<b>1,4</b>	<b>1,5</b>	>15900

Infizierte Erythrozyten binden an Oberflächenmoleküle auf den Endothelzellen. Aus diesem Grund wurden Gene, die im KEGG Stoffwechselweg ‚Cell adhesion molecules (CAM)‘ kategorisiert sind, zusätzlich untersucht (Tabelle 24). Claudine und das ‚junctional adhesion molecule B (JAM2)‘ sind wichtige Proteine bei der Ausbildung von ‚tight junctions‘ (Brennan et al., 2010; Krause et al., 2008). Diese waren hauptsächlich nach der Zytoadhäsion bei 40°C hochreguliert. So wurde *cldn1* bei 40°C um den Faktor 8,7 beziehungsweise 6,1 hochreguliert, während die Veränderungen der Transkriptionen bei 37°C mit je 1,7 geringer ausfielen. Ebenfalls hochreguliert wurden, die bei der Immunantwort und der Antigenpräsentation, wichtigen *hla*-Gene. Allerdings waren die transkriptionellen Veränderungen um den Faktor 2 gering. Dafür waren die relativen Transkriptzahlen von *hla-a*, *-b* und *-c* mit mindestens 13.000 sehr hoch. Ein weiteres immunregulatorisches Gen ist *cd274*. Bei allen Vergleichen zeigte das Gen eine um den Faktor von mindestens 4,0 erhöhte Transkription.

Tab. 24: Liste der differentiell exprimierten Gene im ‚Cell adhesion molecules (CAMs)‘. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Fett gedruckt Zahlen weisen auf eine signifikante x-fache transkriptionelle Veränderung hin, wohingegen kursiv gedruckte Zahlen auf nicht-signifikante x-fache Veränderungen hinweisen.

Gen-Name	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤	rel. Trans.zahl
cadherin 1, type 1, E-cadherin	CDH1	-1,7	<b>24,6</b>	-1,1	<b>11,0</b>	>20
CD274 molecule	CD274	<b>6,9</b>	<b>7,2</b>	<b>4,0</b>	<b>7,5</b>	>900
CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	CD40	1,7	<b>3,6</b>	1,0	<b>3,3</b>	>35
cell adhesion molecule 3	CADM3	1,5	<b>3,0</b>	-1,2	<b>1,6</b>	>100
claudin 1	CLDN1	<b>1,7</b>	<b>8,7</b>	<b>1,7</b>	<b>6,1</b>	>450
claudin 14	CLDN14	<b>10,9</b>	1,8	1,3	<b>5,0</b>	>5
claudin 15	CLDN15	<b>1,5</b>	1,2	1,3	<b>2,2</b>	>100
claudin 4	CLDN4	1,2	<b>7,9</b>	1,1	<b>2,4</b>	>25
claudin 5	CLDN5	-1,6	<b>5,9</b>	-1,3	1,2	>10
claudin 6	CLDN6	-3,1	<b>7,9</b>	1,3	<b>5,6</b>	>5
claudin 7	CLDN7	1,0	<b>2,2</b>	1,2	1,9	>100
claudin 9	CLDN9	1,7	<b>7,6</b>	1,9	<b>5,9</b>	>35
endothelial cell adhesion molecule	ESAM	1,5	<b>2,6</b>	-1,2	1,0	>25
Human MHC class II HLA-DR-beta	HLA-DRB1	1,5	<b>18,9</b>	-2,5	<b>13,5</b>	>50
inducible T-cell co-stimulator ligand	ICOSLG	<b>-2,7</b>	1,7	<b>-2,5</b>	<b>2,8</b>	>15
integrin, alpha M	ITGAM	-3,4	<b>54,5</b>	<b>-3,5</b>	<b>2,8</b>	>50
integrin, beta 8	ITGB8	<b>-2,9</b>	<b>4,2</b>	-1,5	1,2	>60
intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	1,4	<b>3,3</b>	1,1	<b>3,1</b>	>1100
intercellular adhesion molecule 2	ICAM2	1,5	<b>3,8</b>	-1,5	2,2	>10
junctional adhesion molecule 2	JAM2	-1,7	<b>3,3</b>	-1,7	<b>3,3</b>	>120
L1 cell adhesion molecule	L1CAM	<b>-3,7</b>	<b>2,8</b>	<b>-1,8</b>	<b>1,7</b>	>100
major histocompatibility complex, class I, A	HLA-A	<b>1,6</b>	<b>2,1</b>	1,3	<b>1,6</b>	>17000
major histocompatibility complex, class I, B	HLA-B	1,8	<b>2,3</b>	1,4	<b>1,7</b>	>25000
major histocompatibility complex, class I, C	HLA-C	<b>1,8</b>	<b>2,1</b>	1,4	<b>1,5</b>	>13000
major histocompatibility complex, class I, F	HLA-F	<b>2,8</b>	<b>2,2</b>	1,9	<b>1,9</b>	>450
major histocompatibility complex, class II, DM beta	HLA-DMB	2,2	<b>6,9</b>	1,1	<b>11,1</b>	>10
major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	HLA-DPA1	<b>1,9</b>	<b>4,5</b>	1,3	<b>3,9</b>	>140
major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	HLA-DPB1	1,7	<b>2,3</b>	-1,3	<b>2,2</b>	>70
major histocompatibility complex, class II, DR alpha	HLA-DRA	6,5	<b>12,5</b>	1,5	<b>11,7</b>	>35
neogenin 1	NEO1	-1,2	<b>1,9</b>	1,1	<b>2,5</b>	>110
netrin G1	NTNG1	1,9	<b>8,0</b>	1,7	<b>4,1</b>	>20
neural cell adhesion molecule 2	NCAM2	<b>3,2</b>	<b>2,6</b>	<b>1,9</b>	<b>2,2</b>	>65
neurofascin	NFASC	<b>2,6</b>	<b>3,5</b>	1,4	<b>3,0</b>	>1300
neuroligin 1	NLGN1	<b>5,2</b>	2,0	2,4	<b>2,6</b>	>5
neuroligin 3	NLGN3	1,8	<b>4,0</b>	1,2	<b>1,9</b>	>30
selectin L	SELL	3,6	<b>9,6</b>	11,2	<b>14,4</b>	>5
selectin P ligand	SELPLG	1,7	<b>5,8</b>	1,2	<b>3,6</b>	>400
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	<b>2,3</b>	<b>3,1</b>	<b>3,2</b>	<b>6,8</b>	>90
versican	VCAN	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>	<b>1,6</b>	<b>2,4</b>	>1700

Viele der Gene, welche in der Liste der regulierten ‚Cell adhesion molecules (CAM)‘ aufgeführt werden, fanden sich ebenfalls in der Liste der Gene aus dem ‚Leukocyte transendothelial migration‘ KEGG Signal- und Stoffwechselweg wieder (Tabelle 24 und 25). Die Gene für diverse Claudine, JAM2 und die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sind auch hier aufgeführt. So wurden Gene verstärkt exprimiert, welche für die Ausbildung von ‚tight junctions‘ essentiell sind. Gleichzeitig wurden die Gene *mmp2* (Faktor 2,0-2,7) und *mmp9* (Faktor 3,2-83,2) verstärkt exprimiert, wobei nur die relative Transkriptzahl von

*mmp2* mit über 7600 hoch ist. Die Gene kodieren für Metallopeptidasen, welche unter anderem ‚tight junctions‘ degradieren können (Prato et al., 2011; Rosenberg and Yang, 2007)

Tab. 25: Liste der differentiell exprimierten Gene im ‚leukocyte transendothelial migration‘. Nummerierung der Vergleiche entsprechen der Tabelle 13: ①= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C, ②= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C, ④= Ko-Inkubation mit IT4-EC37 bei 37°C verglichen mit der Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C, ⑤= Ko-Inkubation mit IT4-EC40 bei 40°C verglichen mit Ko-Inkubation mit nicht-infizierten Erythrozyten bei 37°C. Fett gedruckt Zahlen weisen auf eine signifikante x-fache transkriptionelle Veränderung hin, wohingegen kursiv gedruckte Zahlen auf nicht-signifikante x-fache Veränderungen hinweisen.

Gen-Name	Gen-Abkürzung	①	②	④	⑤	rel. Trans.zahl
actinin, alpha 2	ACTN2	3,1	4,2	1,7	3,5	>290
claudin 1	CLDN1	1,7	8,7	1,7	6,1	>110
claudin 14	CLDN14	10,9	1,8	1,3	5,0	>5
claudin 15	CLDN15	1,5	1,2	1,3	2,2	>110
claudin 4	CLDN4	1,2	7,9	1,1	2,4	>25
claudin 5	CLDN5	-1,6	5,9	-1,3	1,2	>10
claudin 6	CLDN6	-3,1	7,9	1,3	5,6	>5
claudin 7	CLDN7	1,0	3,9	1,2	1,9	>10
claudin 9	CLDN9	1,7	7,6	1,9	5,9	>35
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4	1,5	21,5	-1,7	5,4	>50
endothelial cell adhesion molecule	ESAM	1,5	2,6	-1,2	1,0	>25
intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	1,4	3,3	1,1	3,1	>1100
integrin, alpha M	ITGAM	-3,4	54,5	-3,5	2,8	>5
junctional adhesion molecule 2	JAM2	-1,7	3,3	-1,7	3,3	>120
matrix metallopeptidase 2	MMP2	2,7	2,0	1,5	2,6	>7600
matrix metallopeptidase 9	MMP9	83,2	1,9	-1,3	3,2	>20
neutrophil cytosolic factor 1	NCF1	5,2	3,8	1,8	4,2	>3
neutrophil cytosolic factor 2	NCF2	1,2	3,3	1,0	1,8	>60
phospholipase C, gamma 2	PLCG2	3,2	3,2	3,3	7,8	>150
protein kinase C, gamma	PRKCG	-1,1	15,3	-1,6	1,5	>10
ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC2	1,4	1,6	1,1	2,2	>480
Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5	RASSF5	-2,1	2,6	-1,5	1,1	>40
ras homolog family member H	RHOH	3,0	4,4	3,1	12,4	>4
TXK tyrosine kinase	TXK	2,6	4,2	2,4	3,2	>15
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	2,3	3,1	3,2	6,8	>90

### 3.2.8 Stimulation der Gehirnendothelzellen mit Patienten-Plasma

Wie bisher gezeigt werden konnte, wurde durch die Zytoadhäsion über den Transkriptionsfaktor NF-κB eine Immunantwort in den Gehirnendothelzellen eingeleitet. Infolge der Immunantwort wurden unter anderem pro-inflammatorische Zytokine und verschiedene Chemokine sezerniert. Dies legte den Rückschluss nahe, dass auch im Plasma von Malariapatienten Signalmoleküle vorhanden sind, die parakrin und autokrin Einfluss auf die Gehirnendothelzellen nehmen. Aus diesem Grund wurden die Gehirnendothelzellen je mit drei Patienten Plasmen für 7 Stunden ko-inkubiert. Da die Transkriptions-Daten von drei verschiedenen Proben miteinander verglichen wurde (unbehandelte HBEC-5i, mit Plasma eines gesunden Probanden inkubierte HBEC-5i und mit Malariapatienten Plasma inkubierte HBEC-5i), erlaubte das Modell die Unterscheidung zwischen hoch- und runterregulierten Genen nicht. Die Vergleiche gaben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Effekt auf ein Gen ausgeübt wurde. Hierbei wurden alle Gene als „beeinflusst“ gewertet, deren p-Wert unter 0,05 lag. Im ersten Schritt der Analyse, wurden die Zahlen der beeinflussten Gene

miteinander verglichen. Dabei sollte untersucht werden, auf welche Gene mehrere Patienten-Plasmen einen Effekt ausüben. Es stellte sich heraus, dass nur 26 Gene durch alle drei Patienten-Plasmen beeinflusst wurden. Die Anzahl an regulierten Genen reichte nicht aus um anschließend eine Stoffwechselweg- oder GO-Term-Analyse durchzuführen. Ebenso wurden nur auf 108 Gene ein Effekt durch eine Kombination aus zwei Patienten-Plasmen ausgeübt. Verglichen mit 252 beeinflussten Genen bei Patienten-Plasma 1 und 184 beeinflussten Genen bei Patienten-Plasma 2, zeigten die Gehirnendothelzellen bei Patienten-Plasma 3 mit insgesamt 288 beeinflussten Genen die umfangreichste transkriptionellen Veränderung (Abbildung 16A). Aus diesem Grund wurden diese Gene mit Hilfe des Internetprogramms *DAVID Gene Functional Classification Tool* biologischen Prozessen zugeordnet. In Abbildung 16B wurden diese GO-Terme mit dem Programm *REVIGO* auf einem zweidimensionalen Diagramm aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass das Patienten-Plasma ähnliche biologische Prozesse auslöste wie zuvor bei der Zytoadhäsion beobachtet. So führte eine Ko-Inkubation mit dem Plasma zu einer Veränderung der Transkription. Weitere Gene sind mit einer inflammatorischen Antwort assoziiert. Ebenfalls wie zuvor bei der Zytoadhäsion festgestellt werden konnte, sind die beeinflussten Gene in Angiogenese-, apoptotische Prozesse und bei der Organisation der extrazellulären Matrix beteiligt. Zusammengefasst wurden die 288 differentiell exprimierten Gene 95 GO-Termen zugeordnet. Somit ist der Effekt, den das Plasma auf die Gehirnendothelzellen ausübte, vergleichbar mit dem Effekt, der nach der Zytoadhäsion zu beobachten war. Wie man aber an der Anzahl an beeinflussten Genen erkennen konnte, war die Effekt des Plasmas nicht so stark ausgeprägt.

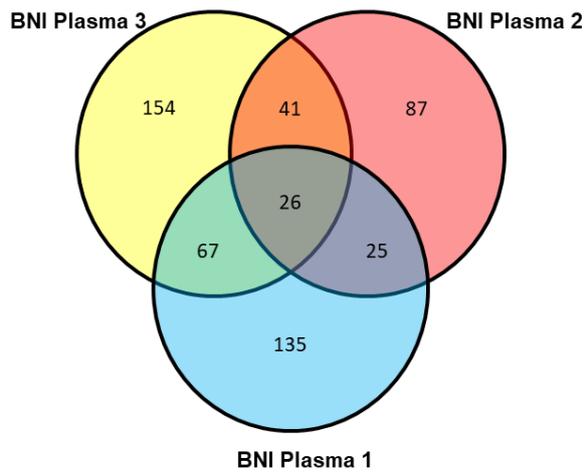
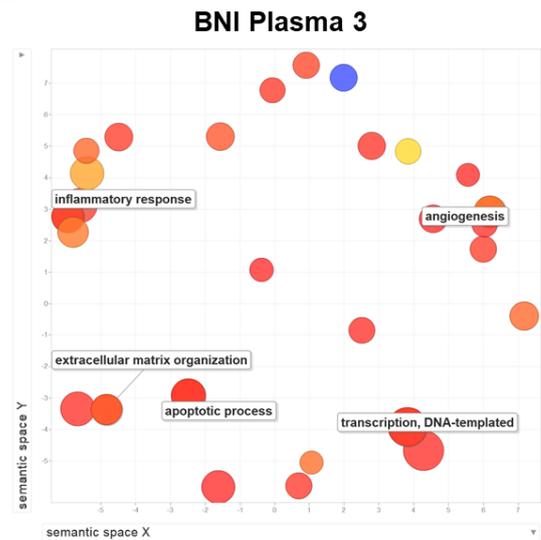
**A****B**

Abb. 16: Venn-Diagramm und REVIGO-Diagramm der transkriptionellen Veränderungen induziert durch Plasma von Malaria-Patienten. (A) Die Zahl der differenziell exprimierten Gene wird durch die Nummer in jedem Kreis angegeben. Die Nummer in den Überlappungen steht für die Zahl der differenziell exprimierten Gene, welche in den entsprechenden zwei/allen Patienten-Plasmen reguliert wurden. Es wurden sowohl hoch- als auch runterregulierte Gene mit einbezogen. (B) REVIGO Diagramme der GO Terme (biologische Prozesse) nach der Ko-Inkubation mit dem Patienten-Plasma 3 (BNI Plasma 3).

## 4. Diskussion

Die Zytoadhäsion von *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten an die Endothelzellen der Gefäßwände ist einer der Hauptpathogenitätsfaktoren einer Malaria *tropica*. In Folge der Zytoadhäsion kommt es in dem betroffenen Gewebe zu inflammatorischer Zytokinproduktion und Gefäßdurchlässigkeit. 10-20% der Malaria-Infektionen verlaufen tödlich und dabei ist die CM eine der schwersten Krankheitsverläufe (Idro et al., 2010). Auch wenn eine CM nicht zum Tod führt, besteht die Gefahr lebenslang an neurologischen Defiziten zu leiden (Idro et al., 2010). Die Zytoadhäsion an Gehirnendothelzellen und die dadurch induzierten Kaskade an pathogenen Vorgängen sind daher im Fokus der Forschung. Mit Hilfe von Transkriptom-Studien lassen sich biologische Prozesse, sowohl in dem Parasiten als auch in der Wirtszelle, auf zellulärer Ebene identifizieren und deren Einfluss auf die Pathogenität einer CM untersuchen. Dank neuester ‚next generation sequencing‘-Methoden lassen sich umfangreiche Transkriptom-Studien durchführen, die noch vor ein paar Jahren nur mit enormem finanziellem Aufwand realisierbar gewesen wären. Ein weiteres Hindernis bei der Erforschung der Pathogenität von CM haben praktische und ethische Gründe. Studien mit humanen Gehirnendothelzellen *in vivo* sind nicht denkbar und es muss daher bei Transkriptom-Studien auf ein Modell für eine CM zurückgegriffen werden. In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Modell mit immortalisierten humanen Gehirnendothelzellen verwendet, um transkriptionelle Veränderungen in Folge der Zytoadhäsion zu untersuchen. Die Zytoadhäsion ist notwendig, um die Pathogenität einer CM zu erklären, doch spielen noch weitere Faktoren eine wichtige Rolle, um den Verlauf einer schweren Malariainfektion zu erklären. Das Niveau von pro-inflammatorischen Zytokinen und anderen Immunmediatoren ist im Serum von Patienten mit einer schweren Malaria erhöht (Awandare et al., 2006; Ayimba et al., 2011; Lyke et al., 2004). Als Folge der Immunantwort entwickeln die Patienten Fieber und die erhöhte Körpertemperatur nimmt ebenfalls Einfluss auf die Genexpression von Parasiten und Endothelzellen (Hasday et al., 2001; Oakley et al., 2007). In dieser Transkriptom-Studie sollen daher der Einfluss von Zytoadhäsion und Fieber getrennt und in Kombination auf die Parasiten und Gehirnendothelzellen untersucht werden.

Patienten, die an einer schweren Malaria erkrankt sind, zeigen ein erhöhtes Niveau an pro-inflammatorischen Mediatoren im Plasma (Ayimba et al., 2011). Die sezernierten

Signalmoleküle können autokrin und parakrin auf die Gehirndothelzellen wirken. Daher soll in dieser Arbeit ebenfalls der Effekt von Patienten-Plasma auf die Gehirndothelzellen auf transkriptioneller Ebene untersucht werden.

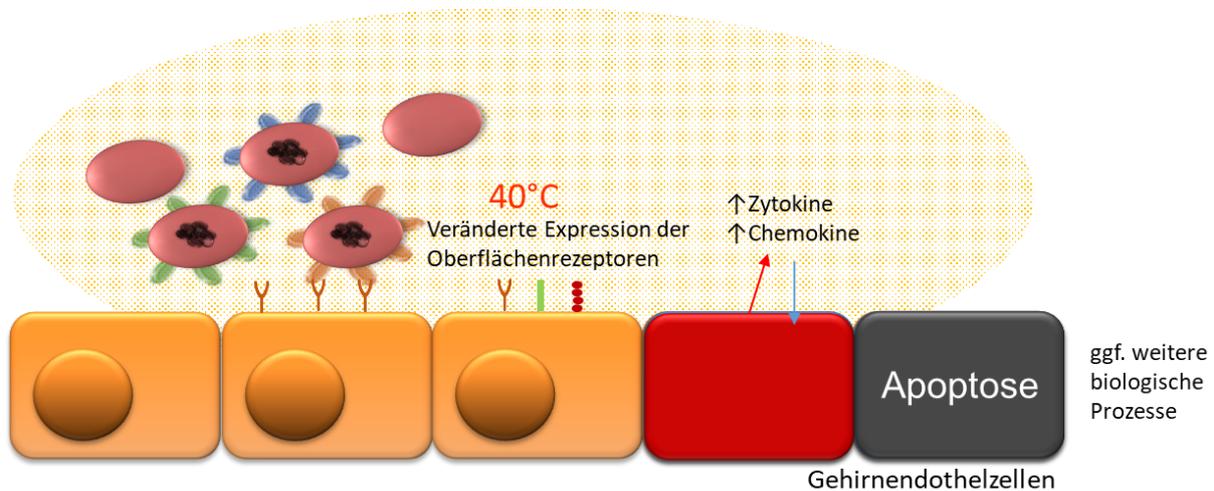


Abb. 17: Ziel dieser Arbeit war es mittels Transkriptionsanalyse die Veränderungen in Gehirndothelzellen, sowie infizierten Erythrozyten, infolge der Zytoadhäsion bei 37°C und 40°C zu untersuchen. Durch bereits veröffentlichte Transkriptom-Studien bei 37°C kann von transkriptionellen Veränderung in der Expression von Adhäsionsmolekülen, inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, sowie apoptotischen Prozessen ausgegangen werden. Darüber hinaus soll durch neueste ‚next generation sequencing‘-Methoden bisher unentdeckte biologische Prozesse identifiziert werden, die bei den pathologischen Vorgängen eine Rolle spielen. Durch die bereits bekannte Sezernierung inflammatorischer Mediatoren, soll ebenfalls der Effekt von Patienten-Plasmen von Malariapatienten auf das Transkriptom der Gehirndothelzellen untersucht werden. Über transkriptionelle Veränderungen auf Seiten des Parasiten ist bisher wenig bekannt. Daher sollen an dieser Stelle vor allem Veränderungen von Genen, die im Zusammenhang mit der Zytoadhäsion stehen, analysiert werden.

Hierfür wurde die Arbeit in vier Abschnitte unterteilt. Im ersten Teil der Arbeit mussten die Rahmenbedingungen für die Transkriptom-Studie festgelegt werden. Im zweiten Abschnitt wurde der Einfluss auf das Transkriptom der Parasiten untersucht. Im dritten Abschnitt wurden die Transkriptomdaten der Endothelzellen analysiert und interpretiert. Im Fokus stehen hier die transkriptionellen Veränderungen, die durch Zytoadhäsion und erhöhter Körpertemperatur hervorgerufen werden. Im letzten Abschnitt wurden die Effekte von Signalmolekülen im Plasma von Malariapatienten auf die Endothelzellen untersucht.

#### 4.1 Voruntersuchungen

Es besteht die Möglichkeit, aus Patienten isolierte *Plasmodium falciparum* Parasiten (Feldisolate) an *in vitro*-Kulturbedingungen zu adaptieren. Für Transkriptom-Studien sind diese adaptierten Parasiten allerdings nicht geeignet. Das *Plasmodium* Genom enthält viele Multigen-Familien, welche besonders bei *P. falciparum*, ein hohes Maß an genetischer Variabilität aufweisen. Dies führt zu Schwierigkeiten bei der Zuordnung der Sequenzen zu den entsprechenden Genen (Lee et al., 2018). Aus diesem Grund wurde auf den Laborstamm

IT4/FCR3 zurückgegriffen, dessen Genom in der PlasmoDB-Datenbank hinterlegt ist. Die Wahl der Endothelzellen ist für eine Transkriptom-Studie entscheidend. So konnte eine Transkriptom-Studie von Kallmann *et al.* zeigen, dass je nach Herkunft der Endothelzellen die Expression von Genen unterschiedlich ist (Kallmann et al., 2002). Somit ist der Effekt der extrazellulären Stimuli ebenfalls verschieden. Da in dieser Arbeit die Untersuchung der transkriptionellen Veränderungen während einer CM durchgeführt werden soll, ist auf die immortalisierte Zelllinie HBEC-5i zurückgegriffen worden. In mehreren Studien wurde diese Zelllinie für Transkriptom-Studien und Bindungsstudien mit *P. falciparum* verwendet (Claessens et al., 2012; Dorovini-Zis et al., 1991; Tripathi et al., 2009). Die HBEC-5i Zelllinie ist gut charakterisiert und weist Eigenschaften, wie ein reduzierter transendothelialer elektrischer Widerstand (engl.: *transendothelial electrical resistance* (TEER)) nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und Lymphotoxin- $\alpha$  auf (Wassmer et al., 2006). Daher diente diese Zelllinie als Modell, um pathophysiologische Veränderungen der Bluthirnschranke zu untersuchen und eignet sich ebenfalls zur Untersuchung pathophysiologischer Vorgänge während einer CM (Wassmer et al., 2006). Obwohl die Zytoadhäsion von infizierten Erythrozyten an Rezeptoren, die von den HBEC-5i Zellen präsentiert werden, in mehreren Studien bestätigt ist, konnte eine Bindung des Laborstammes IT4 nicht nachgewiesen werden (Cunningham et al., 2017; Rieger et al., 2015). Aus diesem Grund wurden die Parasiten über mehrere „panning“-Runden auf die Bindung an HBEC-5i Zellen angereichert. Eine Anreicherung fand sowohl bei 37°C als auch bei 40°C statt, um den Effekt von Fieber auf die Zytoadhäsion zu untersuchen. Allerdings ist die erhöhte Temperatur auch ein Stressfaktor, der zu einer veränderten Transkription in Zellen führt (Morimoto, 1998). Infolge dessen kann auch die Präsentation von Oberflächenproteinen beeinflusst werden, welche Einfluss auf das Bindungsverhalten der infizierten Erythrozyten nehmen können (Conway et al., 1994; Kohn et al., 2002). ICAM-1 gilt allgemein als Aktivierungsmarker für Endothelzellen, dessen Expression in Folge von TNF- $\alpha$  erhöht wird (Szmitko et al., 2003). Nach 6 Stunden wurde eine um den Faktor 1,5-fach erhöhte Menge an ICAM-1 auf der Oberfläche der in dieser Arbeit verwendeten HBEC-5i Zellen nachgewiesen. Eine Präinkubation von 7 Stunden ist somit ausreichend um Hitze-induzierte Veränderungen auf der Oberfläche der Endothelzellen zu etablieren.

In dieser Arbeit sollte ebenfalls der Einfluss des Plasmas von Malariapatienten auf das Transkriptom der Endothelzellen untersucht werden. Plasma, beziehungsweise Serum, ist in

der Zellkultur ein weit verbreiteter Mediumzusatz. Dabei stellt das Komplementsystems im Serum des Donors eine Herausforderung dar. Eine Studie von Hakulinen und Meri konnte zeigen, dass das Komplementsystem Tumorzellen *in vitro* lysiert (Hakulinen and Meri, 1998). Eine Lyse der immortalisierten HBEC-5i Zellen nach Zugabe des Patienten-Plasma ist auch in dieser Arbeit zu beobachten. Üblicherweise wird das Komplementsystem im humanen oder bovinen Serum in der Zellkultur vorher hitzeinaktiviert. Eine Hitzeinaktivierung der Patienten-Plasmen ist in dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Zytokine und andere im Blut gelösten Immunmediatoren sind bei Raumtemperatur oder bei 4°C im Kühlschrank nur wenige Stunden stabil (Aziz et al., 2016; Friebe and Volk, 2008). Eine Hitzeinaktivierung der Patienten-Plasmen würde daher zu einer Inaktivierung der Signalmoleküle führen und somit wären die Plasmen für die Experimente unbrauchbar. Bei der Blutentnahme wurden die Blutproben in EDTA-Röhrchen aufgefangen. In erster Linie dient EDTA als Antikoagulant, der die Gerinnung des Bluts verhindert (Banfi et al., 2007). Heparin ist ebenfalls ein weit verbreitetes Antikoagulant und besitzt, wie EDTA, Komplementsystem-inaktivierende Eigenschaften. Während EDTA die C1q Subkomponente des Komplementsystem inaktiviert, führt Heparin ab einer Konzentration von 2 U/ml zu einer Inaktivierung der C3 Komponente (Logue, 1977; Zapf and Loos, 1985). Der lytische Effekt des Patienten-Plasmas auf die Gehirndothelzellen konnte in dieser Arbeit durch Präinkubation mit Heparin aufgehoben werden. Bei einer anschließenden Untersuchung der Endothelzell-aktivierenden Eigenschaften der verschiedenen Patienten-Plasmen, zeigte sich, dass keines der Seren die Expression des Aktivierungsmarkers ICAM-1 auf den Gehirndothelzellen erhöht. Dies ist auf mehrere mögliche Gründe zurückzuführen. Zum einen könnten die Plasmen schlicht keine ICAM-1-induzierenden Eigenschaften besitzen. Zum anderen kann die Handhabung der Plasmen nach der Blutentnahme, die aktivierenden Eigenschaften beeinflusst haben. Die meisten Zytokine können bei -80°C für 2 Jahre gelagert werden (de Jager et al., 2009). Nach spätestens 4 Jahren Lagerung bei -80°C sind die meisten Zytokine degradiert (de Jager et al., 2009). Ebenso sollten ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Zytokinen vermieden werden, da auch dies die Stabilität von Zytokinen und Chemokinen negativ beeinflusst (de Jager et al., 2009). Zu dem Zeitpunkt der Experimente waren die Patienten-Plasmen zwischen 7 und 1,5 Jahre bei -80°C gelagert. Somit waren alle Patienten-Plasmen eine kritische Zeit lang gelagert und als Auswahlkriterium für die Verwendung der Plasmen in dieser Arbeit ist der Ort der Infektion sowie eine ähnliche Parasitämie ausgewählt worden.

#### 4.2 Effekt der Zytoadhäsion und Fieber auf die *P. falciparum* infizierten Erythrozyten

Eine Fragestellung in dieser Arbeit bezieht sich auf die Effekte der Endothelzellen, die während der Zytoadhäsion zusätzlich erhöhter Temperatur ausgesetzt sind, auf die Bindungseigenschaften der infizierten Erythrozyten. Hierfür wurden zwei *P. falciparum* Populationen auf die Bindung an HBEC-5i Zellen angereichert, wobei sich ausschließlich die Temperatur während der Anreicherungsrounds unterschied. Die Anreicherung bewirkt, dass aus der Stammkultur (IT4-NE), die Parasiten angereichert werden, welche das oder die entsprechende(n) *var*-Gen(e) exprimieren, die für *PfEMP1* Proteine kodieren, die als Liganden die Bindung an Gehirndothelzellen vermitteln. Es wird angenommen, dass abhängig von der Schwere der Malaria-Infektion und dem Ort (Gehirn, Lunge, Plazenta etc.) unterschiedliche Gruppen von *PfEMP1* Proteinen für die Bindung verantwortlich sind (Jensen et al., 2004; Kraemer and Smith, 2006; Kyriacou et al., 2006). In einem infizierten Erythrozyten wird zur gleichen Zeit ausschließlich ein *var*-Gen exprimiert, sodass auch nur eine Art von *PfEMP1* auf der Oberfläche präsentiert wird (Scherf et al., 1998). Zwischen intraerythrozytären Replikationszyklen kann es zu einem Wechsel der *var*-Gen Expression kommen, wobei die ‚switching‘-Rate je nach *var*-Gen unterschiedlich ist und zwischen 0,3 und 2 % liegt (Frank et al., 2007). Somit kann davon ausgegangen werden, dass alle *var*-Gene in der IT4-NE Population zu Beginn, beziehungsweise während der mehrere Wochen andauernden Anreicherungsprozedur exprimiert werden. Bei der Analyse des *var*-Gen Profils der IT4-NE Population fällt auf, dass tatsächlich nahezu alle *var*-Gene exprimiert werden. Allerdings werden nicht alle *var*-Gene gleich stark exprimiert. Mit ICAM-1, VCAM-1 werden von der immortalisierten Zelllinie mindestens zwei Rezeptoren auf der Oberfläche präsentiert, die in Verbindung mit der Zytoadhäsion im Gehirn diskutiert werden (Viebig et al., 2005; Wassmer et al., 2006). Mit CSA ist eine weitere Struktur auf der Zelloberfläche, welche ebenfalls als Bindungspartner für infizierte Erythrozyten identifiziert wurde (Robert et al., 1995). In einer Studie von Claessens und Kollegen wurden ebenfalls FCR3/IT4-infizierte Erythrozyten über HBEC-5i Zellen bei 37°C angereichert und eine erhöhte Expression der beiden *var*-Gene *IT4\_var07* und *IT4\_var19* nachgewiesen (Claessens et al., 2012). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Unabhängig von der Temperatur, war in beiden angereicherten Parasitenpopulationen das *var*-Gen *IT4\_var04*, welches auch *var2csa* genannt wird, das dominant-exprimierte Gen. Dabei fällt auf, dass bei der IT4-EC40 Population, die *IT4\_var04* Expression im Vergleich zur IT4-EC37

Population nahezu verdoppelt ist. Wohingegen das ‚switching‘ der *var*-Gene epigenetisch reguliert wird und unabhängig von extrazellulären Stimuli scheint, ist bereits gezeigt worden, dass eine erhöhte Körpertemperatur auch die *var*-Gen Expression erhöht (Udomsangpetch et al., 2002). Es wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die beiden paralogen Plasmodium falciparum ‚silent information regulator’s A and B‘ (*pfSir2a* und *pfSir2b*) die Expression der *var*-Gene regulieren. Diese beiden Sirtuine sind NAD<sup>+</sup>-abhängige Histon-Deacetylasen, die bei der Kondensation des Chromatins und dem sogenannten ‚heterochromatic gene silencing‘ eine Rolle spielen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Sirtuine mit den Promotorsequenzen verschiedener *var*-Gen Klassen interagieren können (Tonkin et al., 2009). In dem 3D7 *P. falciparum* Laborstamm konnte bei einem knock-out des *pfSir2a* Gens eine verstärkte *var*-Gen Expression beobachtet werden (Merrick et al., 2010). Obwohl die Expression des *IT4\_var04 var*-Gens bei 40°C fast verdoppelt wurde, ist die Expression der beiden Sirtuin-kodierenden Gene *pfSir2a* und *pfSir2b* durch die Zytoadhäsion bei 40°C nicht signifikant verändert. Die erhöhte *var*-Gen Expression lässt sich somit nicht auf eine veränderte Sirtuin Menge zurückführen. Die Gehirnendothelzellen wiederum scheinen eine wichtige Funktion bei der Veränderung der *var*-Gen Expression einzunehmen. Bei Parasiten aus der IT4-NE Population, die ausschließlich einen Hitzeschock ausgesetzt wurden, ist keine Veränderung der *var*-Gen Expression zu beobachten. Dies spricht für eine Art Kommunikation zwischen Parasiten und den Endothelzellen, die ausschließlich bei 40°C vorkommt und die *var*-Gen Expression beeinflusst. Ob eine erhöhte *var*-Gen Expression auch zu einer vermehrten Präsentation der PfEMP1 auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten führt, ist bisher nicht eindeutig belegt und daher kontrovers diskutiert (Oakley et al., 2007; Udomsangpetch et al., 2002). Mittels Western Blot Analyse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Menge an PfEMP1 sowohl auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten als auch in der gesamten Wirtszelle deutlich erhöht ist. Bei der IT4-EC40 Parasitenpopulation lässt sich PfEMP1 auch auf der Oberfläche nachweisen. Dies war bei der IT4-EC37 Population erst möglich, nachdem die Zahl an infizierten Erythrozyten je Blot verdreifacht wurde. Diese Ergebnisse stützen somit die These von Udomsangpetch und Kollegen, dass eine erhöhte Temperatur auch den Transport der PfEMP1 an die Oberfläche der infizierten Erythrozyten erhöht (Udomsangpetch et al., 2002). Die Menge an PfEMP1 auf der Oberfläche kann Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Parasiten nehmen. So führte eine erhöhte Transkription von Gruppe B *var*-Genen in Patientenisolaten (aus Patienten, die

an einer CM litten) zu einer verstärkten Bindung an CD36, verglichen mit Isolaten aus Patienten, die an einer unkomplizierten Malaria litten (Almelli et al., 2014). Es kann also angenommen werden, dass auch eine erhöhte Expression des *var2csa* und Präsentation des PfEMP1 auf der Oberfläche der Erythrozyten Einfluss auf die Bindungseigenschaften der Parasitenpopulationen nimmt. *Var2csa* kodiert VAR2CSA und dieses vermittelt die Bindung an CSA auf der Oberfläche von Synzytiotrophoblasten in der Plazenta (Salanti et al., 2004; Salanti et al., 2003). Die VAR2CSA-vermittelte Zytoadhäsion in der Plazenta gilt als Hauptpathogenitätsfaktor für eine ‚*pregnancy associated malaria*‘ (PAM) (Salanti et al., 2004). Allerdings ist die Zytoadhäsion an CSA nicht ausschließlich an Synzytiotrophoblasten in der Plazenta zu beobachten. So konnte nachgewiesen werden, dass infizierte Erythrozyten über CSA an mikrovaskuläre humane Gehirndothelzellen adhären (Adams et al., 2014; Avril et al., 2012). Die Tatsache, dass CSA-bindende infizierte Erythrozyten nicht ausschließlich bei schwangeren Patienten nachgewiesen wurde und anti-VAR2CSA Antikörper in nicht-schwangeren Frauen detektiert wurden, ist ein Indiz dafür, dass VAR2CSA neben der PAM ebenfalls in anderen Krankheitsbildern der Malaria eine Rolle spielen könnte (Beeson et al., 1999; Chaiyaroj et al., 1996; Traore et al., 2000). Die in dieser Arbeit verwendete HBEC-5i Zelllinie besitzt ebenfalls die gleiche Modifikation von CSA auf der Oberfläche wie Synzytiotrophoblasten in der Plazenta (Wassmer et al., 2006). Die Bindung der beiden angereicherten Parasitenpopulationen konnte inhibiert werden, wenn die Parasiten vor dem Bindungs-Assay mit löslichen CSA (engl. *soluble CSA* (sCSA)) inkubiert wurden. Der gleiche Effekt war zu beobachten, wenn die Endothelzellen vor dem Bindungs-Assay mit Chondroitinase ABC behandelt wurden. Dieses Enzym spaltet spezifisch CSA von der Oberfläche der Gehirndothelzellen und macht so eine Bindung von VAR2CSA an CSA unmöglich. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die beobachtete Bindung der Parasitenpopulationen IT4-EC37 und IT4-EC40 über die Bindung von VAR2CSA auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten an CSA, auf der Oberfläche der Gehirndothelzellen, vermittelt wird. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Zytoadhäsion infizierter Erythrozyten an weitere Oberflächenproteine auf den HBEC-5i Zellen durch CSA verhindert wird, obwohl beschriebene PfEMP1-Liganden auf der HBEC-5i-Oberfläche nachgewiesen wurden. Wie stark infizierte Erythrozyten an CSA binden hängt unter anderem von der Menge an VAR2CSA auf der Oberfläche der Wirtszellen ab. Dabei hat die Temperatur direkt während der Bindung allerdings keinen Einfluss auf den

Bindungsphänotyp der infizierten Erythrozyten. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Bindungskapazität detektiert werden, wenn ein Bindungs-Assay mit den angereicherten Populationen bei 40°C durchgeführt wurden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Fieber, durch Konformationsänderungen der Bindungspartner, die Bindung beeinflusst.

Die Menge an PfEMP1 an der Oberfläche der infizierten Erythrozyten ist nur ein Faktor, der die Bindungseigenschaften der Parasiten beeinflusst. Eine Studie von Fairhurst und Kollegen (Fairhurst et al., 2005) konnte zeigen, dass bei westafrikanischen Kindern, mit einer mutierten Form des Hämoglobins (Hämoglobin C), ein schützender Effekt gegen Malariaerkrankungen zu beobachten war (Fairhurst et al., 2005). Infizierte Erythrozyten von diesen Kindern zeigten eine verminderte Zytoadhäsion an CD36 und ICAM-1. Fairhurst und Kollegen konnten dies auf eine veränderte Verteilung der PfEMP1 Moleküle auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten zurückführen, welche sich von denen ohne Mutation im Hämoglobin unterschied. In Patientenisolaten sammeln sich mehrere PfEMP1 in sogenannten Knob-Strukturen, welche die PfEMP1 Proteine mit dem Zytoskelett des infizierten Erythrozyten verbinden. Knobs sind submembrane Erhebungen, deren Aufgabe während der Bindung zwischen infizierten Erythrozyten und Endothelzelle mit denen von ‚tight junctions‘ verglichen werden kann (Sharma, 1991). Zwar können infizierte Erythrozyten auch ohne Knobs an CD36 binden, doch zeigt sich, dass die Bindungsfähigkeit reduziert ist, wenn die Bildung der Knobs verhindert wird (Biggs et al., 1990; Horrocks et al., 2005). Diverse Studien konnten das ‚knob-associated histidine-rich protein (KAHRP), PfEMP3, PfEMP2 (MESA), ‚ring-infected erythrocyte antigen (RESA)‘ und Pf332 als Knob-assoziierte Proteine identifizieren (Hinterberg et al., 1994; Maier et al., 2009; Pei et al., 2007). Neben diesen schon seit längeren bekannten Proteinen konnte in einer Studie von Alampalli und Kollegen weitere Knob-Proteine identifiziert werden (Alampalli et al., 2018). Mittels eines experimentellen Proteomik-Ansatzes konnte Alampalli und Kollegen nachweisen, dass im *P. falciparum* Laborstamm 3D7 die Proteine ‚elongation factor 1 alpha‘, ‚acyl-CoA synthetase‘ und weitere hypothetische Proteine mit der Knob-Struktur assoziiert sind. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass mindestens ein Mitglied der ‚Plasmodium helical interaction subtelomeric (PHIST)‘ Proteinfamilie eine wichtige Rolle bei dem Transport der PfEMP1 Proteine zu den Knob-Strukturen einnimmt (Oberli et al., 2014; Oberli et al., 2016). In dieser Arbeit zeigte eine weitere Analyse der Transkriptom-Daten im Ringstadium der beiden angereicherten Parasitenpopulationen, dass in den IT4-EC40 Parasiten sechs Gene

exprimiert werden, die im subtelomerischen Ende des Chromosoms 2 liegen. Dahingegen wurden diese Gene in den IT4-EC37 Parasiten überhaupt nicht exprimiert. Eine Deletion dieser Region führt zu einer Reduzierung der Zytoadhäsion, da in dieser Region Gene für die Bildung von Knob-Strukturen lokalisiert sind (Horrocks et al., 2005). Dazu gehören zum Beispiel KAHRP und *PfEMP3*. KAHRP scheint nicht nur bei der Bildung der Knob-Strukturen essentiell zu sein, so ist die Menge an *PfEMP1* auf infizierten Erythrozyten, die kein KAHRP exprimieren, nahezu halbiert (Horrocks et al., 2005). In der subtelomeren Region des Chromosoms 2 befinden sich zwei weitere Proteine, welche mit der Knob-Struktur assoziiert sind, das ‚*knob-associated heat shock protein 40*‘ und das ‚*PHIST-domain-containing RESA-like protein 1*‘ (Acharya et al., 2012; Goel et al., 2014). Bei den beiden weiteren hochregulierten Genen in diesem Locus, handelt es sich um ein putatives Chaperon Dnaj und ein *Plasmodium* Exportprotein mit einer Transmembrandomäne ohne bekannte Funktion. Bezugnehmend auf die Studie von Alampalli *et al.*, die zeigen konnte, dass im 3D7 Laborstamm eine ‚*acyl-CoA synthetase*‘, ein ‚*glycophorin binding protein*‘ und mehrere PHIST-Proteine mit der Knob-Struktur assoziiert sind, konnte eine erhöhte Expression der kodierenden Gene in IT4-EC40 Parasiten nachgewiesen werden (Alampalli et al., 2018). Die Transkriptom-Daten zeigen auf, dass bei der Zytoadhäsion bei 40°C die Expression von Knob-assoziierte Proteinen induziert beziehungsweise erhöht wird. Im nächsten Schritt der Arbeit sollte daher gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression der Gene auch tatsächlich zu einer Bildung von Knobs an der Oberfläche der infizierten Erythrozyten führt. Für die Bildung von Knobs ist KAHRP essentiell und eine Deletion des C-Terminus verhindert die Bildung von funktionsfähigen Knobs (Rug et al., 2006). Mittels Western Blot Analyse war ein Nachweis des KAHRP-Proteins nur bei der IT4-EC40 Parasiten möglich. Somit konnten die Transkriptom-Daten verifiziert werden. Knobs lassen sich mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachweisen. Dabei erscheinen diese als elektronendichte Erhebungen auf der Erythrozytenmembran (Gruenberg et al., 1983). Die Aufnahmen bestätigen die bisherigen Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse und der Western Blot Analyse. Bei allen untersuchten Parasiten der IT4-NE und IT4-EC37 Populationen waren keine Knobs zu erkennen. Dahingegen konnten bei allen untersuchten infizierten Parasiten der IT4-EC40 Population Knobs nachgewiesen werden. Wie zuvor bei der *var*-Gen Expression beobachtet, reicht ein Hitzeschock allein nicht aus, um die Knob-

Bildung zu induzieren. Auch diese Ergebnisse unterstreichen den Einfluss den Endothelzellen während der Zytoadhäsion bei 40°C auf die Parasiten haben.

Es konnte somit gezeigt werden, dass während der Zytoadhäsion bei erhöhter Temperatur Endothelzellen die Bindungseigenschaften der infizierten Erythrozyten signifikant beeinflussen. Im letzten Abschnitt des Teils dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die erhöhte Bindungsaffinität der IT4-EC40 Parasiten über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt. Wie bereits vorher erwähnt, ist die *switching*-Rate bei *var*-Genen unterschiedlich und wird unter anderem von der Lage auf dem Chromosom bestimmt (Frank et al., 2007). *IT4\_var04* findet sich in der subtelomeren Region des Chromosom 12 und die *switching*-Rate von *var*-Genen in diesen Regionen variiert zwischen 0,3-2% je Replikationszyklus (Frank et al., 2007). Auch wenn über die exakte Zahl der *switching*-Rate diskutiert wird, kann über einen Zeitraum von 4 Wochen (ungefähr 20 Generationen) davon ausgegangen werden, dass es zu einer veränderten *var*-Gen Expression kommt. Als Folge dieser veränderten *var*-Gen Expression würde sich auch die Bindungsaffinität an die HBEC-5i Zelllinie verändern. Eine Veränderung der Bindungsaffinität könnte, neben dem ‚*switchen*‘ der *var*-Gene, auch durch einen Verlust der Knob-Strukturen kommen. Eine Untersuchung der infizierten Erythrozyten hinsichtlich der Knob-Strukturen war leider nicht möglich, da die Kulturen nach 4 Wochen kontaminiert waren und verworfen werden mussten. Allerdings war eine veränderte Bindungsaffinität war nach 4 Wochen nicht zu erkennen. Bei IT4-EC37 und IT4-EC40 Parasiten, die diesen Zeitraum nicht weiter über HBEC-5i Zellen bei 37°C beziehungsweise 40°C angereichert wurden, veränderte sich die Bindungsaffinität, verglichen mit der weiter angereicherten Kontrolle, nicht. Einzig IT4-EC40 Parasiten die bei 37°C anstatt bei 40°C über HBEC-5i Zellen angereichert wurden, sank die Bindungsaffinität zu diesen Zellen. Somit lässt sich sagen, dass sich die durch Hitze und Endothelzellen induzierte erhöhte Zytoadhäsion zumindest in Teilen reversibel ist. Wie zuvor bei den *var*-Genen und der Induktion von Knobs zeigt sich, dass die Endothelzellen Einfluss auf das Bindungsverhalten der infizierten Erythrozyten während der Zytoadhäsion nehmen.

#### 4.3 Effekt von Zytoadhäsion und erhöhter Temperatur auf die Gehirnendothelzellen

Ein gesundes Endothelium verhindert die Koagulation des Blutes, kontrolliert den Blutfluss und den Transport von Proteinen aus dem Blutfluss ins angrenzende Gewebe (Rajendran et al., 2013). Die pathogenen Prozesse, die bei CM Patienten ausgelöst werden, sind stark mit

der Zytoadhäsion von infizierten Erythrozyten an die Endothelzellen der mikrovaskulären Blutgefäße im Gehirn assoziiert. Die Zytoadhäsion führt zu einer komplexen Reaktion der Endothelzellen, die die oben genannten Funktionen stark beeinträchtigen kann. Eine Aktivierung der Endothelzellen durch infizierte Erythrozyten führt zu einer Regulation von immunmodulatorischen Signalmolekülen, wie Zytokinen und Chemokinen, sowie Adhäsionsmoleküle (Tripathi et al., 2007). Ebenso wird die Integrität von Gehirndothelzellen *in vitro* durch die Ko-Kultivierung mit infizierten Erythrozyten beeinträchtigt (Tripathi et al., 2007). Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit ebenfalls die transkriptionellen Veränderungen von Gehirndothelzellen in Folge von Zytoadhäsion und erhöhter Temperatur untersucht werden.

Die Bindung von Erythrozyten an Endothelzellen ist in gesunden Personen normalerweise überschaubar. Dahingegen kommt es beispielweise bei einer Sichelzellenanämie oder bei Diabetes Mellitus zu einem gewissen Grad an Interaktion zwischen Erythrozyten und Endothelzellen und infolgedessen zu vaskulären Komplikationen (Yang et al., 2010). Dabei präsentieren Erythrozyten verschiedene Moleküle auf ihrer Oberfläche, welche die Adhäsion an Endothelzellen etablieren (Chakravorty et al., 2007). Unter anderem bindet VLA-4 (alpha4beta 1) an VCAM-1, welches auch von den HBEC-5i Zellen exprimiert wird (Walmet et al., 2003). Auch eine Bindung von Erythrozyten an Endothelzellen über Fibrinogen wurde nachgewiesen (Wautier et al., 1983). Eine solche Bindung kann zumindest in geringen Maßen die Expression von ICAM-1 beeinflussen (Brown et al., 2001). Aufgrund der Zytoadhäsion und den dadurch gestörten Blutfluss kommt es während einer *P. falciparum* Infektion zu einem Kontakt zwischen nicht-infizierten Erythrozyten und Endothelzellen. In den Transkriptom-Daten lässt sich erkennen, dass nicht-infizierte Erythrozyten ebenfalls transkriptionelle Veränderungen in den Gehirndothelzellen auslösen. Bezieht man die transkriptionellen Veränderungen durch Ko-Inkubation mit IT4-EC37 Parasiten auf Endothelzellen die ausschließlich mit nicht-infizierten Erythrozyten ko-inkubiert wurden, so sinkt die Zahl an regulierten Genen (Vergleich 4 bezogen auf Vergleich 2). Im Vergleich 4 (Tabelle 13) werden mit 703 Genen, weniger Gene differentiell exprimiert als im Vergleich 1 (Tabelle 13), mit 1115 differentiell exprimierten Genen. In Vergleich 1 (Tabelle 13) wurden die transkriptionellen Veränderungen, aufgrund der Ko-inkubation mit IT4-EC37 Parasiten, auf Endothelzellen bezogen, die weder mit infizierten noch nicht-infizierten Erythrozyten ko-inkubiert wurden. Der gleiche Trend ist bei der Ko-Inkubation mit IT4-EC40 zu erkennen

(siehe Vergleich 2 und 5, Tabelle 13). Eine Erhöhung der Temperatur auf 40°C ist für Endothelzellen ein Stressfaktor, der zur Expression von Stressproteinen, wie *heat shock proteins* (HSPs) führt (Wagner et al., 1999). Im Gegensatz zur Zytoadhäsion ist die Zahl der differentiell exprimierten Gene, welche allein durch einen Hitzeschock induziert wurden, gering. Beim Vergleich, wie viele der differentiell exprimierten Gene gleichzeitig durch Hitzeschock und/oder Zytoadhäsion beeinflusst werden, fällt ebenfalls auf, dass ein Großteil der Gene nur bei einem der jeweiligen Stressfaktoren reguliert werden. Auch die hohe Zahl an regulierten Genen bei Kombination von Hitzeschock und Zytoadhäsion spricht dafür, dass Endothelzellen während Fieber anders auf extrazelluläre Stimuli reagieren. Eine Studie von Hasday *et al.* konnte zeigen, dass fiebrige Temperaturen die Immunantwort von pulmonalen Endothelzellen nach TNF- $\alpha$  Behandlung verändert (Hasday et al., 2001). Eine Inkubation bei 39,5°C erhöht die Permeabilität der Endothelzellen, reduziert die Expression von IL-6, wohingegen die Expression des *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und IL-8 erhöht wird (Hasday et al., 2001). Eine weitere Erklärung für die erhöhte Anzahl an differentiell exprimierten Genen bei Zytoadhäsion bei 40°C, ist die erhöhte Anzahl an adhärierenden infizierten Erythrozyten. Wie bisher gezeigt werden konnte, binden IT4-EC40 Parasiten in einer höheren Zahl an die Gehirndothelzellen als die IT4-EC37 Parasiten. Dies könnte auch die Aktivierung der Endothelzellen potenzieren. Allerdings wäre dieser Effekt auch indirekt durch die Fieber induziert. Wie stark die erhöhte Anzahl an adhärierenden infizierten Erythrozyten in dem experimentellen Aufbau zu Gewicht fällt ist schwer zu sagen. Chakravorty und Kollegen konnte zeigen, dass infizierte Erythrozyten auch ohne PfEMP1 (durch Trypsin-Behandlung vorher abgespalten) zu einer Aktivierung von Endothelzellen führen (Chakravorty et al., 2007). Da sowohl bei 37°C als auch bei 40°C die gleiche Parasitämie verwendet wurde, ist es wahrscheinlich, dass die gleiche Zahl an infizierten Erythrozyten auf den Endothelzellen liegen, auch ohne über VAR2CSA an CSA zu binden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, reagieren Gehirndothelzellen auf die Kombination von Stimuli mit umfangreicheren transkriptionellen Veränderungen, als solche, die nur einem Stimulus ausgesetzt wurden. Mittels Gen Ontologien, sollte versucht werden, die transkriptionellen Veränderungen übersichtlich darzustellen. Dabei werden Gene nach Funktion ihrer Genprodukte biologischen Prozessen zugeordnet. Eine weitere Zuordnung der Gene kann bezüglich der Lokalisation der Genprodukte in zellulären Komponenten und

deren molekularen Funktionen geschehen. Mit Hilfe des Programms DAVID konnten die Listen von differentiell exprimierten Genen GO-Termen für biologische Prozesse zugeordnet werden. Die Bindung der infizierten Erythrozyten bei 37°C wird von der Zelle registriert und das Signal wird über ‚*NIK/NF-κB signaling*‘ weitergeleitet. Daraus resultiert eine veränderte Genexpression. Diese führt zu einer Reihe biologischer Prozesse. Die dominantesten biologischen Prozesse sind eine inflammatorische Antwort, Angiogenese, Zellproliferation und apoptotische Prozesse. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Tripathi und Kollegen, welche ebenfalls die differentiell exprimierten Gene nach Zytoadhäsion bei 37°C ähnlichen biologischen Prozessen zuordnen konnten (Tripathi et al., 2009). Endothelzellen, welche nur einem Hitzeschock ausgesetzt wurden, zeigten eine differentielle Expression von Genen, die in die Hitzeantwort von Zellen annotiert sind. So werden in den Endothelzellen Prozesse zur Proteinfaltung angeschaltet. Durch den Hitzeshock werden ebenfalls apoptotische Prozesse sowie Angiogenese induziert. Obwohl durch die Zytoadhäsion bei 40°C ein Großteil der Gene nur nach Kombination der beiden Stimuli differentiell exprimiert werden, werden keine neuen biologischen Prozesse in der Zelle angesprochen. Allerdings werden die differentiell exprimierten Gene mehreren GO-Termen als zuvor bei 37°C zugeordnet.

Nachdem gezeigt wurde, in welchen biologischen Prozessen die Gene involviert sind, sollten im Folgenden die differentiell exprimierten Gene Signal- und Stoffwechselwegen zugeordnet werden. Anschließend wurden ausgewählte Gene bezüglich ihrer Funktion und Assoziation mit einer *P. falciparum* Infektionen hin analysiert. Dabei werden Hypothesen aufgestellt und mögliche Experimente genannt, um diese zu überprüfen. Diese Vorgehensweise wiederholt sich für jeden der genannten Signal- und Stoffwechselwege.

Eine Zuordnung der differentiell regulierten Gene in Stoffwechselwege konnte zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB eine wichtige Rolle in der Regulation der zellulären Antwort der Endothelzellen auf die Stimuli einnimmt. Dies ist in Übereinstimmung mit mehreren Studien, die als Folge der Zytoadhäsion die Aktivität beziehungsweise Translokation des Transkriptionsfaktor in den Endothelzellen nachweisen konnten (Punsawad et al., 2013; Tripathi et al., 2009; Tripathi et al., 2006). RelA/p65 ist das einzige Mitglied Proteinfamilie der NF-κB Transkriptionsfaktoren, das in allen Vergleichen nicht differentiell exprimiert ist. Dies schließt nicht aus, dass RelA/p65 eine Rolle bei der Signaltransduktion in der

Endothelzelle einnimmt. Bei Patienten, die an einer CM verstorben waren, korrelierte die Signaltransduktion via NF- $\kappa$ B RelA/p65 mit der Apoptose von Endothelzellen (Punsawad et al., 2013). Diese NF- $\kappa$ B Untereinheiten formen Homo- und Heterodimere und liegen in der inaktiven Form im Zytosol der Zelle (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Dort binden inhibitorische Proteine, sogenannte I $\kappa$ Bs, an die Dimere und verhindert die Translokation in den Nukleus. Induziert durch einen extrazellulären Stimulus findet eine Phosphorylierung der I $\kappa$ Bs statt und diese lösen sich von dem NF- $\kappa$ B Dimer. Anschließend findet eine Translokation in den Nukleus statt. Mit I $\kappa$ B $\alpha$  ist auch ein inhibitorisches Protein signifikant hochreguliert. Es wird angenommen, dass die verstärkte Expression von *ikba* ein autoregulatorischer Mechanismus ist, um Aktivität von NF- $\kappa$ B zu regulieren und einzudämmen (Sun et al., 1993).

Die Eigenschaft von infizierten Erythrozyten den Oberflächenrezeptor ICAM-1 auf Endothelzellen zu induzieren, ist kontrovers diskutiert. ICAM-1 ist ein Integrin, welches bei der Transmigration der Leukozyten durch das Endothel eine Funktion übernimmt (Frank and Lisanti, 2008). Allerdings ist ICAM-1 auch ein umfangreich beschriebener Bindungspartner für PfEMP1 und somit kann eine erhöhte Expression Einfluss auf die Pathogenität einer Malaria-Infektion nehmen. Es wurde bisher angenommen, dass ausschließlich nach Bindung an Gehirnendothelzellen ICAM-1 vermehrt exprimiert wird (Tripathi et al., 2006). Eine Bindung an HUVEC indes führt zu keiner vermehrten ICAM-1 Expression (Chakravorty et al., 2007). In dieser Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung des Integrins ausschließlich bei Zellen, welche mit infizierten Erythrozyten bei 40°C ko-inkubiert wurden, festgestellt werden. Es ist daher anzunehmen, dass adhätierende Parasiten nur in einem geringen Maße ICAM-1 induzieren und Fieber wie eine Art „Verstärker“ für diese Eigenschaft ist. Neben ICAM-1 wird VCAM-1 (ein weiterer bekannter PfEMP1-Bindungspartner) unabhängig von der Temperatur als Folge der Zytoadhäsion differentiell erhöht exprimiert. Die Expression von VCAM-1 war bei Patienten, die an einer CM verstarben, im mikrovaskulären Endothelium hochreguliert und daher mit der Pathogenität einer CM eng verknüpft (Armah et al., 2005a; Armah et al., 2005b). Bei der Unterteilung aller NF- $\kappa$ B induzierbaren Gene in verschiedene Klassen fällt auf, dass viele Zytokine und Chemokine infolge der Zytoadhäsion differentiell exprimiert werden. Die Pathogenität einer CM lässt sich nicht ausschließlich mit der Zytoadhäsion von infizierten Erythrozyten und der damit einhergehenden Störung des Blutstroms erklären. So können *P. vivax* Infektionen ebenfalls zum Tod des Patienten führen,

ohne das infizierte Erythrozyten/Retikulozyten an die Endothelzellen in mikrovaskulären Gefäßen binden (Kochar et al., 2005). Da systemische Inflammationen auch in nicht-*Plasmodium* Erkrankungen zu einer Sepsis-assoziierten Enzephalopathie führen, werden Zytokine und Chemokine als zusätzlicher Pathogenitätsfaktor angesehen (Clark et al., 2004). So korrelieren die Schwere einer Malariaerkrankung mit der Dysbalance an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen im Serum von Malariapatienten (Clark et al., 2006; Kunze, 2002; Prakash et al., 2006). Gene, welche für Chemokine aus der *C-C motif* und *C-X-C motif* Familie (CCL20, CCL3, CCL4, CCL5(RANTES), CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL10, CXCL11) kodieren, waren in dieser Arbeit in einem oder mehreren Vergleichen hochreguliert. Diese Ergebnisse bestätigen die Transkriptom-Studien von Chakravorty *et al.* und Tripathi *et al.*, bei denen ebenfalls eine erhöhte Expression vieler der genannten Chemokine infolge von Ko-Kultivierung mit infizierten Erythrozyten nachgewiesen wurde (Chakravorty et al., 2007; Tripathi et al., 2009). Diese Chemokine wirken als Chemoattraktanten auf Leukozyten, welche bei der Lenkung der Immunzellen zum Infektionsherd und Infiltration in das Endothelium eine zentrale Rolle einnehmen. In diesem Zusammenhang konnte die Adhäsion von Leukozyten in mikrovaskulären Gefäßen im Gehirn postmortem bei CM Patienten nachgewiesen werden (Hunt and Grau, 2003). Neben den Chemokinen sind auch bekannte pro-inflammatorische Zytokine (IL1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, LTA, IL12a allerdings nicht TNF- $\alpha$ ) hochreguliert. Wie zuvor bei den Chemokinen, konnten Tripathi *et al.* und Chakravorty *et al.* auch die vermehrte Expression dieser Zytokine nachweisen (Chakravorty et al., 2007; Tripathi et al., 2009). Bisherige Studien, welche die Zytokin-Muster in CM Patienten untersucht haben sind zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen (Dunst et al., 2017). Dies liegt an der Heterogenität der in den Studien einbezogenen Patienten. So variieren diese im Alter und Zeitpunkt während einer Malaria-Infektion. Prakesh *et al.* zeigten, dass in Serum von Kindern mit einer milden Malaria vermehrt IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-5, IL-6 und IL-12 nachweisbar war (Prakash et al., 2006). Dahingegen war das Niveau von TNF-  $\alpha$ , IL-10 und IL-1 $\beta$  in Kindern mit einer CM erhöht. In einer Studie von Thuma *et al.* waren die Konzentration von IL-10, IL-1 $\alpha$  und IL-6 in Patienten mit einer CM erhöht, verglichen mit den Mengen in Patienten mit einer schweren Anämie (Thuma et al., 2011). Die von den Endothelzellen sezernierten Zytokine können autokrin und parakrin wirken und zu einer Aktivierung des Endotheliums führen. So induzieren pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-6 eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers ICAM-1 auf Endothelzellen (Wung

et al., 2005). Da die differentielle Expression der Zytokine bei Ko-Inkubation bei 40°C deutlich höher ausfällt als bei 37°C, könnte dies erklären, warum bei 37°C keine signifikante Veränderung der ICAM-1 Expression zu erkennen war. Neben ICAM-1 werden durch die Zytoadhäsion weitere Oberflächenproteine vermehrt exprimiert. Im Zusammenhang mit der vermehrten Expression der Zytokinen steht die erhöhte Expression der ‚major histocompatibility complex‘ (MHC) Moleküle der Klasse I und II. Endothelzellen sind semi-professionelle antigenpräsentierende Zellen, welche T-Zellen ko-stimulieren und weitere Immunzellen aktivieren können (Razakandrainibe et al., 2012). Bei einer Malariaerkrankung werden die parasitären Antigene auf MHC Molekülen CD8+ T-Zellen präsentiert, welche daraufhin eine Reihe von Zytokinen sezernieren (Razakandrainibe et al., 2012). Dabei ist die Expression der MHC Moleküle selbst von Zytokinen abhängig. MHC Klasse I Moleküle werden in Mäuse nicht exprimiert, bei denen entweder das Gen für INF $\gamma$  oder den IFN- $\gamma$ -Rezeptor deletiert wurden (Goes et al., 1996). So führt auch eine Inhibition der Zytokinproduktion durch Cyclosporine zu einem Verlust der basalen MHC Klasse II Molekül Expression (Groenewegen et al., 1985). Dies erklärt, warum die Expression der MHC Moleküle bei Gehirnendothelzellen, welche bei 40°C mit den Parasiten ko-inkubiert wurden, stärker erhöht ist. Durch Trogozytose-ähnliche Mechanismen, werden nach der Zytoadhäsion Teile der infizierten Erythrozyten von den Endothelzellen aufgenommen und Malaria-Antigene werden über den endosomalen Weg prozessiert (Jambou et al., 2010). Da auch die MHC Moleküle hochreguliert sind, könnte es somit zu einer Antigenpräsentation dieser Malaria-Antigene auf der basalen Oberfläche der Gehirnendothelzellen kommen. Die erhöhte Präsentation der MHC Moleküle auf der Oberfläche der Gehirnendothelzellen könnte mittels Antikörpernachweis in Immunfluoreszenz-Assays nachgewiesen werden. Sofern eine erhöhte Menge an MHC Moleküle nachweisbar ist, könnte dies ein Hinweis auf die Mechanismen der Regulation der Immunantwort während einer *P. falciparum* Infektion sein. Zusätzlich sollten Bindungsstudien durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob infizierte Erythrozyten ebenfalls an MHC Moleküle adhären können.

In einer postmortalen Studie an Gehirnen von 168 Kindern, die an einer CM verstorben waren, wurde herausgefunden, dass die Gehirne der Kinder angeschwollen waren (Seydel et al., 2015). Als Grund für das erhöhte Gehirnvolumen wurde unter anderem angenommen, dass durch die Aktivierung des Endothels die Bluthirnschranke beeinträchtigt wurde und sich so zytotoxischen Ödeme gebildet haben (Seydel et al., 2015). Die Integrität der BHS wird

durch ‚*tight junctions*‘ sichergestellt. Wichtige Proteine sind die ‚*junctional adhesion molecules*‘ (JAMs), Claudine und Occludine (Gillrie and Ho, 2017). Nach der Zytoadhäsion bei 40°C verstärken die Gehirndothelzellen die Expression verschiedener Gene, die Claudine kodieren und von *jam2*. Eine erhöhte Expression dieser Gene, stärkt die ‚*tight junctions*‘ und somit auch die BHS. Diese Beobachtung steht im Kontrast zu den Beobachtungen, dass infizierte Erythrozyten die Integrität der BHS reduzieren (Tripathi et al., 2007). Neben den Genen, welche für Proteine kodieren, die wichtig für die Ausbildung von ‚*tight junctions*‘ sind, werden auch die Gene für die beiden Metallopeptidasen 2 und 9 (*mmp2/9*) hochreguliert. Metallopeptidasen sind Enzyme mit verschiedenen Funktionen. Neben der Degradierung verschiedener Claudine, wird auch die Funktion des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch diese Enzyme inhibiert (Fiore et al., 2002; Ichiyasu et al., 2004; Prato and Giribaldi, 2011). Zusätzlich interagieren Metallopeptidasen auch mit Zytokinen und Chemokine. Die meisten der Zytokine werden degradiert, wohingegen die Funktion von IL-8/CXCL8 potenziert wird (Prato and Giribaldi, 2011; Van den Steen et al., 2000). Aufgrund dieser Eigenschaften wurden die Metallopeptidasen auch im Zusammenhang mit einer CM untersucht. So finden sich im Maus-Modell einer experimentellen CM vermehrt MMP2 mRNA und Protein im Gehirn (Van den Steen et al., 2006). Mittels transendothelial ‚*electrical resistance measurements*‘ (TEER)‘ könnte die Veränderung der Integrität der ‚*tight junctions*‘ nach Zytoadhäsion bei 40°C *in vitro* gemessen werden (Srinivasan et al., 2015). Somit könnte geklärt werden, ob es bei 40°C zu einer Stärkung der ‚*tight junctions*‘, durch verstärkte Expression verschiedener Claudin-Gene und *jam2* kommt oder die verstärkte Expression der *mmp2* und *mmp9* zu einer Schwächung der BHS führt.

NF-κB reguliert ebenfalls Gene, die im Zusammenhang mit der Apoptose der Endothelzellen stehen. NF-κB reguliert Gene, deren kodierten Proteine sowohl pro-apoptotisch, als auch anti-apoptotisch wirken. Zellen, deren NF-κB Aktivität geblockt ist, zeigen eine erhöhte Anfälligkeit zur Apoptose als Folge von DNS-schädigenden Agenzien (Wang et al., 1996). Mit *birc2*, *birc3*, verschiedener *bcl2* Genen, *cd274*, *traf1* und *bcl3* sind Gene in Folge der Zytoadhäsion/Ko-Inkubation in dieser Arbeit differentiell exprimiert, die für Proteine kodieren, die im Zusammenhang mit dem Überleben von Zellen gebracht wurden (Ahmed and Milner, 2009; Chang and Vancurova, 2014; Chen et al., 2016; Grimm et al., 1996; Gyrd-Hansen and Meier, 2010; Irmeler et al., 2000; Vogler, 2012). Die meisten dieser Gene sind eng mit der Aktivierung von NF-κB verknüpft. Allerdings zeigen auch Gene die für pro-

apoptotische Proteine kodieren, wie *ddit3*, *myc* und *Ita*, eine erhöhte Expression. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Zytoadhäsion von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten zum programmierten Zelltod der Endothelzellen führen kann (Pino et al., 2003), doch entwickelt sich eine Gefäßdurchlässigkeit bei Malaria-Patienten oft erst wenige Tage nach Beginn der anti-Malaria Therapie (Horstmann et al., 1985). Dies lässt vermuten, dass es neben der Zytoadhäsion weitere Ursachen für die Apoptose von Endothelzellen während einer *P. falciparum*-Infektion gibt. Die erhöhte Expression der genannten anti-apoptotischen Proteine kodierenden Gene unterstützt diese Annahme. Die verstärkte Expression dieser Gene nach der Zytoadhäsion bei 40°C (im Vergleich zu 37°C) macht deutlich, dass die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Prozessen von diversen Faktoren abhängt. Im Menschen sind die Endothelzellen während einer Malariaerkrankung einem komplexen und dynamischen Zusammenspiel aus mehreren Stimuli ausgesetzt. Dies würden die unterschiedlichen Beobachtungen von Pino et al. (2003) und Horstmann et al. (1985) erklären.

Die Aktivierung von NF-κB nach Zytoadhäsion/Ko-Inkubation mit infizierten Erythrozyten führt zu umfangreichen transkriptionellen Veränderungen in den Gehirndothelzellen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB kann von mehreren verschiedenen extrazellulären und intrazellulären Stimuli induziert werden. Dies erklärt die hohe Anzahl an Signalwegen, welche bei der Stoffwechselweg-Analyse durch die Ko-Inkubation mit infizierten Erythrozyten angesprochen wurden. Bei der Signaltransduktion muss die Bindung von VAR2CSA an CSA nicht zwingend als Ausgangspunkt der Signaltransduktion gelten. Chakravorty und Kollegen konnten zeigen, dass die Ko-Inkubation von HUVEC mit trypsinierten infizierten Erythrozyten ebenfalls zu einer Erhöhung von ICAM-1 auf den Endothelzellen führte (Chakravorty et al., 2007). Eine Aktivierung der Endothelzellen kann somit auch unabhängig von der PfEMP1 Bindung erfolgen.

Der ‚*TNF signaling pathway*‘ führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und durch die erhöhten Mengen an TNF-α in CM Patienten, ist dieser Signalweg wahrscheinlich eng mit der Pathogenität einer *P. falciparum* Infektion verknüpft (Kettelhut et al., 1987; Kinra and Dutta, 2013). Es fällt auf, dass in der vorliegenden Transkriptom-Studie wenig Gene reguliert werden, deren Proteine eine Funktion in der Signalkaskade des ‚*TNF signaling pathway*‘ übernehmen. Es werden hauptsächlich Gene differentiell exprimiert, die durch den

TNFR1 vermittelten TNF Signalweg induziert werden. Es ist daher anzunehmen, dass die TNFR1-vermittelte Signaltransduktion eine zentrale Rolle in der Reaktion der Endothelzellen auf die Zytoadhäsion einnehmen. Jedoch wird das Gen, welches TNF- $\alpha$  kodiert, weder bei 37°C noch bei 40°C, von den Gehirndothelzellen exprimiert. Eine autokrine, beziehungsweise parakrine Stimulation über dieses Zytokin ist daher nicht möglich. Dies lässt die Annahme zu, dass die infizierten Erythrozyten mit TNFR1 und TNFR2 interagieren. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Studie von Esser und Kollegen, welche die Bindung von infizierten Erythrozyten (Feldisolate) an TNFR1 und TNFR2 nachweisen konnten (Esser et al., 2014). Obwohl infolge der Zytoadhäsion/Ko-Inkubation das namensgebende Zytokin TNF- $\alpha$  nicht exprimiert wird, so wird die Expression weiterer Zytokine der TNF-Zytokinfamilie beeinflusst. Lymphotoxin- $\alpha$  interagiert mit dem TNFR2-Rezeptor, welcher ebenfalls zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt (Calmon-Hamaty et al., 2011a, b). Wie stark jedoch der Einfluss von Lymphotoxin- $\alpha$  auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist, ist fraglich. Zum einen wird *Ita* (Lymphotoxin- $\alpha$  kodierendes Gen) ausschließlich nach Zytoadhäsion bei 40°C differentiell exprimiert, eine zentrale Rolle nimmt der ‚*TNF-signaling pathway*‘ in den Endothelzellen allerdings auch nach Zytoadhäsion bei 37°C ein. Zum anderen ist das relative Expressionsniveau von *Ita* sehr niedrig. In einem Folgeexperiment müsste überprüft werden, inwieweit die Konzentration an Lymphotoxin- $\alpha$  im Überstand der Endothelzellen erhöht ist. Eine signifikant erhöhte Menge an Lymphotoxin- $\alpha$  im Überstand würde für eine autokrine und parakrine Induktion des ‚*TNF signaling pathway*‘ über den TNFR2-Rezeptor sprechen.

Die beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 können nach Bindung der Liganden nicht ausschließlich über den ‚*TNF signaling pathway*‘ Signale extrazellulärer Stimuli weiterleiten, sondern sie sind auch in der Lage die Signaltransduktion über den JNK MAPK Signalweg weiterzuleiten (Borghini et al., 2016). Der MAPK Signalweg kann zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen, und ist somit mit dem ‚*NF-kappaB signaling pathway*‘ verknüpft. Bei der Analyse der differentiell exprimierten Gene, die mit dem ‚*MAPK signaling pathway*‘ assoziiert sind, fällt auf, dass mehrere Gruppen von Genen erhöht exprimiert werden. Dazu gehört die Gruppe der ‚*dual specificity phosphatases*‘ (DUSPs), welche immunregulatorische Enzyme sind und durch den MAPK Signalweg induziert werden können (Huang and Tan, 2012). Die differentielle Expression der DUSPs in dieser Arbeit fügt sich in die Beobachtung, dass infolge der Ko-Inkubation vermehrt pro-inflammatorische Zytokine exprimiert werden. *Knock-out* Studien mit Mäusen konnten zeigen, dass DUSP1 und DUSP10 negative Regulatoren in

Immunzellen der angeborenen Immunsystems sind (Huang and Tan, 2012). Eine Überexpression von DUSP4 erhöhte ebenfalls die Expression von *il-6* und *il-12*. Obwohl DUSP4 in dieser Arbeit nicht differentiell exprimiert wird, ist es wahrscheinlich, dass die anderen regulierten DUSPs diese Funktion übernehmen. Typische DUSPs, wie DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5 und DUSP10 sind funktionell sehr ähnlich, sodass angenommen wird, dass die Deletion eines dieser DUSP von den anderen DUSPs kompensiert werden kann (Huang and Tan, 2012). DUSPs sind somit wichtig als Feinregulatoren der Immunantwort. Das *fibroblast growth factor 2* (*fgf2*) Gen wird nach Zytoadhäsion unabhängig von der Temperatur hochreguliert. FGF2 ist ein starker pro-angiogenetischer Wachstumsfaktor, der in Endothelzellen die Expression von Genen induziert, die im Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Zelladhäsion, anti-apoptotischen Prozessen und der Angiogenese regulatorische Funktionen übernehmen (Akl et al., 2016; Dell'Era et al., 2002). FGF2 induziert auch die *growth arrested DNA-damage 45* (*gadd45*) Gene (Dell'Era et al., 2002). Diese werden durch Stressfaktoren, wie beschädigter DNS induziert und bewirken, dass der Zellzyklus gestoppt wird (Liebermann and Hoffman, 2008). Es zeigt sich also, ähnlich wie zuvor bei den pro- und anti-apoptotischen Genen, dass in den Endothelzellen eine Balance zwischen Genen mit gegensätzlichen Funktionen besteht. Auch hier nehmen extrazelluläre Faktoren, wie Fieber, Einfluss auf diese Balance. Bisher konnte nur in einer Studie gezeigt werden, dass eine *Plasmodium*-Infektion die Angiogenese von Endothelzellen beeinflusst. Yang und Kollegen beobachteten, dass Exosomen aus *Plasmodium*-infizierten Mäusen, die Expression der VEGFR2 kodierenden Gens inhibieren (Yang et al., 2017). VEGFR2 ist ein Rezeptor für VEGF, einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren, der Zellproliferation und Angiogenese-Prozesse induziert (Claesson-Welsh and Welsh, 2013). Eine Überexpression von *fgf2*, wie in dieser Arbeit beobachtet, könnte ein Mechanismus sein, die VEGFR2 Deletion zu kompensieren. Ein Experiment, wie der *Tube Formation Assay*, könnte klären, ob die erhöhte Expression von *fgf2* (oder weitere Wachstumsfaktoren) nach der Zytoadhäsion von infizierten Erythrozyten in den Gehirndothelzellen zu angiogenetischen Prozessen führen (DeCicco-Skinner et al., 2014).

Eine weitere Gruppe an Genen, die differentiell exprimiert werden und mit dem *MAPK signaling pathway* assoziiert sind, sind Gene deren Proteine spannungsabhängige Kalzium-Kanäle bilden. Kalzium ist in der Zelle an vielen biologischen Prozessen beteiligt. Je nach Lokalisation und Konzentration beeinflusst Kalzium die Zellproliferation, sowie die Aktivierung und Inaktivierung verschiedener intrazellulärer Enzyme (Phan et al., 2017). Die

Expression von Kalziumkanälen kann zu einer Potenzierung dieser Prozesse und somit auch zur Apoptose führen (Panner and Wurster, 2006). Es wurde beobachtet, dass in Tumorzellen die Expression von Kalziumkanälen niedrig ist (Phan et al., 2017). Eine erhöhte Expression verschiedener Untereinheiten von spannungsabhängigen Kalziumkanälen könnte somit die Konzentration an Kalzium in den Gehirndothelzellen nach der Zytoadhäsion verändern und die oben genannten Prozesse verstärken. Von Interesse ist auch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS). Das eNOS-Gen (*nos3*) wird konstitutiv vom vaskulären Endothelium exprimiert und zeigt keine veränderte Expression nach der Zytoadhäsion bei 37°C und 40°C. Die Aktivierung des eNOS-Enzyms wird unter anderem über Kalzium-Ionen reguliert (Fleming, 2010). NO im Endothelium nimmt Einfluss auf diverse biologische Prozesse, darunter die Regulation des Zellwachstums und schützt vor Gefäßverletzungen durch Blutplättchen oder andere im Blut zirkulierende Zellen (Tousoulis et al., 2012). Im Zusammenhang mit einer Malaria-Infektion fanden Dhangadamajhi und Kollegen heraus, dass gewisse Polymorphismen des eNOS kodierenden Gens gegen eine CM schützen und dass gleichzeitig die Konzentration an NO im Plasma der Patienten mit diesen Polymorphismen erhöht war (Dhangadamajhi et al., 2009). Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Aktivität der eNOS und somit die NO-Produktion Einfluss auf die Pathogenität einer *P. falciparum*-Infektion hat. Durch Messen der NO-Konzentration im Überstand der Gehirndothelzellen mittels Griess-Assay und gleichzeitiger Inhibitionen der weiteren NOS-Isoformen, kann untersucht werden, ob die Zytoadhäsion bei 37°C und/oder 40°C die Aktivität der eNOS verändert. Eine Aktivierung der eNOS über eine erhöhte Expression von Kalziumkanälen durch adhärierende infizierte Erythrozyten, stellt ein bisher noch nicht beachteter Mechanismus dar, der vor einer CM schützen könnte und unabhängig von dem genetischen Hintergrund des Patienten ist. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die transkriptionellen Veränderungen induziert durch die Zytoadhäsion/Ko-Inkubation durch eine erhöhte Temperatur verstärkt werden. Besonders deutlich fällt dies bei den ‚heat shock proteins‘ auf. So werden die Gene *hspa1a* und *hspa1b* unabhängig von der Temperatur erhöht exprimiert, doch ist die Expression nach Zytoadhäsion bei 40°C um den Faktor 44 (bezogen auf die Zytoadhäsion 37°C, Vergleich 4 und 5, Tabelle 13) erhöht. HSPA1A und HSPA1B gehören zu der Proteinfamilie Hsp70, welche an der Faltung diverser Proteine unter normalen und Stress-Bedingungen beteiligt ist (Gurskiy et al., 2016). HSPA1A ist ein Protein, welches in der Zelle unter Stress-Bedingungen ungefaltete Proteine beim

Umfallen unterstützt, oder für die Degradation des Proteins sorgt (Duncan et al., 2015). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass Hsp70 Proteine eine Zytokin-ähnliche Funktion haben und von neuronalen und inflammatorischen Zellen in Folge von Stress sezerniert werden können (Asea et al., 2000; Calderwood et al., 2007). Auf anderen Immunzellen können Hsp70 Proteine an Scavenger und TLR2 und 4 binden (Asea, 2008; Ghosh et al., 2015). Sofern Endothelzellen nach der Zytoadhäsion Hsp70 Proteine sezernieren, könnten diese regulatorisch auf andere Immunzellen *in vivo* wirken und die Immunantwort infolge der Zytoadhäsion beeinflussen. Mit einem ELISA könnten die unterschiedlichen Hsp70 Proteine im Überstand der Gehirndothelzellen gemessen werden. Ein positives Ergebnis würde einen bisher unentdeckten immunoregulatorischen Mechanismus während einer CM identifizieren, der Einfluss auf die Pathogenität einer Malaria-Infektion nimmt.

Endothelzellen werden zu den Immunzellen des angeborenen Immunsystems gezählt. Als solche besitzen sie ‚*pattern recognition receptoren*‘ (PPRs), die pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen. TLRs und NOD-like Rezeptoren sind PPRs, die auch von Endothelzellen exprimiert werden und deren Bindung zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt (Carmody and Chen, 2007; Kim et al., 2016). Bei der *Plasmodium*-Infektionen nehmen der TLR7 und TLR9 eine zentrale Rolle ein. TLR9 ist in den Lysosomen lokalisiert und erkennt an Hämozoin gebundene parasitäre DNS (Ahmad-Nejad et al., 2002; Coban et al., 2005). Die Transkriptom-Daten zeigen, dass dieser Rezeptor nach Zytoadhäsion bei 40°C hochreguliert wird. In großen Mengen wird Hämozoin beim Platzen der infizierten Erythrozyten am Ende des intraerythrozytären Replikationszyklus frei. In dem experimentellen Aufbau dieser Studie wird die Ko-Inkubation der Gehirndothelzellen mit den infizierten Erythrozyten allerdings vor dem Platzen der Wirtszelle abgebrochen. Eine, durch die Ruptur der infizierten Erythrozyten induzierte Aktivierung der Gehirndothelzellen kann daher ausgeschlossen werden. Es ist wahrscheinlicher, dass Teile von den infizierten Erythrozyten durch Trogozytose von den Endothelzellen aufgenommen werden (Jambou et al., 2010; Utter et al., 2017). Das trogozytierte Hämozoin könnte an TLR9 binden und zu einer Aktivierung der Endothelzelle beitragen. Es muss allerdings angemerkt werden, dass die transkriptionelle Veränderung des *tlr9*-Gens bei sehr niedrigen relativen Transkriptzahlen stattfindet. Mittels Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenz-Assay könnte allerdings ohne großen Aufwand geklärt werden, ob die Zytoadhäsion bei 40°C zu einer erhöhten Menge an TLR9 in den Lysosomen führt. Somit könnte ein weiterer

Mechanismus der Induktion der Immunantwort identifiziert werden. NOD-like Rezeptoren sind PRRs die sich im Zytosol der Endothelzellen befinden. In Übereinstimmung mit den Transkriptom-Daten aus dieser Arbeit, ist in experimentellen CM (ECM) in Mäusen die Expression von *nlrp3* ebenfalls erhöht (Reimer et al., 2010). Der NOD-like Rezeptor NLRP3 bildet normalerweise ein Multi-Enzymkomplex, welcher die Caspase-1 aktiviert und anschließend pro-IL1 $\beta$  spaltet und aktiviert (Franchi et al., 2009). Allerdings scheint NLRP3 unabhängig vom Inflammasom während einer ECM zu wirken, da eine Deletion der Proteine des Multienzym-Komplexes keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen (Reimer et al., 2010). Inwieweit NLRP3 in der Gehirndothelzellen unabhängig von dem Inflammasom wirkt, müsste im Anschluss dieser Arbeit noch gezeigt werden. Weitere differentiell exprimierte Gene, welche mit dem ‚*NOD-like signaling pathway*‘ assoziiert sind, sind *hsp90aa1* und *hsp90ab1*, welche die HSP90 Isoformen HSP90a und HSP90b kodieren. Beide Isoformen interagieren mit ca. 10% des eukaryotischen Proteoms, was in etwa 2.000 Interaktionspartnern entspricht (Zuehlke et al., 2015). Hauptsächlich interagieren die HSP90 Proteine mit Transkriptionsfaktoren, Kinasen und E3-Ligasen (Taipale et al., 2014). Die erhöhte Transkription der HSP90 Isoformen passt somit in das bisherige Bild, dass die Zytoadhäsion weitreichende Veränderungen in den Gehirndothelzellen über verschiedene Signalwege induziert. Über eine genaue Funktion der HSP90 Proteine kann, aufgrund der Vielzahl an Interaktionspartnern, allerdings nicht spekuliert werden.

Ein weiterer Signalwege, der nach der Zytoadhäsion in den Gehirndothelzellen angesprochen wird, ist der ‚*TGF-beta signaling pathway*‘. Bei diesem Signalwegen handelt es sich um Signalwege, der wichtig für die Zellproliferation und Regulation der Immunantwort ist (Travis and Sheppard, 2014). So werden nach der Zytoadhäsion der infizierten Erythrozyten mehrere Gene erhöht exprimiert, die Wachstumsfaktoren der BMP-Proteinfamilie kodieren. Mit *nog* und *bambi* werden allerdings auch Gene exprimiert, deren Proteine die Bindung von BMPs an die entsprechenden Rezeptoren verhindert, beziehungsweise die Signaltransduktion vieler Mitglieder der TGF-beta Molekülfamilie inhibiert (Onichtchouk et al., 1999; Zimmerman et al., 1996). Wie bei den Signalwegen zuvor zeigen die Zellen wieder eine scheinbar gegensätzliche Genexpression. Allerdings werden Gene, wie *bambi*, erst nach Stimulation der Zelle mit BMPs exprimiert und dienen als negative Rückkopplung (engl. *negative feedback*) mit dem Ziel den TGF-beta Signalweg zu

regulieren. Die regulatorischen Mechanismen sind, wie zuvor in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, durch die Fieber beeinflussbar.

#### 4.4 Stimulation der Gehirndothelzellen durch Patienten-Plasma

Die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B führen zu einer Reihe transkriptioneller Veränderungen, welche die verstärkte Expression von sekretorischen Signalmolekülen, wie die proinflammatorische Zytokine IL1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, Lymphotoxin- $\alpha$  und IL12a, beinhalten. Dies bestätigen viele der oben genannten Studien, die eine erhöhte Menge an proinflammatorischen Zytokinen in Patienten mit einer *P. falciparum* Infektion nachweisen konnten (Prakash et al., 2006; Thuma et al., 2011). Nachdem die Zytokine in den Blutstrom sezerniert wurden, wirken diese autokrin, beziehungsweise parakrin, auf angrenzende Endothelzellen. Aus diesem Grund wurden die Effekte von Patienten-Plasmen aus Malariapatienten auf die Gehirndothelzellen *in vitro* untersucht. Die in dieser Arbeit einbezogenen Patienten weisen ein hohes Maß an Heterogenität auf. So unterscheiden sie sich im Geschlecht, Nationalität (Hinweis auf ethnische Herkunft), Parasitämie und Malaria-Vorerkrankungen. Ebenfalls wurden die Patienten-Plasmen unterschiedlich lange gelagert. Die Haltbarkeit von Zytokinen ist zeitlich begrenzt. Je länger Patienten-Plasmen, beziehungsweise die darin enthaltenen Zytokine, gelagert werden, desto stärker nehmen die Konzentrationen und der Effekt auf die Endothelzellen ab. Dies zusammengenommen würde erklären, warum die differentielle Expression von Genen in den Gehirndothelzellen stark voneinander abweichen. Um aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen müssten die Heterogenität in Lagerung und Herkunft minimiert werden. Zusätzlich müssten deutlich mehr Patienten-Plasmen in eine Transkriptions-Studie mit einbezogen werden. Im Idealfall würden Blutproben des Patienten vor, während und nach überstandener Malariaerkrankung genommen werden.

Die Zuordnung der differentiell exprimierten Gene des Patienten-Plasmas 3 in GO-Terme für biologische Prozesse zeigte, dass sehr ähnliche Prozesse durch Signalmoleküle im Patienten-Plasma induziert werden, wie zuvor durch die Zytoadhäsion. So reagieren die Endothelzellen auf die Exposition mit dem Plasma mit einer Immunantwort aber auch apoptotischen Prozessen und Angiogenese. Die Anzahl der Gene ist allerdings deutlich geringer. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass auch die Signalmoleküle in Patienten-Plasma die biologischen Prozesse, welche durch die Zytoadhäsion induziert werden, unterstützen.

Ähnlich wie bei Fieber können diese den Effekt der Zytoadhäsion verstärken und die regulatorischen Mechanismen in der Zelle beeinflussen. In diesem Zusammenhang müsste eine Transkriptom-Analyse von Gehirndothelzellen durchgeführt werden, welche mit gleichzeitig mit den drei Stimuli (Zytoadhäsion, Fieber, Patienten-Plasma) durchgeführt werden und mit den transkriptionellen Veränderungen in dieser Arbeit verglichen werden.

#### 4.5 Fazit

Fieber ist das am meisten vorkommende Symptom einer Malariaerkrankung. Eine Reduktion des Fiebers hat sowohl Vor- als auch Nachteile für den Patienten. Zum einen erhöht Fieber das Risiko eines Krampfanfalls (Waruiru et al., 1996). Ebenfalls führt eine Behandlung mit fiebersenkenden Medikamenten, wie Paracetamol, zu einer verlangsamten Bekämpfung der Parasiten, da die Produktion von TNF- $\alpha$  und reaktive Sauerstoffspezies reduziert wird (Brandts et al., 1997). Zum anderen verlangsamen erhöhte Temperaturen das Wachstum der Parasiten und kann zum verstärkten Sterben der Parasiten führen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Fieber sowohl Eigenschaften der Endothelzellen als auch der Parasiten verändert. Diese Veränderungen nehmen dabei Einfluss auf die Pathogenität einer *P. falciparum* Infektion, beziehungsweise einer CM. Auf Seiten der Parasiten verstärkt die Ko-Inkubation mit den Endothelzellen bei 40°C die Expression der *var*-Gene, was zu einer vermehrten Präsentation von PfEMP1 Proteinen auf der Zelloberfläche führt. Dabei wird die Bildung sogenannter Knob-Strukturen induziert. Beides erhöht die Bindungsaffinität der Parasiten zu den Gehirndothelzellen, was zu einer stärkeren Blockade des Blutflusses in den mikrovaskulären Gefäßen des Gehirns führt. Auch auf die Frage, ob die Zytoadhäsion im Gehirn der einzige Pathogenitätsfaktor ist gibt diese Arbeit eine vorsichtige Antwort. Auf Seiten der Endothelzellen führt die Zytoadhäsion zu weitreichenden transkriptionellen Veränderungen. Durch Fieber werden diese Veränderungen jedoch deutlich verstärkt. Die Expression von Adhäsionsmolekülen, diverser Zytokine und Chemokine sowie regulatorischen Genen ist bei Kombination der beiden Stimuli deutlich stärker. Wie zuvor bei anderen Transkriptom-Studien, konnte auch hier gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B dabei eine zentrale Funktion einnimmt. Zum ersten Mal konnten in dieser Arbeit Hinweise entdeckt werden, welche Signalwege zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren führen. Neben der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch den ‚*TNF signaling pathway*‘ und ‚*MAPK signaling pathway*‘ konnte gezeigt werden, dass parasitäre Antigene von TLR9 erkannt und so zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren führen könnten.

Das eine erhöhte Expression und daraus resultierende Sekretion der Genprodukte ebenfalls Einfluss auf die Pathogenität eine *P. falciparum* Infektion nehmen, zeigen die transkriptionellen Veränderungen, welche durch die Patienten-Plasmen induziert wurden. Pro- und anti-apoptotische Prozesse, sowie Angiogenese und damit verknüpfte Zellproliferation, aber auch die Expression von HSPs, zeigen eine Vielzahl an Events in den Gehirndothelzellen nach Zytoadhäsion der infizierten Erythrozyten. Diese werden allesamt durch Fieber verstärkt und können die Pathogenität während einer CM entscheidend beeinflussen. Die Zytoadhäsion ist vielleicht der Auslöser der pathogenen Vorgänge während einer CM.

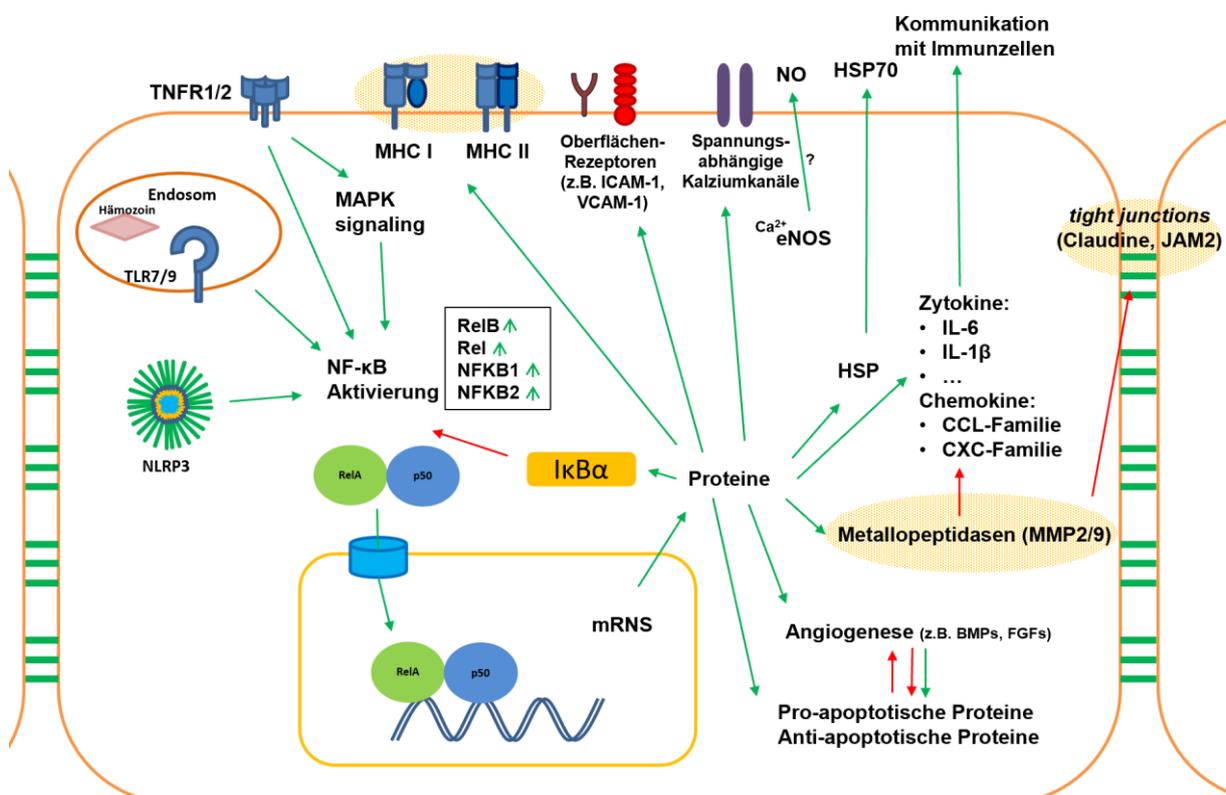


Abb. 18: Veränderungen in der Zelle infolge der Zytoadhäsion bei 37°C und 40°C. Unabhängig von der Temperatur führt die Zytoadhäsion zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB. Anhand der Transkriptom-Daten wird angenommen, dass die Aktivierung über einen oder mehreren der folgenden Signalwege induziert wird: ‚TNF signaling pathway‘, ‚MAPK signaling pathway‘, ‚Toll-like signaling pathway‘, ‚NOD-like signaling pathway‘. Die Aktivierung von NF-κB führt ebenfalls zu einer weitreichenden Veränderung in der Genexpression. Die verstärkte Expression der Gene und die vermeintlich höheren Mengen der Genprodukte beeinflussen verschiedene Prozesse in der Gehirndothelzelle. So werden Gene diverser Zytokine, Chemokine und HSPs verstärkt exprimiert, welche die Immunantwort beeinflussen. In diesem Zusammenhang werden Gene, die für Adhäsionsmoleküle exprimieren vermehrt exprimiert. Ebenso werden Gene verstärkt exprimiert, deren Proteine eine Funktionen in pro- und anti-apoptotischen Prozessen, sowie in der Angiogenese übernehmen. Bei 40°C fällt die differentielle Expression der Genannten Vorgänge stärker aus. Zusätzlich werden bei 40°C noch Gene exprimiert, welche für die Antigenpräsentation eine Wichtige Rolle spielen (HLA-Gene/MHC-Proteine). Zusätzlich wird die Expression verschiedener Claudine und jam2 verstärkt. Deren Genprodukte sorgen für eine Verstärkung der tight junctions. Als Gegenspieler der tight junctions können die Metalloproteinasen 2/9 gesehen werden, deren Expression nach der Zytoadhäsion bei 40°C ebenfalls erhöht ist. An dieser Stelle ist erneut darauf hinzuweisen, dass es sich hierbei um eine Transkriptom-Studie handelt. Alle

*Veränderungen auf RNS-Ebene müssen noch auf Protein-Ebene bewiesen werden. (Grüne Pfeile= positiver Einfluss; rote Pfeile= negative Einfluss; orange Wolke= ausschließlich bei 40°C verstärkt exprimiert).*

Doch konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass weitere Faktoren, wie Fieber und Signalmoleküle im Plasma die pathogenen Vorgänge potenzieren und somit mitverantwortlich für den fatalen Krankheitsverlauf einer CM sind.

## Anhang

Der Anhang zu dieser Arbeit befindet sich auf der beigelegten CD.

Folgende Transkriptom-Listen sind dort hinterlegt:

### Transkriptom-Tabellen der Parasiten

1. Tabelle Transkriptom Vergleich *var*-Gene
2. Tabelle Transkriptom Vergleich IT4-NE/IT4-EC37
3. Tabelle Transkriptom Vergleich IT4-NE/IT4-EC40
4. Tabelle Transkriptom Vergleich IT4-EC-37/IT4-EC40

### Transkriptom-Tabellen der Gehirndothelzellen

1. Transkriptom Vergleich 1
2. Transkriptom Vergleich 2
3. Transkriptom Vergleich 4
4. Transkriptom Vergleich 5
5. Transkriptom Vergleich 7
6. Effekt Patienten-Plasma 1
7. Effekt Patienten-Plasma 2
8. Effekt Patienten-Plasma 3
9. Effekt aller Patienten-Plasmen

## Danksagung

Auch wenn auf dieser Arbeit mein Name steht, wäre die Vollendung dieser Arbeit nicht alleine möglich gewesen. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei allen danken, die bei dem Gelingen dieser Arbeit geholfen haben.

Mein größter Dank gilt **Prof. Dr. Iris Bruchhaus**. Vielen Dank für deine großartige Betreuung und für alles was du mir beigebracht hast. Ich kann mir keine bessere Doktor Mutter vorstellen.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger**, der die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen hat. Ebenso möchte ich mich bei **Prof. Dr. Esther Schnettler** bedanken, die als dritte Gutachterin meine Arbeit betreut.

Danke auch an meine beiden Co-Betreuer **PD Dr. Thomas Jacobs** und **Dr. Ralf Krumpkamp**, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mit weitergeholfen haben, wenn ich einmal nicht weiterwusste.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der AG Protozoologie am BNITM.

Besonders hervorheben möchte **Finn Fürstenwerth** der mich bei meiner Arbeit wunderbar unterstützt hat und immer über Politik geredet hat, wenn ich die Parasiten nicht mehr sehen konnte.

Ebenso ein dickes Dankeschön an **Susann Ofori**, die mir durch Arbeit geholfen hat und dies immer mit einem Lächeln im Gesicht. ;)

Bedanken möchte ich mich auch bei **Lisa Roth**, **Michaela Sauer** und **Vincent Jordan**, die Experimente in dieser Arbeit übernommen haben. Vielen Dank.

Im speziellen möchte ich mich bei **Dr. Matrin Meyer** und **Torben Rehn** bedanken, die im Labor 4 mir immer im Rücken saßen und meine Stimmung auch nach missglückten Experimenten gehoben haben. Und natürlich für ausschließlich fachbezogene Diskussionen in den Kaffeepausen. ;)

Und wo wir gerade bei Kaffeepausen sind, komme ich gar nicht daran vorbei mich bei **Dr. Pedro Lubiana** und **Dr. Nahla Metwally** zu bedanken. Ihr seid nicht nur Kollegen sondern gute Freunde.

Vergessen darf ich aber auch nicht meine wunderbare Freundin **Alke Bartels**, ohne die ich gar nicht auf die Idee gekommen wäre in Hamburg meine Doktorarbeit zu schreiben. Ich danke dir, dass du immer für mich da warst und mein Gemecker über die *Plasmodien* und Endothelzellen stoisch über dich hast ergehen lassen.

Bedanken will ich mich auch bei meiner Familie, die mich während der letzten 8 Jahre Studium immer unterstützt haben und mir mein Studium überhaupt erst möglich gemacht haben.

## Literaturverzeichnis

- Acharya, P., Chaubey, S., Grover, M., Tatu, U., 2012. An exported heat shock protein 40 associates with pathogenesis-related knobs in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *PLoS one* 7, e44605.
- Adams, Y., Kuhnrae, P., Higgins, M.K., Ghumra, A., Rowe, J.A., 2014. Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind to human brain microvascular endothelial cells in vitro, demonstrating a dual adhesion phenotype mediated by distinct *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domains. *Infection and immunity* 82, 949-959.
- Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.M., Wagner, H., 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *European journal of immunology* 32, 1958-1968.
- Ahmed, S.U., Milner, J., 2009. Basal cancer cell survival involves JNK2 suppression of a novel JNK1/c-Jun/Bcl-3 apoptotic network. *PLoS one* 4, e7305.
- Akl, M.R., Nagpal, P., Ayoub, N.M., Tai, B., Prabhu, S.A., Capac, C.M., Gliksman, M., Goy, A., Suh, K.S., 2016. Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. *Oncotarget* 7, 44735-44762.
- Alampalli, S.V., Grover, M., Chandran, S., Tatu, U., Acharya, P., 2018. Proteome and Structural Organization of the Knob Complex on the Surface of the *Plasmodium* Infected Red Blood Cell. *Proteomics. Clinical applications* 12, e1600177.
- Almelli, T., Ndam, N.T., Ezimegnon, S., Alao, M.J., Ahouansou, C., Sagbo, G., Amoussou, A., Deloron, P., Tahar, R., 2014. Cytoadherence phenotype of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is associated with specific pfemp-1 expression in parasites from children with cerebral malaria. *Malaria journal* 13, 333.
- Aly, A.S., Vaughan, A.M., Kappe, S.H., 2009. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annual review of microbiology* 63, 195-221.
- Anders, S., Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11, R106.
- Armah, H., Doodoo, A.K., Wiredu, E.K., Stiles, J.K., Adjei, A.A., Gyasi, R.K., Tettey, Y., 2005a. High-level cerebellar expression of cytokines and adhesion molecules in fatal, paediatric, cerebral malaria. *Annals of tropical medicine and parasitology* 99, 629-647.
- Armah, H., Wiredu, E.K., Doodoo, A.K., Adjei, A.A., Tettey, Y., Gyasi, R., 2005b. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *International journal of environmental research and public health* 2, 123-131.
- Asea, A., 2008. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handbook of experimental pharmacology*, 111-127.
- Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C., Calderwood, S.K., 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature medicine* 6, 435-442.
- Avril, M., Bernabeu, M., Benjamin, M., Brazier, A.J., Smith, J.D., 2016. Interaction between Endothelial Protein C Receptor and Intercellular Adhesion Molecule 1 to Mediate Binding of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes to Endothelial Cells. *mBio* 7.
- Avril, M., Tripathi, A.K., Brazier, A.J., Andisi, C., Janes, J.H., Soma, V.L., Sullivan, D.J., Jr., Bull, P.C., Stins, M.F., Smith, J.D., 2012. A restricted subset of var genes mediates adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to brain endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E1782-1790.
- Awandare, G.A., Goka, B., Boeuf, P., Tetteh, J.K., Kurtzhals, J.A., Behr, C., Akanmori, B.D., 2006. Increased levels of inflammatory mediators in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria with respiratory distress. *The Journal of infectious diseases* 194, 1438-1446.

- Ayimba, E., Hegewald, J., Segbena, A.Y., Gantin, R.G., Lechner, C.J., Agosssou, A., Banla, M., Soboslay, P.T., 2011. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical and experimental immunology* 166, 218-226.
- Aziz, N., Detels, R., Quint, J.J., Li, Q., Gjertson, D., Butch, A.W., 2016. Stability of cytokines, chemokines and soluble activation markers in unprocessed blood stored under different conditions. *Cytokine* 84, 17-24.
- Baccarella, A., Fontana, M.F., Chen, E.C., Kim, C.C., 2013. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. *Infection and immunity* 81, 4431-4442.
- Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A.B., Jr., van Rooijen, N., Schnieder, T., Frevert, U., 2007. Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cellular microbiology* 9, 397-412.
- Baeuerle, P.A., Henkel, T., 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual review of immunology* 12, 141-179.
- Banfi, G., Salvagno, G.L., Lippi, G., 2007. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 45, 565-576.
- Bartoloni, A., Zammarchi, L., 2012. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 4, e2012026.
- Beeson, J.G., Brown, G.V., Molyneux, M.E., Mhango, C., Dzinjalama, F., Rogerson, S.J., 1999. *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *The Journal of infectious diseases* 180, 464-472.
- Beeson, J.G., Mann, E.J., Elliott, S.R., Lema, V.M., Tadesse, E., Molyneux, M.E., Brown, G.V., Rogerson, S.J., 2004. Antibodies to variant surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and adhesion inhibitory antibodies are associated with placental malaria and have overlapping and distinct targets. *The Journal of infectious diseases* 189, 540-551.
- Beg, A.A., Baldwin, A.S., Jr., 1993. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & development* 7, 2064-2070.
- Bengtsson, A., Joergensen, L., Rask, T.S., Olsen, R.W., Andersen, M.A., Turner, L., Theander, T.G., Hviid, L., Higgins, M.K., Craig, A., Brown, A., Jensen, A.T., 2013. A novel domain cassette identifies *Plasmodium falciparum* PfEMP1 proteins binding ICAM-1 and is a target of cross-reactive, adhesion-inhibitory antibodies. *Journal of immunology* 190, 240-249.
- Berendt, A.R., Simmons, D.L., Tansey, J., Newbold, C.I., Marsh, K., 1989. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 341, 57-59.
- Besson-Fournier, C., Latour, C., Kautz, L., Bertrand, J., Ganz, T., Roth, M.P., Coppin, H., 2012. Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* 120, 431-439.
- Biggs, B.A., Gooze, L., Wycherley, K., Wilkinson, D., Boyd, A.W., Forsyth, K.P., Edelman, L., Brown, G.V., Leech, J.H., 1990. Knob-independent cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to the leukocyte differentiation antigen CD36. *The Journal of experimental medicine* 171, 1883-1892.
- Biggs, B.A., Kemp, D.J., Brown, G.V., 1989. Subtelomeric chromosome deletions in field isolates of *Plasmodium falciparum* and their relationship to loss of cytoadherence in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2428-2432.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.
- Borghi, A., Verstrepen, L., Beyaert, R., 2016. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF-kappaB, MAP kinases and cell death. *Biochemical pharmacology* 116, 1-10.

- Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K., Siebenlist, U., 1993. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72, 729-739.
- Brandts, C.H., Ndjave, M., Graninger, W., Kremsner, P.G., 1997. Effect of paracetamol on parasite clearance time in *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 350, 704-709.
- Brennan, K., Offiah, G., McSherry, E.A., Hopkins, A.M., 2010. Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 460607.
- Brown, M.D., Wick, T.M., Eckman, J.R., 2001. Activation of vascular endothelial cell adhesion molecule expression by sickle blood cells. *Pediatric pathology & molecular medicine* 20, 47-72.
- Calderwood, S.K., Mambula, S.S., Gray, P.J., Jr., Theriault, J.R., 2007. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS letters* 581, 3689-3694.
- Calmon-Hamaty, F., Combe, B., Hahne, M., Morel, J., 2011a. Lymphotoxin alpha revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 13, 232.
- Calmon-Hamaty, F., Combe, B., Hahne, M., Morel, J., 2011b. Lymphotoxin alpha stimulates proliferation and pro-inflammatory cytokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Cytokine* 53, 207-214.
- Cardoso, F.L., Brites, D., Brito, M.A., 2010. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain research reviews* 64, 328-363.
- Carmody, R.J., Chen, Y.H., 2007. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cellular & molecular immunology* 4, 31-41.
- Chaiyaroj, S.C., Angkasekwinai, P., Buranakiti, A., Looareesuwan, S., Rogerson, S.J., Brown, G.V., 1996. Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand: evidence for chondroitin sulfate a as a cytoadherence receptor. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 55, 76-80.
- Chakravorty, S.J., Carret, C., Nash, G.B., Ivans, A., Szeszak, T., Craig, A.G., 2007. Altered phenotype and gene transcription in endothelial cells, induced by *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells: pathogenic or protective? *International journal for parasitology* 37, 975-987.
- Chang, T.P., Vancurova, I., 2014. Bcl3 regulates pro-survival and pro-inflammatory gene expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 2620-2630.
- Chen, J., Jiang, C.C., Jin, L., Zhang, X.D., 2016. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 27, 409-416.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-159.
- Claessens, A., Adams, Y., Ghumra, A., Lindergard, G., Buchan, C.C., Andisi, C., Bull, P.C., Mok, S., Gupta, A.P., Wang, C.W., Turner, L., Arman, M., Raza, A., Bozdech, Z., Rowe, J.A., 2012. A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E1772-1781.
- Claesson-Welsh, L., Welsh, M., 2013. VEGFA and tumour angiogenesis. *Journal of internal medicine* 273, 114-127.
- Clark, I.A., Alleva, L.M., Mills, A.C., Cowden, W.B., 2004. Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clinical microbiology reviews* 17, 509-539, table of contents.
- Clark, I.A., Budd, A.C., Alleva, L.M., Cowden, W.B., 2006. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria journal* 5, 85.
- Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., Akira, S., 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of experimental medicine* 201, 19-25.
- Conway, E.M., Liu, L., Nowakowski, B., Steiner-Mosonyi, M., Jackman, R.W., 1994. Heat shock of vascular endothelial cells induces an up-regulatory transcriptional response of the

- thrombomodulin gene that is delayed in onset and does not attenuate. *The Journal of biological chemistry* 269, 22804-22810.
- Cowman, A.F., Berry, D., Baum, J., 2012. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *The Journal of cell biology* 198, 961-971.
- Cowman, A.F., Crabb, B.S., 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124, 755-766.
- Cowman, A.F., Healer, J., Marapana, D., Marsh, K., 2016. Malaria: Biology and Disease. *Cell* 167, 610-624.
- Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., Wickham, M.E., Brown, G.V., Coppel, R.L., Cowman, A.F., 1997. Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* 89, 287-296.
- Culvenor, J.G., Langford, C.J., Crewther, P.E., Saint, R.B., Coppel, R.L., Kemp, D.J., Anders, R.F., Brown, G.V., 1987. Plasmodium falciparum: identification and localization of a knob protein antigen expressed by a cDNA clone. *Experimental parasitology* 63, 58-67.
- Cunningham, D.A., Lin, J.W., Brugat, T., Jarra, W., Tumwine, I., Kushinga, G., Ramesar, J., Franke-Fayard, B., Langhorne, J., 2017. ICAM-1 is a key receptor mediating cytoadherence and pathology in the Plasmodium chabaudi malaria model. *Malaria journal* 16, 185.
- Cunnington, A.J., Riley, E.M., Walther, M., 2013. Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. *Trends in parasitology* 29, 585-592.
- Dahlback, M., Jorgensen, L.M., Nielsen, M.A., Clausen, T.M., Ditlev, S.B., Resende, M., Pinto, V.V., Arnot, D.E., Theander, T.G., Salanti, A., 2011. The chondroitin sulfate A-binding site of the VAR2CSA protein involves multiple N-terminal domains. *The Journal of biological chemistry* 286, 15908-15917.
- Dai, L., Aye Thu, C., Liu, X.Y., Xi, J., Cheung, P.C., 2012. TAK1, more than just innate immunity. *IUBMB life* 64, 825-834.
- de Jager, W., Bourcier, K., Rijkers, G.T., Prakken, B.J., Seyfert-Margolis, V., 2009. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC immunology* 10, 52.
- DeCicco-Skinner, K.L., Henry, G.H., Cataisson, C., Tabib, T., Gwilliam, J.C., Watson, N.J., Bullwinkle, E.M., Falkenburg, L., O'Neill, R.C., Morin, A., Wiest, J.S., 2014. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e51312.
- Del Portillo, H.A., Ferrer, M., Brugat, T., Martin-Jaular, L., Langhorne, J., Lacerda, M.V., 2012. The role of the spleen in malaria. *Cellular microbiology* 14, 343-355.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., Karin, M., 1999. Positive and negative regulation of I $\kappa$ B kinase activity through IKK $\beta$  subunit phosphorylation. *Science* 284, 309-313.
- Dell'Era, P., Coco, L., Ronca, R., Sennino, B., Presta, M., 2002. Gene expression profile in fibroblast growth factor 2-transformed endothelial cells. *Oncogene* 21, 2433-2440.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., Liu, Z., 2000. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12, 419-429.
- Dhangadamajhi, G., Mohapatra, B.N., Kar, S.K., Ranjit, M., 2009. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and Plasmodium falciparum infection in Indian adults. *Infection and immunity* 77, 2943-2947.
- Divo, A.A., Geary, T.G., Davis, N.L., Jensen, J.B., 1985. Nutritional requirements of Plasmodium falciparum in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuous growth. *The Journal of protozoology* 32, 59-64.
- Dodoo, D., Omer, F.M., Todd, J., Akanmori, B.D., Koram, K.A., Riley, E.M., 2002. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria. *The Journal of infectious diseases* 185, 971-979.
- Dondorp, A.M., Pongponratn, E., White, N.J., 2004. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta tropica* 89, 309-317.

- Doolan, D.L., Dobano, C., Baird, J.K., 2009. Acquired immunity to malaria. *Clinical microbiology reviews* 22, 13-36, Table of Contents.
- Dorovini-Zis, K., Prameya, R., Bowman, P.D., 1991. Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 64, 425-436.
- Dorovini-Zis, K., Schmidt, K., Huynh, H., Fu, W., Whitten, R.O., Milner, D., Kamiza, S., Molyneux, M., Taylor, T.E., 2011. The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. *The American journal of pathology* 178, 2146-2158.
- Dostert, C., Guarda, G., Romero, J.F., Menu, P., Gross, O., Tardivel, A., Suva, M.L., Stehle, J.C., Kopf, M., Stamenkovic, I., Corradin, G., Tschopp, J., 2009. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PloS one* 4, e6510.
- Duncan, E.J., Cheetham, M.E., Chapple, J.P., van der Spuy, J., 2015. The role of HSP70 and its co-chaperones in protein misfolding, aggregation and disease. *Sub-cellular biochemistry* 78, 243-273.
- Dunst, J., Kamena, F., Matuschewski, K., 2017. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, 324.
- Elsworth, B., Crabb, B.S., Gilson, P.R., 2014. Protein export in malaria parasites: an update. *Cellular microbiology* 16, 355-363.
- Esser, C., Bachmann, A., Kuhn, D., Schuldt, K., Forster, B., Thiel, M., May, J., Koch-Nolte, F., Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F., Schinkel, A.H., Jalkanen, S., Craig, A.G., Bruchhaus, I., Horstmann, R.D., 2014. Evidence of promiscuous endothelial binding by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cellular microbiology* 16, 701-708.
- Fairhurst, R.M., Baruch, D.I., Brittain, N.J., Ostera, G.R., Wallach, J.S., Hoang, H.L., Hayton, K., Guindo, A., Makobongo, M.O., Schwartz, O.M., Tounkara, A., Doumbo, O.K., Diallo, D.A., Fujioka, H., Ho, M., Wellems, T.E., 2005. Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria. *Nature* 435, 1117-1121.
- Fiore, E., Fusco, C., Romero, P., Stamenkovic, I., 2002. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 21, 5213-5223.
- Fleming, I., 2010. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 459, 793-806.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Munoz-Planillo, R., Nunez, G., 2009. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nature immunology* 10, 241-247.
- Frank, M., Dzikowski, R., Amulic, B., Deitsch, K., 2007. Variable switching rates of malaria virulence genes are associated with chromosomal position. *Molecular microbiology* 64, 1486-1498.
- Frank, P.G., Lisanti, M.P., 2008. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 295, H926-H927.
- Friebe, A., Volk, H.D., 2008. Stability of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, and interleukin 8 in blood samples of patients with systemic immune activation. *Archives of pathology & laboratory medicine* 132, 1802-1806.
- Fried, M., Duffy, P.E., 1996. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 272, 1502-1504.
- Gardner, J.P., Pinches, R.A., Roberts, D.J., Newbold, C.I., 1996. Variant antigens and endothelial receptor adhesion in Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3503-3508.
- Geest, C.R., Coffey, P.J., 2009. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology* 86, 237-250.
- Gerald, N., Mahajan, B., Kumar, S., 2011. Mitosis in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Eukaryotic cell* 10, 474-482.

- Ghosh, A.K., Sinha, D., Mukherjee, S., Biswas, R., Biswas, T., 2015. LPS stimulates and Hsp70 down-regulates TLR4 to orchestrate differential cytokine response of culture-differentiated innate memory CD8(+) T cells. *Cytokine* 73, 44-52.
- Gillrie, M.R., Ho, M., 2017. Dynamic interactions of Plasmodium spp. with vascular endothelium. *Tissue barriers* 5, e1268667.
- Goel, S., Muthusamy, A., Miao, J., Cui, L., Salanti, A., Winzeler, E.A., Gowda, D.C., 2014. Targeted disruption of a ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA)-like export protein gene in Plasmodium falciparum confers stable chondroitin 4-sulfate cytoadherence capacity. *The Journal of biological chemistry* 289, 34408-34421.
- Goes, N., Urmson, J., Hobart, M., Halloran, P.F., 1996. The unique role of interferon-gamma in the regulation of MHC expression on arterial endothelium. *Transplantation* 62, 1889-1894.
- Grimm, S., Bauer, M.K., Baeuerle, P.A., Schulze-Osthoff, K., 1996. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *The Journal of cell biology* 134, 13-23.
- Groenewegen, G., Buurman, W.A., Jeunhomme, G.M., van der Linden, C.J., 1985. Effect of cyclosporine on MHC class II antigen expression on arterial and venous endothelium in vitro. *Transplantation* 40, 21-25.
- Gruenberg, J., Allred, D.R., Sherman, I.W., 1983. Scanning electron microscope-analysis of the protrusions (knobs) present on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *The Journal of cell biology* 97, 795-802.
- Guidotti, G., Hill, R.J., Konigsberg, W., 1962. The structure of human hemoglobin. II. The separation and amino acid composition of the tryptic peptides from the alpha and beta chains. *The Journal of biological chemistry* 237, 2184-2195.
- Gurskiy, Y.G., Garbuz, D.G., Soshnikova, N.V., Krasnov, A.N., Deikin, A., Lazarev, V.F., Sverchinskyi, D., Margulis, B.A., Zatsepina, O.G., Karpov, V.L., Belzhelarskaya, S.N., Feoktistova, E., Georgieva, S.G., Evgen'ev, M.B., 2016. The development of modified human Hsp70 (HSPA1A) and its production in the milk of transgenic mice. *Cell stress & chaperones* 21, 1055-1064.
- Gyrd-Hansen, M., Meier, P., 2010. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nature reviews. Cancer* 10, 561-574.
- Hakulinen, J., Meri, S., 1998. Complement-mediated killing of microtumors in vitro. *The American journal of pathology* 153, 845-855.
- Haldar, K., Mohandas, N., 2007. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Current opinion in hematology* 14, 203-209.
- Hasday, J.D., Bannerman, D., Sakarya, S., Cross, A.S., Singh, I.S., Howard, D., Drysdale, B.E., Goldblum, S.E., 2001. Exposure to febrile temperature modifies endothelial cell response to tumor necrosis factor-alpha. *Journal of applied physiology* 90, 90-98.
- Hayden, M.S., West, A.P., Ghosh, S., 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-6780.
- He, Y., Hara, H., Nunez, G., 2016. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in biochemical sciences* 41, 1012-1021.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.
- Hill, R.J., Konigsberg, W., Guidotti, G., Craig, L.C., 1962. The structure of human hemoglobin. I. The separation of the alpha and beta chains and their amino acid composition. *The Journal of biological chemistry* 237, 1549-1554.
- Hinterberg, K., Scherf, A., Gysin, J., Toyoshima, T., Aikawa, M., Mazie, J.C., da Silva, L.P., Mattei, D., 1994. Plasmodium falciparum: the Pf332 antigen is secreted from the parasite by a brefeldin A-dependent pathway and is translocated to the erythrocyte membrane via the Maurer's clefts. *Experimental parasitology* 79, 279-291.
- Hinz, M., Scheidereit, C., 2014. The I kappa B kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond. *EMBO reports* 15, 46-61.

- Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Ruther, U., Nordheim, A., 1999. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 19838-19845.
- Horrocks, P., Pinches, R.A., Chakravorty, S.J., Papakrivos, J., Christodoulou, Z., Kyes, S.A., Urban, B.C., Ferguson, D.J., Newbold, C.I., 2005. PfEMP1 expression is reduced on the surface of knobless *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Journal of cell science* 118, 2507-2518.
- Horstmann, R.D., Ehrich, J.H., Beck, J., Dietrich, M., 1985. [Fatal complications of tropical malaria in non-immune patients. A retrospective clinico-pathologic analysis of 25 cases]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 110, 1651-1656.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., Goeddel, D.V., 1996. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396.
- Huang, C.Y., Tan, T.H., 2012. DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell & bioscience* 2, 24.
- Hunt, N.H., Grau, G.E., 2003. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in immunology* 24, 491-499.
- Huxford, T., Huang, D.B., Malek, S., Ghosh, G., 1998. The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* 95, 759-770.
- Ichihashi, H., McCormack, J.M., McCarthy, K.M., Dombkowski, D., Preffer, F.I., Schneeberger, E.E., 2004. Matrix metalloproteinase-9-deficient dendritic cells have impaired migration through tracheal epithelial tight junctions. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 30, 761-770.
- Idro, R., Marsh, K., John, C.C., Newton, C.R., 2010. Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatric research* 68, 267-274.
- Irmeler, M., Steiner, V., Ruegg, C., Wajant, H., Tschopp, J., 2000. Caspase-induced inactivation of the anti-apoptotic TRAF1 during Fas ligand-mediated apoptosis. *FEBS letters* 468, 129-133.
- Jacobs, M.D., Harrison, S.C., 1998. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 95, 749-758.
- Jambou, R., Combes, V., Jambou, M.J., Weksler, B.B., Couraud, P.O., Grau, G.E., 2010. *Plasmodium falciparum* adhesion on human brain microvascular endothelial cells involves transmigration-like cup formation and induces opening of intercellular junctions. *PLoS pathogens* 6, e1001021.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D., Hemmati-Brivanlou, A., 2005. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132, 1273-1282.
- Janes, J.H., Wang, C.P., Levin-Edens, E., Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Melcher, M., Mercereau-Puijalon, O., Smith, J.D., 2011. Investigating the host binding signature on the *Plasmodium falciparum* PfEMP1 protein family. *PLoS pathogens* 7, e1002032.
- Jensen, A.T., Magistrado, P., Sharp, S., Joergensen, L., Lavstsen, T., Chiucchiuini, A., Salanti, A., Vestergaard, L.S., Lusingu, J.P., Hermsen, R., Sauerwein, R., Christensen, J., Nielsen, M.A., Hviid, L., Sutherland, C., Staalsoe, T., Theander, T.G., 2004. *Plasmodium falciparum* associated with severe childhood malaria preferentially expresses PfEMP1 encoded by group A var genes. *The Journal of experimental medicine* 199, 1179-1190.
- Jensen, J.B., Trager, W., 1978. *Plasmodium falciparum* in culture: establishment of additional strains. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 27, 743-746.
- Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W., Goeddel, D.V., 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543-546.
- Kallmann, B.A., Wagner, S., Hummel, V., Buttmann, M., Bayas, A., Tonn, J.C., Rieckmann, P., 2002. Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 589-591.
- Kanarek, N., Ben-Neriah, Y., 2012. Regulation of NF-kappaB by ubiquitination and degradation of the IkappaBs. *Immunological reviews* 246, 77-94.

- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., Li, Z.W., 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews. Cancer* 2, 301-310.
- Karin, M., Lin, A., 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology* 3, 221-227.
- Kaushansky, A., Kappe, S.H., 2015. Selection and refinement: the malaria parasite's infection and exploitation of host hepatocytes. *Current opinion in microbiology* 26, 71-78.
- Kawai, T., Akira, S., 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine* 13, 460-469.
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology* 5, 461.
- Keeley, A., Soldati, D., 2004. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends in cell biology* 14, 528-532.
- Kessler, A., Dankwa, S., Bernabeu, M., Harawa, V., Danziger, S.A., Duffy, F., Kampondeni, S.D., Potchen, M.J., Dambrauskas, N., Vigdorovich, V., Oliver, B.G., Hochman, S.E., Mowrey, W.B., MacCormick, I.J.C., Mandala, W.L., Rogerson, S.J., Sather, D.N., Aitchison, J.D., Taylor, T.E., Seydel, K.B., Smith, J.D., Kim, K., 2017. Linking EPCR-Binding PfEMP1 to Brain Swelling in Pediatric Cerebral Malaria. *Cell host & microbe* 22, 601-614 e605.
- Kettelhut, I.C., Fiers, W., Goldberg, A.L., 1987. The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 4273-4277.
- Kim, Y.K., Shin, J.S., Nahm, M.H., 2016. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei medical journal* 57, 5-14.
- Kinra, P., Dutta, V., 2013. Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria. *Tropical biomedicine* 30, 645-653.
- Kochar, D.K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S.K., Kumar, S.V., Das, A., 2005. Plasmodium vivax malaria. *Emerging infectious diseases* 11, 132-134.
- Kohn, G., Wong, H.R., Bshesh, K., Zhao, B., Vasi, N., Denenberg, A., Morris, C., Stark, J., Shanley, T.P., 2002. Heat shock inhibits tnf-induced ICAM-1 expression in human endothelial cells via I kappa kinase inhibition. *Shock* 17, 91-97.
- Kraemer, S.M., Smith, J.D., 2006. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Current opinion in microbiology* 9, 374-380.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., Blasig, I.E., 2008. Structure and function of claudins. *Biochimica et biophysica acta* 1778, 631-645.
- Kunze, K., 2002. Metabolic encephalopathies. *Journal of neurology* 249, 1150-1159.
- Kyes, S., Horrocks, P., Newbold, C., 2001. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annual review of microbiology* 55, 673-707.
- Kyes, S.A., Kraemer, S.M., Smith, J.D., 2007. Antigenic variation in Plasmodium falciparum: gene organization and regulation of the var multigene family. *Eukaryotic cell* 6, 1511-1520.
- Kyriacou, H.M., Stone, G.N., Challis, R.J., Raza, A., Lyke, K.E., Thera, M.A., Kone, A.K., Doumbo, O.K., Plowe, C.V., Rowe, J.A., 2006. Differential var gene transcription in Plasmodium falciparum isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Molecular and biochemical parasitology* 150, 211-218.
- Lambros, C., Vanderberg, J.P., 1979. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *The Journal of parasitology* 65, 418-420.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* 9, 357-359.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., Golenbock, D.T., 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature immunology* 5, 190-198.
- Lauer, S.A., Rathod, P.K., Ghori, N., Haldar, K., 1997. A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* 276, 1122-1125.
- Lavstsen, T., Turner, L., Saguti, F., Magistrado, P., Rask, T.S., Jespersen, J.S., Wang, C.W., Berger, S.S., Baraka, V., Marquard, A.M., Seguin-Orlando, A., Willerslev, E., Gilbert, M.T., Lusingu, J.,

- Theander, T.G., 2012. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E1791-1800.
- Lee, H.J., Georgiadou, A., Otto, T.D., Levin, M., Coin, L.J., Conway, D.J., Cunnington, A.J., 2018. Transcriptomic Studies of Malaria: a Paradigm for Investigation of Systemic Host-Pathogen Interactions. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 82.
- Leech, J.H., Barnwell, J.W., Miller, L.H., Howard, R.J., 1984. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *The Journal of experimental medicine* 159, 1567-1575.
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* 12, 323.
- Liebermann, D.A., Hoffman, B., 2008. Gadd45 in stress signaling. *Journal of molecular signaling* 3, 15.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.C., 2017. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy* 2.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Logue, G.L., 1977. Effect of heparin on complement activation and lysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red cells. *Blood* 50, 239-247.
- Luse, S.A., Miller, L.H., 1971. Plasmodium falciparum malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 20, 655-660.
- Lyke, K.E., Burges, R., Cissoko, Y., Sangare, L., Dao, M., Diarra, I., Kone, A., Harley, R., Plowe, C.V., Doumbo, O.K., Szein, M.B., 2004. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infection and immunity* 72, 5630-5637.
- Maier, A.G., Cooke, B.M., Cowman, A.F., Tilley, L., 2009. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature reviews. Microbiology* 7, 341-354.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & development* 18, 3066-3077.
- Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J., 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 10, 417-426.
- Martinon, F., Tschopp, J., 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends in immunology* 26, 447-454.
- Massague, J., 1998. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* 67, 753-791.
- Mayer, C., Slater, L., Erat, M.C., Konrat, R., Vakonakis, I., 2012. Structural analysis of the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) intracellular domain reveals a conserved interaction epitope. *The Journal of biological chemistry* 287, 7182-7189.
- Merrick, C.J., Dzikowski, R., Imamura, H., Chuang, J., Deitsch, K., Duraisingh, M.T., 2010. The effect of Plasmodium falciparum Sir2a histone deacetylase on clonal and longitudinal variation in expression of the var family of virulence genes. *International journal for parasitology* 40, 35-43.
- Morimoto, R.I., 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & development* 12, 3788-3796.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., Rodriguez, A., 2001. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 291, 141-144.
- Moxon, C.A., Grau, G.E., Craig, A.G., 2011. Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host. *British journal of haematology* 154, 670-679.

- Moya-Alvarez, V., Abellana, R., Cot, M., 2014. Pregnancy-associated malaria and malaria in infants: an old problem with present consequences. *Malaria journal* 13, 271.
- Mundwiler-Pachlatko, E., Beck, H.P., 2013. Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 19987-19994.
- Nixon, C.P., 2016. *Plasmodium falciparum* gametocyte transit through the cutaneous microvasculature: A new target for malaria transmission blocking vaccines? *Human vaccines & immunotherapeutics* 12, 3189-3195.
- Oakley, M.S., Kumar, S., Anantharaman, V., Zheng, H., Mahajan, B., Haynes, J.D., Moch, J.K., Fairhurst, R., McCutchan, T.F., Aravind, L., 2007. Molecular factors and biochemical pathways induced by febrile temperature in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites. *Infection and immunity* 75, 2012-2025.
- Oberli, A., Slater, L.M., Cutts, E., Brand, F., Mundwiler-Pachlatko, E., Rusch, S., Masik, M.F., Erat, M.C., Beck, H.P., Vakonakis, I., 2014. A *Plasmodium falciparum* PHIST protein binds the virulence factor PfEMP1 and comigrates to knobs on the host cell surface. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, 4420-4433.
- Oberli, A., Zurbrugg, L., Rusch, S., Brand, F., Butler, M.E., Day, J.L., Cutts, E.E., Lavstsen, T., Vakonakis, I., Beck, H.P., 2016. *Plasmodium falciparum* *Plasmodium* helical interspersed subtelomeric proteins contribute to cytoadherence and anchor P. *falciparum* erythrocyte membrane protein 1 to the host cell cytoskeleton. *Cellular microbiology* 18, 1415-1428.
- Obiakor, H., Avril, M., Macdonald, N.J., Srinivasan, P., Reiter, K., Anderson, C., Holmes, K.L., Fried, M., Duffy, P.E., Smith, J.D., Narum, D.L., Miller, L.H., 2013. Identification of VAR2CSA domain-specific inhibitory antibodies of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 using a novel flow cytometry assay. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 20, 433-442.
- Ockenhouse, C.F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K.E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M., Lobb, R.R., 1992. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *The Journal of experimental medicine* 176, 1183-1189.
- Oeckinghaus, A., Ghosh, S., 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a000034.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J., Niehrs, C., 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401, 480-485.
- Pagola, S., Stephens, P.W., Bohle, D.S., Kosar, A.D., Madsen, S.K., 2000. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature* 404, 307-310.
- Panner, A., Wurster, R.D., 2006. T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell calcium* 40, 253-259.
- Parroche, P., Lauw, F.N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B.G., Visintin, A., Halmen, K.A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D.C., Gazzinelli, R.T., Golenbock, D.T., 2007. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 1919-1924.
- Pasternak, N.D., Dzikowski, R., 2009. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 1463-1466.
- Pei, X., Guo, X., Coppel, R., Mohandas, N., An, X., 2007. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) destabilizes erythrocyte membrane skeleton. *The Journal of biological chemistry* 282, 26754-26758.
- Petes, C., Odoardi, N., Gee, K., 2017. The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome. *Frontiers in immunology* 8, 1075.
- Phan, N.N., Wang, C.Y., Chen, C.F., Sun, Z., Lai, M.D., Lin, Y.C., 2017. Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncology letters* 14, 2059-2074.

- Pino, P., Vouldoukis, I., Kolb, J.P., Mahmoudi, N., Desportes-Livage, I., Bricaire, F., Danis, M., Dugas, B., Mazier, D., 2003. Plasmodium falciparum--infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *The Journal of infectious diseases* 187, 1283-1290.
- Poniatowski, L.A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., Szukiewicz, D., 2015. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators of inflammation* 2015, 137823.
- Prakash, D., Fesel, C., Jain, R., Cazenave, P.A., Mishra, G.C., Pied, S., 2006. Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India. *The Journal of infectious diseases* 194, 198-207.
- Prato, M., D'Alessandro, S., Van den Steen, P.E., Opdenakker, G., Arese, P., Taramelli, D., Basilico, N., 2011. Natural haemozoin modulates matrix metalloproteinases and induces morphological changes in human microvascular endothelium. *Cellular microbiology* 13, 1275-1285.
- Prato, M., Giribaldi, G., 2011. Matrix Metalloproteinase-9 and Haemozoin: Wedding Rings for Human Host and Plasmodium falciparum Parasite in Complicated Malaria. *Journal of tropical medicine* 2011, 628435.
- Punsawad, C., Maneerat, Y., Chaisri, U., Nantavisai, K., Viriyavejakul, P., 2013. Nuclear factor kappa B modulates apoptosis in the brain endothelial cells and intravascular leukocytes of fatal cerebral malaria. *Malaria journal* 12, 260.
- Qi, M., Elion, E.A., 2005. MAP kinase pathways. *Journal of cell science* 118, 3569-3572.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., Nishigaki, I., 2013. The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences* 9, 1057-1069.
- Rask, T.S., Hansen, D.A., Theander, T.G., Gorm Pedersen, A., Lavstsen, T., 2010. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes--divide and conquer. *PLoS computational biology* 6.
- Rauert, H., Wicovsky, A., Muller, N., Siegmund, D., Spindler, V., Waschke, J., Kneitz, C., Wajant, H., 2010. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *The Journal of biological chemistry* 285, 7394-7404.
- Razakandrainibe, R., Pelleau, S., Grau, G.E., Jambou, R., 2012. Antigen presentation by endothelial cells: what role in the pathophysiology of malaria? *Trends in parasitology* 28, 151-160.
- Reimer, T., Shaw, M.H., Franchi, L., Coban, C., Ishii, K.J., Akira, S., Horii, T., Rodriguez, A., Nunez, G., 2010. Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome. *European journal of immunology* 40, 764-769.
- Rieger, H., Yoshikawa, H.Y., Quadt, K., Nielsen, M.A., Sanchez, C.P., Salanti, A., Tanaka, M., Lanzer, M., 2015. Cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate is cooperative and shear enhanced. *Blood* 125, 383-391.
- Robert, C., Pouvelle, B., Meyer, P., Muanza, K., Fujioka, H., Aikawa, M., Scherf, A., Gysin, J., 1995. Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. *Research in immunology* 146, 383-393.
- Robinson, B.A., Welch, T.L., Smith, J.D., 2003. Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Molecular microbiology* 47, 1265-1278.
- Rogerson, S.J., Chaiyaroj, S.C., Ng, K., Reeder, J.C., Brown, G.V., 1995. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *The Journal of experimental medicine* 182, 15-20.
- Rosenberg, G.A., Yang, Y., 2007. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurgical focus* 22, E4.
- Rowe, J.A., Claessens, A., Corrigan, R.A., Arman, M., 2009. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert reviews in molecular medicine* 11, e16.

- Rug, M., Prescott, S.W., Fernandez, K.M., Cooke, B.M., Cowman, A.F., 2006. The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood* 108, 370-378.
- Sabio, G., Davis, R.J., 2014. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in immunology* 26, 237-245.
- Saha, R.N., Jana, M., Pahan, K., 2007. MAPK p38 regulates transcriptional activity of NF-kappaB in primary human astrocytes via acetylation of p65. *Journal of immunology* 179, 7101-7109.
- Sahu, A., Pangburn, M.K., 1993. Identification of multiple sites of interaction between heparin and the complement system. *Molecular immunology* 30, 679-684.
- Salanti, A., Dahlback, M., Turner, L., Nielsen, M.A., Barfod, L., Magistrado, P., Jensen, A.T., Lavstsen, T., Ofori, M.F., Marsh, K., Hviid, L., Theander, T.G., 2004. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *The Journal of experimental medicine* 200, 1197-1203.
- Salanti, A., Staalsoe, T., Lavstsen, T., Jensen, A.T., Sowa, M.P., Arnot, D.E., Hviid, L., Theander, T.G., 2003. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Molecular microbiology* 49, 179-191.
- Scherf, A., Hernandez-Rivas, R., Buffet, P., Bottius, E., Benatar, C., Pouvelle, B., Gysin, J., Lanzer, M., 1998. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *The EMBO journal* 17, 5418-5426.
- Scherf, A., Lopez-Rubio, J.J., Riviere, L., 2008. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annual review of microbiology* 62, 445-470.
- Seydel, K.B., Kampondeni, S.D., Valim, C., Potchen, M.J., Milner, D.A., Muwalo, F.W., Birbeck, G.L., Bradley, W.G., Fox, L.L., Glover, S.J., Hammond, C.A., Heyderman, R.S., Chilingulo, C.A., Molyneux, M.E., Taylor, T.E., 2015. Brain swelling and death in children with cerebral malaria. *The New England journal of medicine* 372, 1126-1137.
- Shao, B.Z., Xu, Z.Q., Han, B.Z., Su, D.F., Liu, C., 2015. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Frontiers in pharmacology* 6, 262.
- Sharma, Y.D., 1991. Knobs, knob proteins and cytoadherence in *falciparum* malaria. *The International journal of biochemistry* 23, 775-789.
- Shaw, P.J., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.D., 2010. NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *European journal of immunology* 40, 624-627.
- Shio, M.T., Eisenbarth, S.C., Savaria, M., Vinet, A.F., Bellemare, M.J., Harder, K.W., Sutterwala, F.S., Bohle, D.S., Descoteaux, A., Flavell, R.A., Olivier, M., 2009. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS pathogens* 5, e1000559.
- Sidjanski, S., Vanderberg, J.P., 1997. Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 57, 426-429.
- Slater, A.F., 1992. Malaria pigment. *Experimental parasitology* 74, 362-365.
- Smith, J.D., 2014. The role of PfEMP1 adhesion domain classification in *Plasmodium falciparum* pathogenesis research. *Molecular and biochemical parasitology* 195, 82-87.
- Smith, J.D., Craig, A.G., Kriek, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagan, T., Pinches, R., Baruch, D.I., Newbold, C.I., Miller, L.H., 2000. Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1766-1771.
- Smith, J.D., Rowe, J.A., Higgins, M.K., Lavstsen, T., 2013. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cellular microbiology* 15, 1976-1983.
- Spottiswoode, N., Armitage, A.E., Williams, A.R., Fyfe, A.J., Biswas, S., Hodgson, S.H., Llewellyn, D., Choudhary, P., Draper, S.J., Duffy, P.E., Drakesmith, H., 2017. Role of Activins in Hcpidin Regulation during Malaria. *Infection and immunity* 85.

- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, J.J., 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation* 20, 107-126.
- Storm, J., Craig, A.G., 2014. Pathogenesis of cerebral malaria--inflammation and cytoadherence. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4, 100.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.M., Menard, R., Heussler, V.T., 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313, 1287-1290.
- Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A., Wellems, T.E., 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82, 89-100.
- Sun, S.C., 2011. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell research* 21, 71-85.
- Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., Greene, W.C., 1993. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912-1915.
- Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N., Smuc, T., 2011. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PloS one* 6, e21800.
- Szmitko, P.E., Wang, C.H., Weisel, R.D., de Almeida, J.R., Anderson, T.J., Verma, S., 2003. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 108, 1917-1923.
- Taipale, M., Tucker, G., Peng, J., Krykbaeva, I., Lin, Z.Y., Larsen, B., Choi, H., Berger, B., Gingras, A.C., Lindquist, S., 2014. A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways. *Cell* 158, 434-448.
- Takeshita, F., Gursel, I., Ishii, K.J., Suzuki, K., Gursel, M., Klinman, D.M., 2004. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Seminars in immunology* 16, 17-22.
- Tamura, R.E., de Vasconcellos, J.F., Sarkar, D., Libermann, T.A., Fisher, P.B., Zerbini, L.F., 2012. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Current molecular medicine* 12, 634-651.
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., Krudsood, S., 2009. Malaria diagnosis: a brief review. *The Korean journal of parasitology* 47, 93-102.
- Tavares, J., Formaglio, P., Thiberge, S., Mordelet, E., Van Rooijen, N., Medvinsky, A., Menard, R., Amino, R., 2013. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *The Journal of experimental medicine* 210, 905-915.
- Taylor, T.E., Fu, W.J., Carr, R.A., Whitten, R.O., Mueller, J.S., Fosiko, N.G., Lewallen, S., Liomba, N.G., Molyneux, M.E., 2004. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nature medicine* 10, 143-145.
- Taylor, W.R.J., Hanson, J., Turner, G.D.H., White, N.J., Dondorp, A.M., 2012. Respiratory manifestations of malaria. *Chest* 142, 492-505.
- Thuma, P.E., van Dijk, J., Bucala, R., Debebe, Z., Nekhai, S., Kuddo, T., Nouraie, M., Weiss, G., Gordeuk, V.R., 2011. Distinct clinical and immunologic profiles in severe malarial anemia and cerebral malaria in Zambia. *The Journal of infectious diseases* 203, 211-219.
- Ting, A.T., Bertrand, M.J.M., 2016. More to Life than NF-kappaB in TNFR1 Signaling. *Trends in immunology* 37, 535-545.
- Tonkin, C.J., Carret, C.K., Duraisingh, M.T., Voss, T.S., Ralph, S.A., Hommel, M., Duffy, M.F., Silva, L.M., Scherf, A., Ivens, A., Speed, T.P., Beeson, J.G., Cowman, A.F., 2009. Sir2 paralogue cooperate to regulate virulence genes and antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *PLoS biology* 7, e84.
- Tousoulis, D., Kampoli, A.M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., Stefanadis, C., 2012. The role of nitric oxide on endothelial function. *Current vascular pharmacology* 10, 4-18.
- Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-675.
- Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., Prabhu, R.M., 2003. Clinical review: Severe malaria. *Critical care* 7, 315-323.
- Traore, B., Muanza, K., Looareesuwan, S., Supavej, S., Khusmith, S., Danis, M., Viriyavejakul, P., Gay, F., 2000. Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates in Thailand using

- an in vitro human lung endothelial cells model. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 62, 38-44.
- Travis, M.A., Sheppard, D., 2014. TGF-beta activation and function in immunity. *Annual review of immunology* 32, 51-82.
- Tripathi, A.K., Sha, W., Shulaev, V., Stins, M.F., Sullivan, D.J., Jr., 2009. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood* 114, 4243-4252.
- Tripathi, A.K., Sullivan, D.J., Stins, M.F., 2006. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. *Infection and immunity* 74, 3262-3270.
- Tripathi, A.K., Sullivan, D.J., Stins, M.F., 2007. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes decrease the integrity of human blood-brain barrier endothelial cell monolayers. *The Journal of infectious diseases* 195, 942-950.
- Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S.S., Wang, C.W., Petersen, J.E., Avril, M., Brazier, A.J., Freeth, J., Jespersen, J.S., Nielsen, M.A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J.D., Higgins, M.K., Theander, T.G., 2013. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature* 498, 502-505.
- Udomsangpetch, R., Pipitaporn, B., Silamut, K., Pinches, R., Kyes, S., Looareesuwan, S., Newbold, C., White, N.J., 2002. Febrile temperatures induce cytoadherence of ring-stage Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11825-11829.
- Utter, C., Serrano, A.E., Glod, J.W., Leibowitz, M.J., 2017. Association of Plasmodium falciparum with Human Endothelial Cells in vitro. *The Yale journal of biology and medicine* 90, 183-193.
- Vadeboncoeur, N., Segura, M., Al-Numani, D., Vanier, G., Gottschalk, M., 2003. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by Streptococcus suis serotype 2. *FEMS immunology and medical microbiology* 35, 49-58.
- Van den Steen, P.E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., Opdenakker, G., 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96, 2673-2681.
- Van den Steen, P.E., Van Aelst, I., Starckx, S., Maskos, K., Opdenakker, G., Pagenstecher, A., 2006. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of MMPs and TACE in experimental cerebral malaria. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86, 873-888.
- Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Boone, E., De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Fiers, W., Haegeman, G., 1998. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of biological chemistry* 273, 3285-3290.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3, RESEARCH0034.
- Viebig, N.K., Wulbrand, U., Forster, R., Andrews, K.T., Lanzer, M., Knolle, P.A., 2005. Direct activation of human endothelial cells by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Infection and immunity* 73, 3271-3277.
- Vogler, M., 2012. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell death and differentiation* 19, 67-74.
- Wagner, M., Hermanns, I., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J., 1999. Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *The American journal of physiology* 277, L1026-1033.
- Walmet, P.S., Eckman, J.R., Wick, T.M., 2003. Inflammatory mediators promote strong sickle cell adherence to endothelium under venular flow conditions. *American journal of hematology* 73, 215-224.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Baldwin, A.S., Jr., 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274, 784-787.

- Warhurst, D.C., Williams, J.E., 1996. ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *Journal of clinical pathology* 49, 533-538.
- Waruiru, C.M., Newton, C.R., Forster, D., New, L., Winstanley, P., Mwangi, I., Marsh, V., Winstanley, M., Snow, R.W., Marsh, K., 1996. Epileptic seizures and malaria in Kenyan children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90, 152-155.
- Wassmer, S.C., Combes, V., Candal, F.J., Juhan-Vague, I., Grau, G.E., 2006. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity* 74, 645-653.
- Waterkeyn, J.G., Wickham, M.E., Davern, K.M., Cooke, B.M., Coppel, R.L., Reeder, J.C., Culvenor, J.G., Waller, R.F., Cowman, A.F., 2000. Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *The EMBO journal* 19, 2813-2823.
- Watermeyer, J.M., Hale, V.L., Hackett, F., Clare, D.K., Cutts, E.E., Vakonakis, I., Fleck, R.A., Blackman, M.J., Saibil, H.R., 2016. A spiral scaffold underlies cytoadherent knobs in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood* 127, 343-351.
- Wautier, J.L., Pintigny, D., Wautier, M.P., Paton, R.C., Galacteros, F., Passa, P., Caen, J.P., 1983. Fibrinogen, a modulator of erythrocyte adhesion to vascular endothelium. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 101, 911-920.
- Weiss, A., Attisano, L., 2013. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 2, 47-63.
- Wenisch, C., Parschalk, B., Burgmann, H., Looareesuwan, S., Graninger, W., 1995. Decreased serum levels of TGF-beta in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of clinical immunology* 15, 69-73.
- WHO, 2014. Severe Malaria. *Tropical Medicine and International Health* 19, Supplement 1
- WHO, 2017. World Malaria Report 2017
- WHO, 2018. World Malaria Report 2018
- Wong, E.T., Tergaonkar, V., 2009. Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical science* 116, 451-465.
- Wung, B.S., Ni, C.W., Wang, D.L., 2005. ICAM-1 induction by TNFalpha and IL-6 is mediated by distinct pathways via Rac in endothelial cells. *Journal of biomedical science* 12, 91-101.
- Xiao, G., Fong, A., Sun, S.C., 2004. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 279, 30099-30105.
- Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., Akira, S., 2004. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* 430, 218-222.
- Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S., Takeshige, K., 2005. Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-kappaB regulator, IkappaB-zeta, via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *The Journal of biological chemistry* 280, 1678-1687.
- Yang, Y., Koo, S., Lin, C.S., Neu, B., 2010. Specific binding of red blood cells to endothelial cells is regulated by nonadsorbing macromolecules. *The Journal of biological chemistry* 285, 40489-40495.
- Yang, Y., Liu, Q., Lu, J., Adah, D., Yu, S., Zhao, S., Yao, Y., Qin, L., Qin, L., Chen, X., 2017. Exosomes from *Plasmodium*-infected hosts inhibit tumor angiogenesis in a murine Lewis lung cancer model. *Oncogenesis* 6, e351.
- Yeh, W.C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D.V., Mak, T.W., 1997. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7, 715-725.
- Zapf, S., Loos, M., 1985. Effect of EDTA and citrate on the functional activity of the first component of complement, C1, and the C1q subcomponent. *Immunobiology* 170, 123-132.

- Zhang, Q., Lenardo, M.J., Baltimore, D., 2017. 30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell* 168, 37-57.
- Zimmerman, L.B., De Jesus-Escobar, J.M., Harland, R.M., 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606.
- Zuehlke, A.D., Beebe, K., Neckers, L., Prince, T., 2015. Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene* 570, 8-16.