

Die Bedeutung der VIR-Proteine von *Plasmodium vivax* für die Zytoadhäsion infizierter Retikulozyten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Torben Rehn

aus Hamburg

Hamburg, 2020

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. Mai 2020

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
SUMMARY.....	2
1 EINLEITUNG.....	4
1.1 MALARIA.....	4
1.2 PLASMODIUM VIVAX	5
1.2.1 LEBENSZYKLUS VON <i>P. VIVAX</i>	7
1.2.2 KRANKHEITSBILD, VERLAUFSFORM UND BEHANDLUNG.....	9
1.3 ZYTOADHÄSION VON PLASMODIUM SPP.....	9
1.3.1 ZYTOADHÄSION BEI <i>P. FALCIPARUM</i>	10
1.3.2 ZYTOADHÄSION BEI <i>P. KNOWLESI</i>	12
1.3.3 ZYTOADHÄSION BEI <i>P. VIVAX</i>	13
1.4 DIE VIR-MULTIGENFAMILIE VON P. VIVAX.....	14
1.5 HUMANE ENDOTHELREZEPTOREN	15
1.5.1 CD36	15
1.5.2 ICAM-1	16
1.5.3 VCAM-1.....	17
1.5.4 P-SELEKTIN.....	18
1.6 ZIELSETZUNG.....	18
2 METHODEN.....	20
2.1 MATERIAL.....	20
2.1.1 GERÄTE.....	20
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	21
2.1.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	22
2.1.4 KITS.....	23
2.1.5 SOFTWARE UND DATENBANK.....	23
2.1.6 ANTIKÖRPER.....	24
2.1.7 VEKTOREN	25
2.1.8 OLIGONUKLEOTIDE.....	25
2.1.9 RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN.....	26
2.1.10 SYNTHETISCHE VIR-GENE.....	26
2.1.11 PUFFER, MEDIEN UND ANDERE LÖSUNGEN	26

2.1.12	<i>E. COLI</i> -STÄMME	30
2.1.13	<i>P. FALCIPARUM</i> -STÄMME	30
2.1.14	CHO-ZELLINIEN.....	30
2.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	30
2.2.1	<i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> ZELLKULTUR.....	30
2.2.2	CHO-ZELLKULTUR.....	34
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	35
2.3.1	POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR).....	35
2.3.2	RESTRIKTIONSVERDAU.....	36
2.3.3	AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE	36
2.3.4	EXTRAKTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	37
2.3.5	SEQUENZIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN.....	37
2.3.6	ETHANOLFÄLLUNG	37
2.3.7	KLONIERUNG MITTELS INFUSION-TECHNIK.....	38
2.3.8	TRANSFORMATION	38
2.3.9	POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE.....	39
2.3.10	WESTERN BLOT-ANALYSE.....	40
2.3.11	IMMUNFLUORESZENZANALYSE	40
2.3.12	BINDUNGSEXPERIMENTE UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN	41
2.3.13	BINDUNGSEXPERIMENTE UNTER FLUSSBEDINGUNGEN	42
2.3.14	AUSWERTUNG DER BINDUNGSVERSUCHE.....	44
3	ERGEBNISSE.....	45
3.1	<i>IN SILICO</i>-ANALYSEN DER 13 VIR-PROTEINE	45
3.2	VERGLEICH VON ZWEI C-TERMINALEN MARKIERUNGEN FÜR DIE DETEKTION DER VIR-PROTEINE.	47
3.3	VERGLEICH DER LOKALISATION VON SBP1 UND DER ATS-DOMÄNE DER PfEMP1	48
3.4	LOKALISATION VON 13 VIR-PROTEINEN IM iE UND DEREN KOLOKALISATION MIT <i>P. FALCIPARUM</i> SPEZIFISCHEN ZELLKOMPARTIMENTEN	48
3.5	DETEKTION EINER MÖGLICHEN OBERFLÄCHENLOKALISATION DER 13 UNTERSUCHTEN VIR-PROTEINE MITTELS WESTERN BLOT-ANALYSE.....	76
3.6	ANALYSE DER ADHÄSION DER <i>P. FALCIPARUM</i> VIR-TRANSFEKTANTEN AN DIE ENDOTHELZELLREZEPTOREN CD36, ICAM-1, VCAM-1 UND P-SELEKTIN.....	81
3.6.1	BINDUNGSVERSUCHE UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN.....	81
3.6.2	BINDUNGSVERSUCH UNTER FLUSSBEDINGUNGEN	86
3.7	HOMOLOGE SEQUENZBEREICHE DER 13 VIR-PROTEINE ZU ANNOTIERTEN PROTEINEN.....	86
4	DISKUSSION.....	88

4.1 VERGLEICH DER LOKALISATION DER VIR-PROTEINE MIT ZWEI VERSCHIEDENEN C-TERMINALEN ERKENNUNGSSEQUENZEN.....	88
4.2 EXPORT DER 13 UNTERSUCHTEN VIR-PROTEINE	89
4.3 LOKALISATION UND ZYTOADHÄSION VON PVX_050690	91
4.4 LOKALISATION DER 12 EXPORTIEREN VIR-PROTEINE IN DER IMMUNFLUORESZENZANALYSE	92
4.5 BINDUNG DER 12 EXPORTIERTEN VIR-PROTEINE AN DIE ENDOTHELZELLREZEPTOREN CD36, ICAM-1, VCAM-1, P-SELEKTIN	96
4.5.1 BINDUNGSVERHALTEN VON PARL_PVX_077695 ^{HA} , PARL_PVX_081850 ^{HA} , PARL_PVX_097525 ^{HA} UND PARL_PVX_107235 ^{HA} INFIZIERTEN ERYTHROZYTEN.....	97
4.5.2 BINDUNGSVERHALTEN VON PARL_PVX_000020 ^{HA} , PARL_PVX_101560 ^{HA} , PARL_PVX_113230 ^{HA} UND PARL_PVX_115475 ^{HA} INFIZIERTEN ERYTHROZYTEN.....	100
4.5.3 BINDUNGSVERHALTEN VON PARL_PVX_060690 ^{HA} , PARL_PVX_06869 ^{HA} , PARL_PVX_093715 ^{HA} UND PARL_PVX_096925 ^{HA} INFIZIERTEN ERYTHROZYTEN	103
5 FAZIT	107
6 LITERATURVERZEICHNIS	108
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	122
ANHANG.....	125
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	146

Zusammenfassung

Die Malaria ist eine Tropenkrankheit, dessen Erreger einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* spp. sind. Trotz der Bemühungen innerhalb der letzten Jahre im Kampf gegen die Malaria, starben im Jahr 2018 ca. 405.000 Menschen an den Folgen einer Malariainfektion, insbesondere Kinder unter 5 Jahren.

Der Malariaerreger, welcher die meisten Todesfälle verursacht, ist *Plasmodium falciparum*. Dieser Parasit kommt insbesondere in Afrika vor, dem Kontinent mit den meisten Malariainfektionen. Es gibt jedoch noch einen zweiten, insbesondere außerhalb Afrikas, weit verbreiteten Malariaerreger, *Plasmodium vivax*. Dieser Parasit wurde sehr lange als „gutartig“ in der Literatur beschrieben, da dieser Erreger nicht mit der schweren Form der Malaria assoziiert wurde. Der Grund hierfür ist, dass die schwere Form der Malaria immer mit der Fähigkeit des Parasiten zu zytoadhären verbunden wurde, diese aber nicht für *P. vivax* beschrieben wurde. In *P. falciparum* sind die PfEMP1 (engl. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1) maßgeblich an der Zytoadhäsion beteiligt. *P. vivax* besitzt zwar keine solche Proteinfamilie, jedoch mit der vir-Genfamilie (engl. variant interspersed repeats) eine Familie, von der postuliert wird, dass diese an der Zytoadhäsion von *P. vivax* beteiligt ist.

In dieser Arbeit wurden 13 transgene *P. falciparum*-Zelllinien hergestellt, welche je ein spezifisches VIR-Protein synthetisieren. Diese wurden verwendet, da eine kontinuierliche Zellkultur mit *P. vivax* noch nicht etabliert werden konnte. Von jeder transgenen Zelllinie wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht, um die Lokalisation des VIR-Proteins innerhalb des infizierten Erythrozyten (iE) feststellen zu können. Dabei konnte der Export der Proteine in das Zytosol des iE nachgewiesen werden, jedoch in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums des Parasiten. Nur für ein VIR-Protein konnte kein Export nachgewiesen werden, dessen Signal wurde ausschließlich innerhalb des Parasiten beobachtet. Des Weiteren wurden, um eine Oberflächenlokalisierung nachzuweisen, Western Blot-Analysen durchgeführt. Dafür wurden die iE mit dem Enzym Trypsin behandelt, welche alle sich an der Oberfläche des Erythrozyten befindlichen Proteine abbaut. Diese Probe wurde mit einer Probe, welche nicht mit Trypsin behandelt wurde in der Western Blot-Analyse verglichen. Dabei konnte jedoch nur für eins der 13 untersuchten VIR-Proteine eine Abnahme in der Signalintensität nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden noch von jeder transgenen

P. falciparum-Zelllinie die Bindungseigenschaften an die vier humanen Endothelzellrezeptoren CD36, ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin charakterisiert. Für die Rezeptoren wurden transgene CHO-Zelllinien (engl. *chinese hamster ovary cells*) verwendet, die den Rezeptor an der Oberfläche trugen. Als Vergleich wurde eine nicht transfizierte *P. falciparum*-Stammkultur verwendet. Dabei konnte für fünf VIR-Proteine eine Bindung an CHO-CD36 detektiert werden, welche sich signifikant von der Stammkultur unterschied. Für alle anderen VIR-Proteine konnte keine signifikante Bindung an CHO-CD36 nachgewiesen werden und von keinem VIR-Protein eine Bindung an einen der anderen drei getesteten Rezeptoren.

Im Hinblick darauf, dass auch *P. vivax* für schwere Malariafälle verantwortlich zu sein scheint, ist es von großer Bedeutung, diesen Erreger besser zu erforschen, um die Mechanismen zu verstehen. Auf Grundlage dieses Wissens ist es dann hoffentlich möglich, geeignete Therapiemaßnahmen zu entwickeln und eventuell auch einen Impfstoff.

Summary

Malaria is a tropical disease whose pathogens are caused by unicellular parasites of the genus *Plasmodium* spp. Despite the efforts made in recent years to combat malaria, in 2018, approximately 405.000 people died as a result of malaria infection, especially children under 5 years of age.

The malaria pathogen that causes most deaths is *Plasmodium falciparum*. This parasite is found particularly in Africa, the continent with the most malaria infections. However, there is a second malaria pathogen, *Plasmodium vivax*, which is widespread, especially outside Africa. This parasite has been described as "benign" in the literature for a very long time, as this pathogen has not been associated with the severe form of malaria. The reason for this is that the severe form of malaria has always been associated with the ability of the parasite to cytoadhere, but this has not been described for *P. vivax*. In *P. falciparum*, the PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) are significantly involved in cytoadhesion. On the other hand, *P. vivax* have the *vir* gene family (variant interspersed repeats), a family which is postulated to be involved in the cytoadhesion of *P. vivax*.

In this work 13 transgenic *P. falciparum* cell lines were produced, each of which synthesizes a specific VIR protein. These were used because a continuous cell culture with *P. vivax* could not yet be established. Fluorescence microscopic images were taken of each transgenic cell line to determine the localization of the VIR protein within the infected erythrocyte (iE). The export of the proteins into the cytosol of the iE could be detected, but in dependence of the developmental stage of the parasite. Only for one VIR protein no export has been detected; its signal was observed exclusively within the parasite. Furthermore, western blot analyses were performed to detect surface localization. For this purpose, the iE were treated with the enzyme trypsin, which degrades all proteins located on the surface of the erythrocyte. This sample was compared with a sample that was not treated with trypsin in the western blot analysis. However, only one of the 13 VIR proteins examined showed a decrease in signal intensity. Additionally, the binding properties of each transgenic *P. falciparum* cell line to the four human endothelial cell receptors CD36, ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin were characterized. CHO (chinese hamster ovary cells) cell lines were used, which express the receptor of interest on their surface as a GFP fusion protein. As comparison, a non-transfected *P. falciparum* strain culture was used. For five VIR proteins a binding to CHO-CD36 was detected, which differed significantly from the strain culture. For all other VIR proteins no significant binding to CHO-CD36 has been detected and no VIR protein could bind to any of the other three tested receptors.

The fact that *P. vivax* also appears to be responsible for severe malaria cases, it is of great importance to better understand this pathogen in order to understand the mechanisms. Based on this knowledge, it is hoped that it will then be possible to develop suitable therapies and possibly also a vaccine.

1 Einleitung

1.1 Malaria

Malaria ist eine Infektionserkrankung, ausgelöst durch Parasiten der Gattung *Plasmodium* spp., welche bei der Blutmahlzeit über den Speichel einer weiblichen *Anopheles*-Mücke übertragen werden (Ramasamy 2014). Erste Berichte über Malaria gab es schon in der Antike, beispielsweise durch den griechischen Arzt Hippokrates. Der Namensursprung von Malaria ist jedoch lateinisch und leitet sich von *mal aria* ab, was übersetzt schlechte Luft bedeutet (Cunha and Cunha 2008). Auch in Deutschland gab es immer wieder Fälle von Malaria, jedoch ist sie seit etwa Mitte des 20. Jhd. nicht mehr endemisch. Der Grund hierfür sind die Trockenlegung von Feuchtgebieten, wodurch die Brutplätze für Mücken weniger wurden, sowie die verbesserte medizinische Diagnostik und Versorgung (Frank et al. 2014).

Malaria kommt überwiegend in tropischen Regionen auf der ganzen Welt vor, wie in Abbildung 1 zu sehen ist. Weltweit leben ca. 3,75 Milliarden Menschen in Gebieten, in denen Malaria endemisch ist. Im Jahr 2018 gab es weltweit ca. 228 Millionen Fälle von Malaria, an deren Folgen ca. 405.000 Menschen verstorben sind. Die meisten Todesfälle kommen dabei bei der Personengruppe der unter 5-jährigen Kinder vor (ca. 272.000 Todesfälle) (WHO 2019).

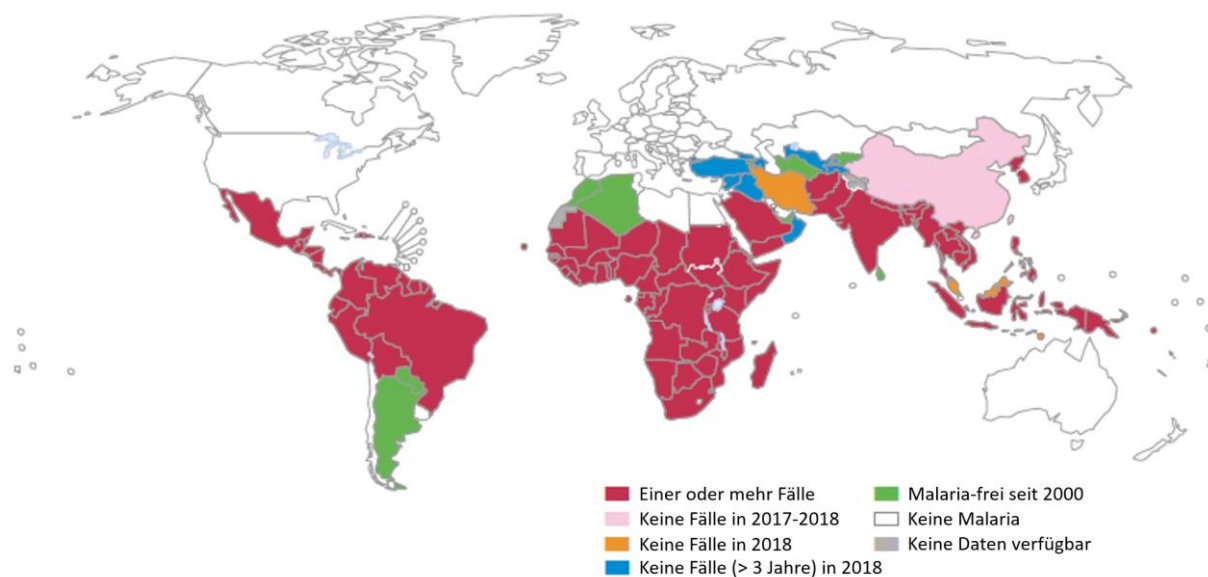


Abbildung 1: Weltweite Verbreitung von Malaria; World malaria report 2019, (WHO 2019).

Der Erreger der Malaria, sind Parasiten der Gattung *Plasmodium*. Es gibt ca. 200 Arten, jedoch sind bis jetzt nur fünf als humanpathogen beschrieben. Diese sind *P. falciparum*, *P.*

vivax, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. knowlesi* (Al-Mekhlafi et al. 2010, de Koning-Ward et al. 2016). Besonders hervorzuheben sind *P. falciparum* und *P. vivax*. Erstgenannter ist weltweit für ca. 97 % aller Malariaerkrankungen verantwortlich, wobei die meisten Infektionen (ca. 213 Millionen) in Afrika auftreten. Daneben ist noch *P. vivax* zu nennen, der außerhalb Afrikas für sehr viele Malariaerkrankungen verantwortlich ist (WHO 2019).

1.2 *Plasmodium vivax*

P. vivax ist der zweithäufigste Malaria-Erreger auf der Welt mit jährlich ca. 7,5 Millionen detektierten Malariafällen. Dieser Parasit ist besonders in Mittel- und Südamerika, sowie Asien verbreitet. Jedoch ist dieser Erreger für wesentlich weniger Todesfälle verantwortlich als *P. falciparum* (WHO 2019).

Der Parasit infiziert ausschließlich eine bestimmte Vorstufe der Erythrozyten, die Retikulozyten. Da diese jedoch nur 0,5-2,0 Prozent des peripheren Bluts im Menschen ausmachen, erreicht der Parasit keine hohen Parasitämie, wie beispielsweise *P. falciparum* (Galinski et al. 2013, Popovici and Ménard 2015). Dabei gibt es Diskussionen, ob die Infektion von Retikulozyten eine evolutionäre Anpassung ist, da durch die geringere Parasitämie die Letalität des Wirtes abnimmt und das Überleben und die Verbreitung des Parasiten wahrscheinlicher ist (Galinski et al. 2013). Bei der Betrachtung einer Weltkarte mit Infektionen von *P. vivax* fällt auf, dass es in Afrika nur sehr wenige Infektionen in Ländern südlich der Sahara gibt. Eine Erklärung dafür war das Fehlen des *Duffy-binding protein* auf der Oberfläche von Retikulozyten. Es wurde sehr lange angenommen, dass die Interaktionen zwischen dem *Duffy blood group antigen* und Chemokinen, wie beispielsweise Interleukin-8 bei der Invasion der Merozoiten in die Retikulozyten essenziell sind und es beim Fehlen dieses Proteins zu keiner Infektion kommt (Miller et al. 1976, Horuk et al. 1993, Gunalan et al. 2016). Jedoch gibt es seit wenigen Jahren Studien, in denen gezeigt wurde, dass es auch ohne diese Interaktion zu einer Invasion von *P. vivax* in die Retikulozyten kommt (Ménard et al. 2010, Zimmerman 2017). Eine mögliche Proteinfamilie, die für die Bindung des Parasiten an die Retikulozyten verantwortlich ist, sind die Retikulozyten-Bindungs-Proteine. Dabei konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass diese Proteine für die Bindung an Retikulozyten und Erythrozyten verantwortlich sind. Jedoch konnte noch nicht der entsprechende Bindungspartner auf dem Retikulozyten, bzw. Erythrozyten bestimmt werden (França et al. 2016, Gruszczuk et al. 2016, Han et al. 2016, Gupta et al. 2017).

Bei *P. vivax* sind alle Entwicklungsstadien des Parasiten im Blut sichtbar, bei *P. falciparum* dagegen nur die Parasiten im Ringstadium (Lopes et al. 2014, Barber et al. 2015, Adams and Mueller 2017). Daher passieren die mit *P. vivax* iE auch die Milz, welche u.a. die Aufgabe hat, alte oder deformierte Blutzellen aus dem Blutstrom heraus zu selektionieren. Damit dies nicht mit den infizierten Retikulozyten (iR) passiert, verändert der Parasit die Plastizität der Retikulozyten dahingehend, dass diese verformbarer werden. Dadurch können diese im Gegensatz zu *P. falciparum*, der die Membran der iE versteift, die Milz passieren (Suwanarusk et al. 2004, Handayani et al. 2009).

Eine weitere Besonderheit sind die sog. Schüffner'schen Tüpfelungen, sichtbar als kleine dunkle Granula im Zytoplasma der Retikulozyten. Diese sind Caveolae, welche von Vesikeln umgeben sind (Abbildung 2) (Aikawa et al. 1975). Jedoch konnte bis heute nicht geklärt werden, welche Aufgabe diese Vertiefungen auf der Zelloberfläche haben (Sherling and van Ooij 2016). Es wird jedoch vermutet, dass dieser Komplex entweder wichtig für die Aufnahme von Nährstoffen aus der Umgebung ist oder aber der Abgabe von Metaboliten dient (Aikawa et al. 1975, Matsumoto et al. 1988, Udagama et al. 1988).

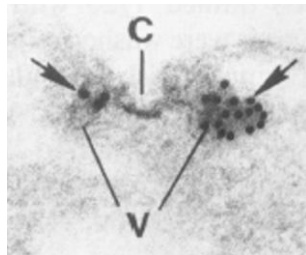


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von einer Schüffnerschen Tüpfelung von *P. vivax*. C: Caveolae; V: Vesikel, durch die Pfeile verdeutlicht; verändert nach (Udagama et al. 1988)

1.2.1 Lebenszyklus von *P. vivax*

Der Lebenszyklus von *Plasmodium* spp. beinhaltet zwei Wirte, einmal den Zwischenwirt, der Mensch und den Endwirt, die *Anopheles*-Mücke (Abbildung 3).

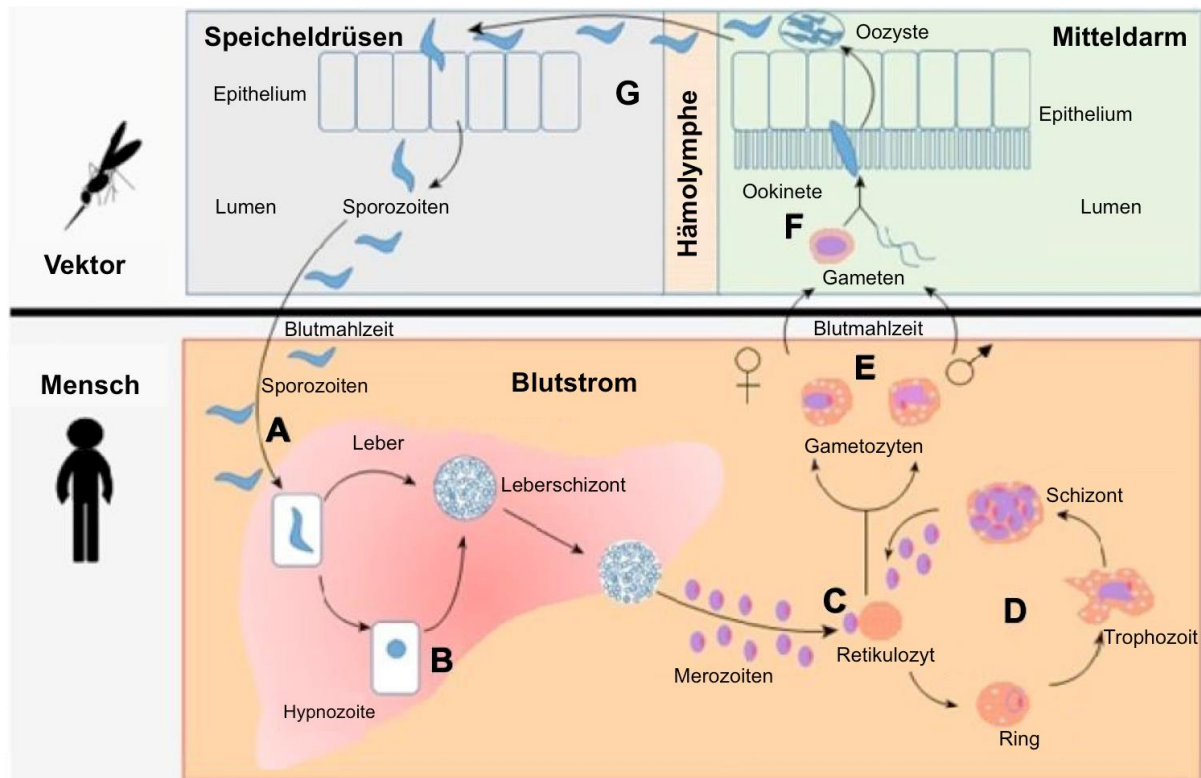


Abbildung 3: Lebenszyklus des Malaria-Erregers *P. vivax*; verändert nach (Popovici and Ménard 2015).

Die Übertragung des Parasiten auf den Menschen startet mit der Blutmahlzeit einer mit *P. vivax* infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke (Abbildung 3A). Dabei überträgt diese mit ihrem Speichel die Sporozoiten. Diese wandern innerhalb kürzester Zeit in die Leber, dringen dort in die Hepatozyten ein und entwickeln sich dann innerhalb von ca. 12 Tagen zu tausenden neuen Merozoiten weiter. Die Zellen, die noch von der Leberzellmembran umschlossen sind und die reifen Merozoiten beinhalten, werden als Merosome bezeichnet. Diese wandern in die Blutbahn, platzen und entlassen die Merozoiten in den Blutkreislauf (Abbildung 3C). Dort infizieren diese dann Retikulozyten. Ab diesem Punkt beginnt die Blutphase. Sofort nach der Infektion verändert der Parasit den Retikulozyten, um sich weiterentwickeln zu können. So wird die Elastizität des Retikulozyten erhöht und der Parasit bildet neue Zellstrukturen in der Wirtszelle aus, damit z.B. Nährstoffe aufgenommen werden können. Ein Beispiel für eine solche Zellstruktur sind die Schüffner'schen Tüpfelungen. Dabei durchläuft er in seiner 48 Stunden dauernden Entwicklung insgesamt drei verschiedene

Stadien: zuerst das Ringstadium, dann das Trophozoitenstadium und zuletzt das Schizontenstadium. Im letzten Stadium beginnt *P. vivax* nach 38-40 h mit der Segmentierung. Dabei teilt sich der Parasit und es bilden sich zwischen 8 und 32 neue Merozoiten. Wenn diese vollständig entwickelt sind, platzt die Zelle auf, die Merozoiten werden in den Blutstrom entlassen und infizieren neue Retikulozyten. Dieser Zyklus wird als asexuelle Phase bezeichnet (Abbildung 3D) (White et al. 2014, Ebstie et al. 2016, Price et al. 2007, Cowman et al. 2012, Galinski et al. 2013, Popovici and Ménard 2015).

Neben der asexuellen Phase gibt es noch die sexuelle Phase, diese beginnt mit der Bildung von Mikro- und Makrogameten im Menschen und endet mit der Bildung neuer infektiöser Sporozoiten in der Mücke. Die Gametozyten bilden sich bei *P. vivax* gleichzeitig mit der ersten asexuellen Phase aus einem kleinen Teil der Merozoiten (Abbildung 3E). Bei der nächsten Blutmahlzeit einer weiblichen *Anopheles*-Mücke nimmt diese dann die Gametozyten auf. Im Mitteldarm der Mücke verschmelzen die Mikro- und Makrogameten zu Gameten, entwickeln sich weiter und bilden dann die Ookineten (Abbildung 3F). Diese durchwandern das Epithelium des Darms und lagern sich an die Basallamina, welche sich an der Außenseite des Mitteldarmepithel befindet an und entwickeln sich dort weiter zu Oozysten. Innerhalb dieser Oozysten vervielfältigt sich der Parasit und bildet tausende neue Sporozoiten. Nach dem Aufplatzen der Oozysten wandern diese durch die Hämolymphe zu den Speicheldrüsen, durchdringen dort wieder das Epithelium um in die Speichelflüssigkeit zu gelangen, um bei der nächsten Blutmahlzeit auf den Menschen übertragen zu werden (Abbildung 3G). Damit ist der Lebenszyklus des Parasiten geschlossen (Gonzalez-Ceron et al. 2001, Bousema and Drakeley 2011, Galinski et al. 2013, Vallejo et al. 2016).

Eine Besonderheit, die nur bei den beiden Malaria-Erregern *P. vivax* und *P. ovale* vorkommt, ist die Bildung von Dauerformen in der Leber, Hypnozoiten genannt (Trager and Most 1963, Chin and Coatney 1971). Die Hepatozyten entwickeln sich nicht wie die anderen weiter zu Merozoiten, sondern bleiben in ihrer Ausgangsform. Erst zu einem späteren Zeitpunkt entwickeln sich die Hypnozoiten weiter zu Merozoiten und verursachen dadurch ein erneutes Auftreten der Malaria. Der Zeitpunkt kann zwischen wenigen Tagen bis hin zu Jahren variieren (Abbildung 3B). Es konnte auch noch nicht geklärt werden, was der Auslöser für die Weiterentwicklung ist (Hulden and Hulden 2011, Galinski et al. 2013, Battle et al. 2014, White et al. 2014, Dayananda et al. 2018). Diese Fähigkeit ist eine evolutionäre Anpassung an

kältere Regionen, in denen die Mücken nicht das ganze Jahr über vorkommen und Menschen stechen (Hulden et al. 2008).

1.2.2 Krankheitsbild, Verlaufsform und Behandlung

Das Krankheitsbild bei einer Malariaerkrankung ist sehr unterschiedlich. Sie kann bei schwachen Symptomen als leicht bezeichnet werden, es gibt aber auch eine schwere Verlaufsform, welche tödlich enden kann. Betroffen von einer Erkrankung sind Menschen jeden Alters, insbesondere jedoch Kinder unter 5 Jahren. Das häufigste Symptom ist Fieber (> 92 % aller Fälle), gefolgt von Schüttelfrost, Kopfschmerzen und Schweißausbrüchen. Des Weiteren kann es noch zu Bauchschmerzen, Erbrechen, leichten Durchfall oder trockenem Husten kommen (Trampuz et al. 2003, Laloo et al. 2016). Bei einer schweren Malaria sind häufige Komplikationen zerebrale Malaria, Lungenödem, Nierenversagen, schwere Anämie, sowie Azidose und Hypoglykämie (WHO 2000). Jedoch kommt die schwere Verlaufsform hauptsächlich bei Infektionen mit *P. falciparum* und *P. knowlesi* vor, eine *P. vivax* Infektion ist ohne Begleiterkrankung nur in sehr wenigen Fällen tödlich (Milner 2018).

Am charakteristischsten für eine symptomatische Malariaerkrankung sind die Fieberschübe. Bei *P. falciparum*, dem Erreger der *Malaria tropica*, treten die Fieberschübe unregelmäßig auf. Im Gegensatz dazu treten bei *P. vivax* die Fieberschübe alle 48 h auf (*Malaria tertiana*). Bei beiden Erregern ist der Grund für das Fieber das Aufplatzen der infizierten Erythrozyten im Schizontenstadium im asexuellen Zyklus (Price et al. 2007, Nerlich 2016, Molnár et al. 2018). Im Gegensatz zu *P. falciparum* bildet ein Teil von *P. vivax* in der Leber eine Dauerform, Hypnozoiten genannt, welche noch Monate bis Jahre später eine erneute Erkrankung verursachen kann (Imwong et al. 2007).

Bei der Behandlung der Malaria wird eine kombinierte Therapie eingesetzt, bei der mindestens zwei Medikamente verwendet werden, die unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen. Bei *P. falciparum* wird eine Artemisininderivat und ein weiteres Medikament verwendet und bei *P. vivax* Chloroquin und Primaquin (Basu and Sahi 2017).

1.3 Zytoadhäsion von *Plasmodium* spp.

Manche *Plasmodium*-Arten sind in der Lage sich an die Rezeptoren von Endothelzellen anzulagern, Zytoadhäsion genannt (Fatih et al. 2012, Jensen et al. 2020). Die verschiedenen Arten weisen dabei unterschiedlich starke Ausprägungen auf. Bei *P. falciparum* ist die Zytoadhäsion sehr ausgeprägt und am besten von allen Plasmodien-Arten untersucht,

während für *P. knowlesi* die Zytoadhäsion erst in einer Studie beschrieben wurde (Fatih et al. 2012, Lee et al. 2019). Hinweise auf eine Zytoadhäsion von *P. ovale* und *P. malariae* sind in der Literatur nicht zu finden. Auch von *P. vivax* wurde lange angenommen, dass dieser keine Zytoadhäsion ausbildet. Der Grund hierfür war, dass bei einer Malariaerkrankung von *P. vivax* nur leichte Symptome beschrieben wurden, eine Zytoadhäsion aber sehr häufig mit einer schweren Malariaerkrankung assoziiert wurde. Jedoch wurde das erste Mal von Carvalho und Kollegen beschrieben, dass mit *P. vivax* infizierte Retikulozyten (iR) aus Patientenproben an den Endothelzellrezeptor ICAM-1 binden (Carvalho et al. 2010).

Neben der Zytoadhäsion sind Plasmodien in der Lage, eine weitere Form der Anlagerung auszubilden, die Rosettierung. Bei dieser lagern sich infizierte und nicht-infizierte rote Blutkörperchen aneinander (Jensen et al. 2020).

1.3.1 Zytoadhäsion bei *P. falciparum*

Am besten beschrieben ist die Zytoadhäsion für *P. falciparum*. Dieser Stamm ist weltweit für die meisten Todesfälle durch die Malaria verantwortlich und die Zytoadhäsion wird als einer der Hauptfaktoren für diese Pathogenese angesehen (Smith et al. 2013, Jensen et al. 2020). Es wird angenommen, dass die Zytoadhäsion durch die Mitglieder der *variant surface antigens* (VSAs) vermittelt wird, die sich hauptsächlich aus drei großen Multigenfamilien zusammensetzen. Dies sind die Plasmodium falciparum *Erythrocyte Membrane Protein 1* (PfEMP1), die *Subtelomeric Variable Open Reading Frame* (STEVAR) Proteine und die *repetitive interspersed family* (RIFIN) Proteine (Howard et al. 1988, Chen et al. 1998, Niang et al. 2014, Goel et al. 2015). PfEMP1 können mit einer Vielzahl an Wirtsrezeptoren, Proteoglykanen und Glykosaminoglykane interagieren und eine Bindung vermitteln, die STEVAR-Proteine mit Glykophorin C und RIFIN mit dem Rote-Blutkörperchen Antigen Gruppe A (Rowe et al. 2009, Lee et al. 2019, Jensen et al. 2020).

Die Multigenfamilie der RIFIN besteht aus 150 – 200 Genen pro Parasitengenom und ist mit an der Rosettierung beteiligt (Goel et al. 2015, Saito et al. 2017). Des Weiteren wurde eine Interaktion dieser Proteine mit Wirtsrezeptoren nachgewiesen, welche an der Aktivierung des Immunsystems beteiligt sind. Dies bewirkt, dass die Immunsystemaktivierung unterdrückt wird (Saito et al. 2017). Daher wird vermutet, dass diese Proteine Teil der Immunevasion sind (Lee et al. 2019).

Auch die STEVOR-Proteine sind an der Rosettierung und der Immunevasion beteiligt, zusätzlich sind sie noch von Bedeutung bei der Merozoiteninvasion (Niang et al. 2009, Niang et al. 2014). Diese Multigenfamilie besteht aus 42 Genen, jedoch kann es Unterschiede in der Anzahl zwischen verschiedenen *P. falciparum*-Isolaten geben (Wichers et al. 2019).

Die am besten untersuchte Multigenfamilie der VSAs sind die PfEMP1 Proteine, welche von 60 Genen kodiert werden (Gardner et al. 2002). Die PfEMP1 sind in einer Domänenstruktur aufgebaut, bestehend aus den *cysteine-rich interdomain region* (CIDRs), von denen es drei Hauptklassen gibt, den *Duffy-binding-like* (DBL) Domänen, bestehend aus sieben Hauptklassen, sowie der konservierten *acidic intracellular segment* (ATS) Domäne. Diese Domänen kommen jedoch nicht zufällig hintereinander vor, sondern in einer definierten Abfolge, wobei bisher 21 verschiedene Domänenkassetten beschrieben wurden (Rask et al. 2010) Diese Kassetten binden an verschiedene Wirtszellrezeptoren, wobei die wichtigsten EPCR (engl. *endothelial protein c receptor*), CD36 und ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*) sind, aber auch an Nichtrezeptoren, wie CSA (Chondroitinsulfat A) (Lee et al. 2019, Jensen et al. 2020). Weiterhin ermöglicht der Aufbau aus Domänenkassetten eine Bindung an verschiedene Rezeptoren (Janes et al. 2011, Lennartz et al. 2017). Für die Bindung an CD36 sind insbesondere die CIDR α 2-6-Domänen verantwortlich. Im Genom von *P. falciparum* 3D7 konnten bei über 80 % der PfEMP1 CIDR-Domänen gefunden werden, welche die Bindung an CD36 vermitteln. Die Bindung an ICAM-1 wird durch einen Teil der DBL β -Domäne vermittelt (Smith 2014, Jensen et al. 2020). Im Parasiten wird immer nur ein Gen exprimiert, wodurch nur eine definierte PfEMP1-Population auf der Oberfläche des iE lokalisiert ist. Dies wird als *mutually exclusive expression* bezeichnet. Zusätzlich wechselt nach jedem Zyklus die Expression des entsprechenden PfEMP1-Gens, wodurch eine antigene Variation entsteht. Dadurch ist es für den Wirt schwieriger die Infektion zu bekämpfen und es kann eine langanhaltende chronische Infektion entstehen (Miller et al. 1994, Chen et al. 1998, Scherf et al. 1998, Jensen et al. 2020).

Die PfEMP1 sind jedoch nicht gleichmäßig über den iE verteilt, sondern clustern in Erhöhungen auf der Erythrozytenmembran, die sogenannten Knobs. Die Knobs bestehen aus mehreren Proteinen, wobei das wichtigste Protein KAHRP (*knob-associated, histidin rich protein*) ist (Watermeyer et al. 2016, Cutts et al. 2017, Looker et al. 2019). Ist die Bildung dieses Proteins gestört, findet keine Knob-Bildung mehr statt (Crabb et al. 1997).

P. falciparum ist zusätzlich in der Lage, eine Rosettierung auszubilden, bei der ebenfalls die drei Proteinfamilien PfEMP1, STEVOR und RIFIN von Bedeutung sind (Yam and Preiser 2017, Lee et al. 2019).

Eine weitere essenzielle Struktur, die die Proteine von *P. falciparum* aufweisen sind Exportsignale. Dies sind Abfolgen bestimmter Aminosäuren, die als Signal dienen, wodurch das entsprechende Protein an einen definierten Ort innerhalb der Zelle transportiert wird (Matthews et al. 2019). Das wichtigste Exportsignal ist PEXEL (engl. Plasmodium *export element*) oder auch VTS (engl. *vacuolar translocation signal*) genannt, welches aus der Aminosäuresequenz R_xL_xE/Q/D besteht, wobei das x eine beliebige Aminosäure sein kann und die fünfte Aminosäure entweder Glutaminsäure, Glutamin oder Asparaginsäure ist. Das PEXEL-Motiv befindet sich 20-30 Aminosäuren entfernt vom Signalpeptid des N-Terminus (Hiller et al. 2004, Marti et al. 2004). Vor dem Transport muss das Motiv jedoch erst prozessiert werden. Dabei erfolgt eine Spaltung zwischen dem Leucin und der zweiten beliebigen Aminosäure (R_xL_xE/Q/D) wodurch der sogenannte reife N-Terminus entsteht (Boddey et al. 2010, Russo et al. 2010). Dieser vermittelt den Export des Proteins, da gezeigt wurde, dass auch künstlich erzeugte reife N-Termini zu einem Export führen (Grüning et al. 2012). Jedoch kommt es auch zu einem Export von Proteinen in *P. falciparum*, die keine der vorherigen Exportsignale beinhalten. Diese werden als PNEPs (engl. *PEXEL negative exported proteins*) bezeichnet. Im Gegensatz zu den PEXEL-Proteinen, bei denen ein Aminosäure-Motiv entdeckt wurde, welches für die Prozessierung des Proteins von großer Bedeutung ist, konnte bei den PNEPs noch kein solches Aminosäure-Motiv gefunden werden. Die einzige Struktureigenschaft, die alle PNEPs aufweisen, ist eine Transmembrandomäne. Deswegen wird angenommen, dass diese für den Export essenziell ist (Spielmann and Gilberger 2010).

1.3.2 Zytoadhäsion bei *P. knowlesi*

Der zweite Malaria-Erreger, bei dem Zytoadhäsion vermutet wird, ist *P. knowlesi*. Für diesen Erreger konnten Fatih und Kollegen bisher als Einzige zeigen, dass aus Malariapatienten isolierte iE an ICAM-1, VCAM-1 und CD36 binden (Fatih et al. 2012). In einer anderen Studie wird von einem Patienten berichtet, der an einer schweren Malaria, ausgelöst durch *P. knowlesi*, gestorben ist. Dabei wurden sequestrierte iE u.a. im Gehirn gefunden (Cox-Singh et al. 2010). Weitere Fälle oder Studien, die eine Adhäsion dieses Parasiten zeigt, sind nicht bekannt.

1.3.3 Zytoadhäsion bei *P. vivax*

Von *P. vivax* wurde sehr lange angenommen, dass dieser Organismus nicht in der Lage ist zu zytoadhären (Lopes et al. 2014, Barber et al. 2015). Jedoch wurde in Studien festgestellt, dass die Menge an zirkulierenden iR im Schizontenstadium nicht in Korrelation steht zu der Menge an zirkulierenden Ringen und Trophozoiten (Lopes et al. 2014, Barber et al. 2015). Dafür wurde die Aktivität von zwei Laktat-Dehydrogenasen gemessen und mit der zuvor ermittelten Parasitämie verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Enzyme höher war, als durch die Parasitämie zulässig, wodurch angenommen wird, dass es einen Teil nicht zirkulierender Parasiten gibt (Barber et al. 2015).

Bei weiteren Studien konnte die Bindung von reifen *P. vivax* infizierten Erythrozyten (iE) an humanen Lungenendothelzellen, Gehirnendothelzellen von Totenkopffäffchen, Kryoschnitten von Plazentageweben von Schwangeren mit Malaria, sowie an immobilisierter Hyaluronsäure und immobilisiertem CSA nachgewiesen werden (Carvalho et al. 2010, Chotivanich et al. 2012, Lopes et al. 2014). Auch konnte die Bindung von iE einer transgenen *P. falciparum*-Zelllinie an ICAM-1 detektiert werden, welche ein spezifisches VIR-Protein synthetisierte. ICAM-1 wurde dabei durch transgene CHO-Zellen synthetisiert (Bernabeu et al. 2012). Eine Bindung von iE an CD36, wie sie für *P. falciparum* beschrieben ist, konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Carvalho et al. 2010). Es scheint jedoch regionale Unterschiede im Bindungsverhalten zu geben, da Patientenproben aus Thailand keine Bindung an ICAM-1 zeigten, Patientenproben aus Brasilien hingegen schon (Carvalho et al. 2010, Chotivanich et al. 2012). Des Weiteren scheint *P. vivax* vermehrt an Lungenerkrankungen beteiligt zu sein, da bei diesen Patienten vermehrt iR in der Lunge nachgewiesen wurden (Anstey et al. 2007, Maguire et al. 2007, Val et al. 2017). Jedoch besitzt *P. vivax* keine Proteine vergleichbar mit PfEMP1, welche für die Zytoadhäsion verantwortlich sein könnten. Er besitzt jedoch eine andere große Proteingruppe, die VIR Proteine, von denen postuliert wird, an der Adhäsion beteiligt zu sein (Bernabeu et al. 2012, Lopez et al. 2013). Daher wurde postuliert, dass Proteine dieser Genfamilie an der Adhäsion beteiligt sind, jedoch konnte bis jetzt erst für eines von drei untersuchten Proteinen eine Bindung an ICAM-1 gezeigt werden (Bernabeu et al. 2012).

P. vivax kann so wie *P. falciparum* eine Rosettierung ausbilden. Insbesondere wurde diese Form der Anlagerung für Patienten aus Thailand beschrieben, aber auch bei Patienten aus dem brasilianischem Amazonasgebiet (Udomsanpetch et al. 1995, Chotivanich et al. 1998, Chotivanich et al. 2012, Marín-Menéndez et al. 2013). Wieso *P. vivax* rosettiert, konnte noch

nicht endgültig geklärt werden, jedoch konnten Marín-Menéndez und Kollegen eine Korrelation zwischen der Rosettierung und einer Anämie feststellen (Marín-Menéndez et al. 2013).

1.4 Die *vir*-Multigenfamilie von *P. vivax*

Mit der *vir*-Multigenfamilie besitzt *P. vivax* eine Genfamilie, welche zu der *pir*-Genfamilie (engl. Plasmodium *interspersed repeats*) gezählt wird. Mehrere Plasmodien-Arten besitzen eine *pir*-Genfamilie, wie beispielsweise die *rif* in *P. falciparum* oder *kir* in *P. knowlesi*. Die Aufgaben der *pir*-Gene ist noch nicht vollständig geklärt, aber es wurde postuliert, dass sie an der Signalgebung beteiligt sind, ebenso am Transport und der Adhäsion (Cunningham et al. 2010).

Bei einer ersten Analyse des Genoms vom *P. vivax*-Stamm Sall wurden 346 subtelomerisch lokalisierte *vir*-Gene annotiert, inklusiver verkürzter Fragmente und Pseudogene, die in 12 Subfamilien eingeteilt wurden (del Portillo et al. 2001, Carlton et al. 2008, Fernandez-Becerra et al. 2009). Bei einer neueren *in silico*-Analyse durch Lopez und Kollegen mit demselben Sall-Genom konnten hingegen nur 295 *vir*-Gene als Mitglieder der *vir*-Multigenfamilie annotiert werden, welche in zehn Subklassen eingeteilt wurden (Lopez et al. 2013). Die Länge der Gene variiert zwischen 156-2316 bp und sie weisen zwischen 1-5 Exons auf. Des Weiteren wurden bei einer *in silico*-Analyse bei 171 Genen eine Transmembrandomäne gefunden und bei 160 ein Motiv, welches Ähnlichkeit mit einem Exportsignal aus *P. falciparum* hat (Carlton et al. 2008, Fernandez-Becerra et al. 2009). Die *vir*-Genfamilie ist eine sehr diverse Familie, da bei Strukturanalysen entdeckt wurde, dass manche Subklassen Ähnlichkeiten mit Proteinfamilien aus *P. falciparum* haben. So zeigen sich strukturelle Charakteristika zwischen der Subklasse A und Proteinen aus der SURFIN-Familie, für die eine Beteiligung an der Immunevasion postuliert wird. Strukturelle Charakteristika konnten auch zwischen der Subklasse D und einer Proteinfamilie, die in den Maurer'schen Spalten lokalisiert (*Pfmc-2tm*-Familie) gefunden werden (Merino et al. 2006, Carlton et al. 2008). *Pfmc-2tm* besitzen zwei Transmembrandomänen, die einen kleinen extrazellulären Loop an der Außenseite der Erythrozytenmembran bilden (Bachmann et al. 2012). Ein großer Unterschied zu der *var*-Multigenfamilie besteht jedoch darin, dass mehrere *vir*-Gene gleichzeitig exprimiert werden. Dadurch wird angenommen, dass die VIR-Proteine unterschiedliche Funktionen im iR übernehmen (Fernandez-Becerra et al. 2005).

1.5 Humane Endothelrezeptoren

Eine der wichtigsten Eigenschaften von *P. falciparum* für dessen Überleben ist die Zytoadhäsion an spezifische Oberflächenstrukturen des Menschen. Durch diese Bindungen entgeht der Parasit einer Milzpassage, wodurch er nicht aus dem Blutstrom herausgefiltert werden kann (David et al. 1983). Wie oben beschrieben ist der wichtigste Parasiten-eigene Bindungspartner die Proteine der PfEMP1-Familie (Pasternak and Dzikowski 2009). Diese Familie wurde bereits sehr ausführlich erforscht und es konnten einige Bindungspartner auf Seite des menschlichen Wirts identifiziert werden. Die wichtigsten Bindungspartner sind CD36, EPCR und ICAM-1. Daneben gibt es jedoch auch noch eine Vielzahl weiterer Bindungspartner, wie beispielsweise P-Selektin, VCAM-1, oder auch CSA (Duffy and Fried 1999, Rowe et al. 2009, Metwally et al. 2017).

Wie oben beschrieben wird auch von *P. vivax* angenommen, dass dieser eine Zytoadhäsion ausbilden kann (Lopes et al. 2014, Barber et al. 2015). Bisher wurden aber erst sehr wenige Bindungsstudien mit aus Patientenproben isolierten *P. vivax* iE oder ausgewählten VIR-Proteinen durchgeführt. Dabei wurden neben Bindungen an verschiedenen Endothelzellen aus u.a. Hirn oder Lunge auch Bindungen an Hyaluronsäure, CSA und ICAM-1 festgestellt (Carvalho et al. 2010, Bernabeu et al. 2012, Chotivanich et al. 2012, Lopes et al. 2014).

1.5.1 CD36

Der humane Endothelrezeptor CD36 (engl. *cluster of differentiation 36*) ist ein Membran-Glykoprotein bestehend aus einem Proteinstrang mit einer molekularen Masse von 88 kDa und er gehört zur Klasse B der *scavenger receptors* (Febbraio et al. 2001, Ohgami et al. 2001, Silverstein and Febbraio 2009). Er bildet eine Haarnadelstruktur mit einer langen Ektodomäne und zwei hydrophoben Transmembrandomänen (Abbildung 4) (Pepino et al. 2014, Wei et al. 2017). An ihm binden modifizierte Lipoproteine, Polyanione oder apoptotische Zellen. CD36 kann auf einer Vielzahl von Zellen gefunden werden, u.a. Monozyten, Makrophagen, dem Endothel oder dem Epithel (Greenwalt et al. 1992, Febbraio et al. 2001, Nicholson 2004). Als Liganden wurden modifizierte Phospholipide, langkettige Fettsäuren und Proteine mit Strukturähnlichkeiten zu Thrombospondin, aber auch mit *P. falciparum* iE detektiert (Febbraio et al. 2001, Li et al. 2010).

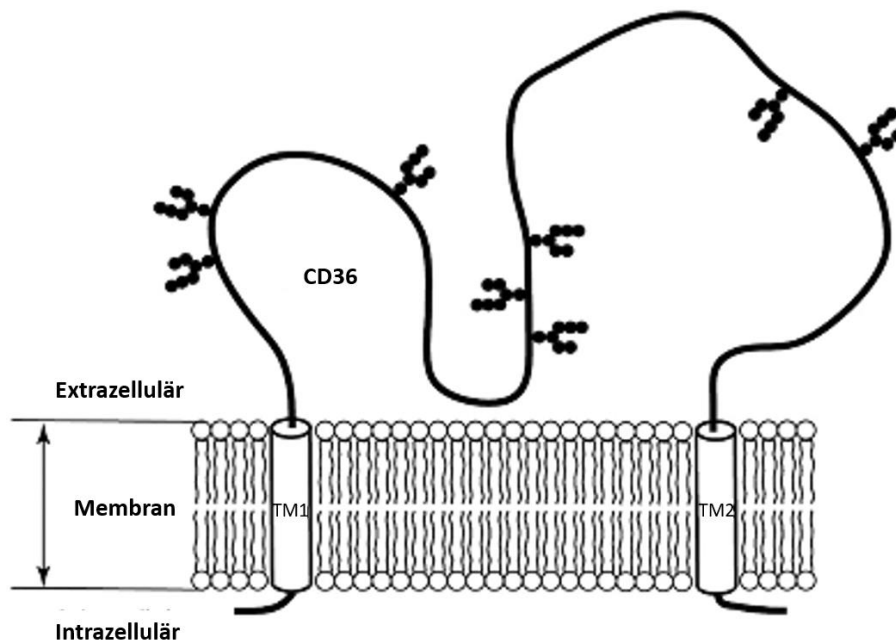


Abbildung 4: Schematische Darstellung von CD36; verändert nach (Wei et al. 2017). Das Protein besteht aus zwei Transmembrandomänen (TM1/TM2), sowie zwei kurzen intrazellulären Enden und einem langen extrazellulären Bereich.

Die Interaktion zwischen CD36 und *P. falciparum* iE ist sehr gut charakterisiert und CD36 wurde als einer der Hauptbindungspartner für PfEMP1 charakterisiert (Barnwell et al. 1989, Baruch et al. 1995, Patel et al. 2004). Allerdings konnten bisher keine Korrelation zwischen der Bindung von CD36 und der Entstehung einer zerebralen Malaria gezeigt werden (Penha-Gonçalves 2019).

Obwohl CD36 einer der Hauptbindungspartner von *P. falciparum* ist, konnten bis jetzt keine Hinweise gefunden werden, dass auch *P. vivax* iR an diesen Rezeptor binden (Carvalho et al. 2010). Zwar wurde in der Studie von Bernabeu und Kollegen eine Bindung unter statischen Bedingungen detektiert, jedoch konnte die Bindung nicht durch spezifische Antikörper inhibiert werden. Auch unter Fluss-Bedingungen konnte keine Bindung festgestellt werden (Bernabeu et al. 2012).

1.5.2 ICAM-1

Das zweite Transmembran-Glykoprotein ICAM-1 (engl. *intracellular adhesion molecule 1*) hat eine Masse von 60 kDa im nicht-glykosylierten Zustand und zwischen 80-114 kDa, wenn es glykosyliert ist. Es kommt auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen, inklusive Endothelzellen vor (van de Stolpe and van der Saag 1996). Bei einer Entzündungsreaktion wird ICAM-1 hochreguliert und vermehrt auf der Oberfläche präsentiert, dies geschieht durch u.a. die proinflammatorischen Zytokine TNF- α (Tumornekrosefaktor α) oder IL-1 β (Interleukin-1 β) (Berendt et al. 1992).

Bei Autopsien von Patienten, die an Malaria verstorben sind, wurde entdeckt, dass bei diesen viele *P. falciparum* iE an ICAM-1 gebunden haben. Daher wird angenommen, dass es eine Korrelation zwischen der Bindung der iE an ICAM-1 und einer schweren Malaria, insbesondere der zerebralen Malaria gibt (Turner et al. 1994, Armah et al. 2005). Auch bei *in-vitro* Untersuchungen konnte diese Bindung gezeigt werden (Newbold et al. 1999, Ochola et al. 2011). Jedoch gibt es auch Forschungsergebnisse, die keine Korrelation zwischen einer Bindung und einer schweren Malaria feststellen konnten (Ockenhouse et al. 1991, Kun et al. 1999).

Für *P. vivax* konnte bisher erst in zwei Publikationen eine Bindung unter statischen Bedingungen an ICAM-1 nachgewiesen werden. In der Studie von Carvalho und Kollegen wurden aus Patientenproben isolierte iE hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften untersucht und eine Bindung an ICAM-1 nachgewiesen (Carvalho et al. 2010). Bei einer zweiten Studie wurden transgene *P. falciparum*-Zelllinien hergestellt, welche jeweils ein *vir*-Gen exprimierten. Diese Transfektanten wurden ebenfalls hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens charakterisiert und eine Transfektante zeigte eine Bindung an ICAM-1. Zusätzlich konnte die Bindung durch spezifische Antikörper inhibiert werden und es wurde auch eine Bindung unter Flussbedingungen detektiert (Bernabeu et al. 2012). Bei der Untersuchung der Bindung unter Flussbedingung wird versucht, den Blutstrom im menschlichen Körper zu simulieren.

1.5.3 VCAM-1

VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*) oder auch CD106 ist ein Protein der Immunglobulin-Superfamilie. Es hat eine molekulare Masse von 90 kDa und besteht aus einer extrazellulären, einer intrazellulären und einer Transmembrandomäne (Osborn et al. 1989). Es kommt überwiegend auf Endothelzellen, z.B. in der Lunge vor und wird im Zuge einer inflammatorischen Reaktion auf diesen präsentiert. Dort vermittelt VCAM-1 das Rollen von verschiedenen Leukozytenarten, wodurch diese aus dem Blut in das Gewebe eindringen können (Ley et al. 2007, Wittchen 2009, Abdala-Valencia et al. 2018, Kong et al. 2018).

Mit *P. falciparum* iE können an VCAM-1 binden, wie u.a. Untersuchungen mit Patientenproben aus Thailand zeigen konnten (Ockenhouse et al. 1992, Hisaeda et al. 2005). In der Literatur finden sich keine Studien, bei denen das Bindungsverhalten von mit *P. vivax* iR untersucht wurde. Bei der Studie von Bernabeu und Kollegen konnte zwar eine Bindung unter statischen Bedingungen von einer transgenen Zelllinie festgestellt werden, jedoch lies diese

sich nicht durch spezifische Antikörper inhibieren und auch unter Fluss-Bedingungen wurde keine Bindung detektiert (Bernabeu et al. 2012).

1.5.4 P-Selektin

P-Selektin ist Bestandteil der Selektin-Familie, eine Familie, deren Mitglieder an der Adhäsion von Leukozyten an der Membranoberfläche beteiligt sind (Moore et al. 1995, Zuchtriegel et al. 2015). Das Protein hat je nach Glykosylierung eine molekulare Masse zwischen 120-140 kDa und ist aus drei distinkten Motiven aufgebaut: einem Lektin, einer epidermalen Wachstumsfaktor-Domäne (engl. *epidermal growth factor*) und einer Anzahl von Konsensus-Wiederholungseinheiten (engl. *short consensus repeats*) (Lasky 1991, Geng et al. 2004). Weiterhin weist das Protein eine Transmembrandomäne auf, wobei das C-terminale Ende intrazellulär lokalisiert ist (Geng et al. 2004). P-Selektin befindet sich nicht kontinuierlich auf der Oberfläche von Endothelzellen, wie beispielsweise der Lunge, sondern nur bei einer inflammatorischen Reaktion, ausgelöst durch verschiedene inflammatorische Stimuli, u.a. TNF- α . Ansonsten ist das Protein bei Endothelzellen in Weibel-Palade Körperchen gelagert und bei inaktivierten Thrombozyten in α -Granula. Bei einer inflammatorischen Antwort wird P-Selektin an die Oberfläche der Zelle transportiert und vermittelt dort die Rekrutierung von Leukozyten über das sich auf den Leukozyten befindliche Glykoprotein PSGL-1 (engl. *P-selectin glycoprotein ligand-1*) (Geng 1995, Vestweber and Blanks 1999, Geng et al. 2004). Dies ist der Erstkontakt zwischen Zelle und Leukozyt, woraufhin dieser erst noch etwas über die Zelle rollt, bis eine feste Bindung an P-Selektin und anderen Rezeptoren entsteht (Vestweber and Blanks 1999, Zuchtriegel et al. 2015).

1998 wurde von Ho und Kollegen das erste Mal beschrieben, dass P-Selektin auch ein Rezeptor für *P. falciparum* iE ist und Senczuk und Kollegen konnten zeigen, dass PfEMP1 der Ligand ist (Ho et al. 1998, Senczuk et al. 2001). Dies konnte auch in neueren Studien bestätigt werden (Metwally et al. 2017). Eine Interaktion zwischen P-Selektin und *P. vivax* iR wurde bisher noch nicht beschrieben.

1.6 Zielsetzung

Die Zytoadhäsion von *Plasmodium falciparum* iE ist bereits sehr gut untersucht und es wurden verschiedene Proteinfamilien identifiziert, die an der Adhäsion beteiligt sind, sowie die entsprechenden Rezeptoren auf Wirtsseite. Für *P. vivax*, den zweithäufigsten Malariaerreger, wurde für lange Zeit keine Zytoadhäsion beschrieben. Die Frage, ob mit

P. vivax infizierten Retikulozyten eine Zytoadhäsion ausbilden, wurde sehr lange vernachlässigt, da im Gegensatz zu *P. falciparum* alle Entwicklungsstadien des Parasiten im Blut sichtbar sind. Jedoch wurde in neueren Studien gezeigt, dass die Menge an zirkulierenden infizierten Retikulozyten im Schizontenstadium nicht in Korrelation zu der Menge an zirkulierenden infizierten Retikulozyten im Ring- und Trophozoitenstadium steht. Daher wird angenommen, dass sich ein geringer Anteil, der sich im Schizontenstadium befindlichen infizierten Retikulozyten an das Endothel anlagert. Auch konnte schon eine Genfamilie identifiziert werden, von der vermutet wird, dass deren kodierten Proteine an der Zytoadhäsion beteiligt sind. Es handelt sich hierbei um die 295 Mitglieder umfassende *vir*-Genfamilie. Es wurden auch Adhäsionsversuche mit ausgewählten VIR-Proteinen durchgeführt und eine Bindung an ICAM-1 nachgewiesen.

Daher sollen in der vorliegenden Arbeit ausgewählte VIR-Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation und Bindungseigenschaften untersucht werden. Dafür wurden 12 Kandidaten ausgewählt, die eine Transmembrandomäne aufweisen. Ein weiterer Kandidat soll als Kontrolle dienen, da dieser keine Transmembrandomäne besitzt. Dafür sollen *P. falciparum* Transfektanten generiert werden, die die ausgewählten *vir*-Gene exprimieren, um anschließend mittels Immunfluoreszenzanalyse die Lokalisation der entsprechenden VIR-Proteine innerhalb des infizierten Erythrozyten zu detektieren. Von allen Kandidaten wird die Bindung unter statischen Bedingungen an vier ausgewählten Rezeptoren (CD36, ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin) getestet. Wird bei einem VIR-Protein eine Bindung detektiert, so soll diese Bindung im Anschluss an dem jeweiligen Rezeptor unter Fluss-Bedingungen analysiert werden.

2 Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Nucleofector™ 2B Device	Lonza Group Ltd, Schweiz
Innova 4200	New Brunswick Scientific, USA
Mr. Frosty	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Nitrogen Container	Thermo Fisher Scientific, USA
PerfectBlue Gel System	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web S	VWR International, LLC, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Function Line CO ₂ Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau
RH Basic	Janke & Kunkel IKA, Staufen
EVOS XL	Thermo Fisher Scientific, USA
EVOS FL Auto	Thermo Fisher Scientific, USA
Axioscope M1	Zeiss, Jena
cx31	Olympus, Hamburg
Orca C4742-95	Hamamatsu Phototonics K.K., Japan
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Langenselbold
CG840	Sartorius AG, Göttingen
2 /20/ 200/1000µL Pipetten	Gilson, USA
S1 Pipettierhilfe	Thermo Scientific, Langenselbold
Ibidi Pump System-10902	ibidi GmbH, Martinsried
Class II BSC	ESCO Labculture®, Singapur
EPS301	Amersham pharmacia biotech, USA
Vario MACSTM	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
VF2	Janke & Kunkel IKA, Staufen
SPO 51	Scaltec, Göttingen
Sartorius BP210S	Sartorius AG, Göttingen

SW 20	Julabo, Seelbach
Rotina 48 centrifuge	Hettich Technology, Tuttlingen
Rotor JA-10; Rotor JA-12	Beckman Coulter, Krefeld
Curix 60	AGFA, Belgien
Mikro rapid/K	Hettich Technology, Tuttlingen
CL-GPKR Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Forma 700 Series	Thermo Scientific, Langenselbold
Primus 25	MWG-Biotech, Ebersbach
Centrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
µ-Slide 0,8 Luer ibiTreat	ibidi GmbH, Martinsried
Cryoröhrchen 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht
DakoCytomation Pen	Biocompare, Dänemark
Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific, USA
Deckgläschen 24 x 65 mm, Dicke 0,13-0,16 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Gasflasche (1 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 94 % N ₂)	Air liquid, Düsseldorf
Gelkassetten	Thermo Fisher Scientific, USA
Gewebekulturflasche 250 ml (T75)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflasche 50 ml (T25)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Hydrophobische Filter, 0,45µm, Steril	Thermo Fisher Scientific, USA
Hyperfilm-ECL	GE Healthcare, USA
MACS® columns CS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikro-Schraubröhre 2 ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht
Millipore Stericup Vacuum Filter	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose blotting, Amersham 0,45 µm	GE Healthcare, USA
Membrane Protran, Amersham 0,45 µm	GE Healthcare, USA
Parafilm	Bemis, USA)
Pasteurpipette	Brand, Wertheim
Petrischalen mit Noppen, 60 mm, 92mm, 140 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Perfusion Set yellow/green	ibidi GmbH, Martinsried

Pipettenspitzen 1-10/20-200/100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter 1-10/20-200/100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Plastikpipetten 5/10/25 ml	Corning, USA
Transfektionsküvetten 0,2 cm	Bio-Rad, München
1,5 ml Safe-lock Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
2 ml Safe-lock Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Nunc™ 14 ml "round-bottom" Röhrchen, PS	Falcon, USA
15 ml Konische Zentrifugationsröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Konische Zentrifugationsröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Platte 24 Wellm Standard F	Sarstedt, Nümbrecht
Cover Slips 13 mm	Sarstedt, Nümbrecht
3-Wege-Hahn Discofix	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
20 mL Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterican 0,9 mm Kanüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
PCR SingleCap 8er Softstrip 0,2 mL	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien, deren Bezugsquelle nicht aufgeführt wurden von der Firma Sigma-Aldrich (USA), Carl Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Accutase	PAN-Biotech, Aidenbach
Albumax II	Gibco, Life Technologies, USA
Ampicillin	Roche, Mannheim
BSA - engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>	Biomol, Hamburg
Dako „ <i>Fluorescence Mounting Medium</i> “	Agilent Technologies, USA
Desoxynucleotide (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific, USA
DTT (1,4,-dithiothreitol)	Biomol, Hamburg
Fötale Rinderserum, Hitze inaktiviert	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
G153 Dev	AGFA, Belgien
G 354	AGFA, Belgien
GeneRuler™ 1kb Plus	Thermo Fisher Scientific, USA

Gentamicin 40mg/ml	Ratiopharm, Ulm
G-418 BC (Neomycin) (50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Ham's F12	PAN Biotech, Aidenbach
Humanes Blut (0+)	UKE, Hamburg
Immersionsöl 518 N	Zeiss, Jena
MOWIOL 4-88	Calbiochem
Leica CV Mount	Leica Biosystems, Nußloch
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	PAN Biotech, Aidenbach
Proteaseinhibitor-Mix	Roche, Mannheim
RPMI + L-Glutamin; + 25 mM HEPES; -NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt
UltraPure™ agarose	Thermo Fisher Scientific, USA
Wasser für Molekularbiologie (Ampuwa)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
10x CutSmart™ Puffer	New England BioLabs, USA
6x Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.4 Kits

Name	Hersteller
In-Fusion® HD Cloning Plus	Takara Bio Inc., Japan
NucleoBond® Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren

2.1.5 Software und Datenbank

Software/Datenbank	Hersteller
Axio Vision Rel. 4.7	Zeiss, Jena
Protein Blast	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ImageJ 1.52p	National Institute of Health, USA
InterPro	ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/
Mac Vector 13.5.5 (39)	MacVector, Inc., USA
My Samples 2.0	mydata GmbH, Langenhagen
PlasmoDB	EuPathDB Project Team, USA

Prism® (Version 8)	GraphPad, USA
PumpControl Software (Version 1.5.2)	Ibidi, Martinsried
SignalP 4.1	bioware.ucd.ie
TMHMM 2.0	cbs.dtu.dk/services/TMHMM
3of5	dkfz.de/mga2/3of5

2.1.6 Antikörper

In Tabelle 1 und Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Erst- und Zweitantikörper aufgelistet. Folgende Versuche wurden mit diesen durchgeführt: Immunfluoreszenzassay (IFA) und Western Blot-Analyse (WB). In der IFA wurde der Farbstoff Hoechst33342 (Sigma-Aldrich, USA) für die Kernfärbung verwendet.

Tabelle 1: Liste mit den verwendeten Erstantikörpern

Name	Organismus	Verdünnung		Quelle
		IFA	WB	
α -HA, High Affinity	Ratte (monoklonal)	1:100	1:3000	Hoffmann-LA Roche, Schweiz
α -SBP1	Maus	1:1000	1:2000	BNITM (AG Spielmann)
α -Spectrin	Kaninchen	1:200		Sigma-Aldrich, USA
α -ATS (6H1)	Maus (monoklonal)	1:10000	1:500	The Walter & Eliza Hall Institute, Australia
α -ETRAP5	Kaninchen	1:400		BNITM, (AG Spielmann)

Tabelle 2: Liste mit den verwendeten Zweitantikörpern

Name	Organismus	Konjugat	Verdünnung		Quelle
			IFA	WB	
α -Ratte	Ziege	HRP		1:5000	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen	Schwein	HRP		1:10000	Dako A/S, Dänemark
α -Ratte, IgG (H+L)	Esel	Alexa	1:400		ThermoFischer
		Fluor 594			Scientific, USA
α -Maus, IgG (H+L)	Ziege	Alexa	1:400	1:5000	ThermoFischer
		Fluor 488			Scientific, USA
α -Kaninchen	Ziege	Alexa	1:400		ThermoFischer
		Fluor 488			Scientific, USA

2.1.7 Vektoren

Tabelle 3: Liste der für die Transfektion verwendeten Vektoren

Name	Quelle
pARL1-GFP	AG Spielmann, BNITM
pARL1-3xHA	AG Spielmann, BNITM

2.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 4: Liste der verwendeten Oligonukleotide (Hersteller: Eurofins, Ebersberg)

Name	Sequenz (5' → 3')
pARL1_forw	CTATAGATTATTTTCATTGCTTCACA
pARL1_rew	CAGTTATAAATAACAATCAATTGG
InF-3x-HA -060690F	CTCGACCCCGGGATGGTACCATGGGAAGTATAACT
InF-3x-HA-060690R	GATATTCCATCCTAGGTTGTGTTGAATAAGCAAA
InF-3x-HA-060690Seq	GTGGAAATCCAGGACATAGAAATCCACCACC
InF-3x-HA-101560F	CTCGACCCCGGGATGGTACCATGGAAGAACCATGT
InF-3x-HA-101560R	GATATTCCATCCTAGGTGCTGGATAAATATGG
InF-3x-HA-101560Seq	GCTTCAAGATTAAAGGCAAGTAGATTAAGCACC
InF-3x-HA -113230F	CTCGACCCCGGGATGGTACCATGGAAAAAGATCC
InF-3x-HA-113230R	GATATTCCATCCTAGGACTATTACTTAATAAAGAT
InF-3x-HA-113230Seq	GTGATACAAGTCAAAGTGGAAATATGTTAATAGG
InF-3x-HA -115475F	CCCCGGGATGGTACCATGGAAGAAGAGGATTTG

InF-3x-HA-115475R TTTACTCATCCTAGGTCCTGAACTACTCTGGGAAGAAGCTTG

2.1.9 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 5: Liste der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Name	Erkennungssequenz	Hersteller
AvrII	5'...C ↓ CTAGG...3' 3'...GGATC ↑ C...5'	New England BioLabs, USA
KpnI	5'...GGTAC ↓ C...3' 3'...C ↑ CATGG...5'	New England BioLabs, USA
XhoI	5'...C ↓ TCGAG...3' 3'...GAGCT ↑ C...5'	New England BioLabs, USA

2.1.10 Synthetische VIR-Gene

PVX_000020 wurde durch spezifische Oligonukleotide in einer Vorstudie direkt aus einem *P. vivax*-Isolat mittels PCR amplifiziert.

Die synthetischen *vir*-Gene *pvx_050690*, *pvx_060690*, *pvx_093715*, *pvx_101560*, *pvx_113230* und *pvx_115475* wurden von invitrogen GeneArt Synthesis (Thermo Fisher Scientific, USA) hergestellt. Die anschließende Klonierung in den pARL1-Vektor erfolgte mittels InFusion-Technik. Als Vorlage wurde *P. vivax* Sal-I verwendet.

Die synthetischen *vir*-Gene *PVX_068690*, *pvx_077695*, *pvx_081850*, *pvx_096925*, *pvx_097525* und *pvx_107235* wurden von der Firma GenScript (USA) synthetisiert. Des Weiteren wurde die Klonierung der *vir*-Gene in den pARL1-3xHA-Vektor ebenfalls von dieser Firma durchgeführt.

2.1.11 Puffer, Medien und andere Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung entweder steril filtriert oder autoklaviert.

2.1.11.1 *P. falciparum*-Zellkultur

RPMI mit Albumax II (Komplettmedium)

RPMI	15,87 g/L
Natriumbicarbonat	1 g/L
D-(+)-Glucose-Monohydrat	2 g/L
Albumax II	5 g/L
Hypoxanthin	0,028 g/L
(Gelöst in 5 mL, 1N NaOH)	
Gentamycin	0,2 g/L
Add 1 L Aqua dest.; pH 7,2	

Malaria Freezing Solution (MFS)

D-Sorbitol	30 g/L
NaCl	6,5 g/L
Add 1 L Aqua dest.	
Glycerol (autoklaviert)	280 mL/L

90 %ige Percolllösung

Percoll-Stocklösung	45 mL
10x PBS	5 mL

WR99210 Stocklösung

WR99210	20 mM
In 1 mL DMSO	
Vor Verwendung 1:1000 der WR99210-Stocklösung in RPMI mit Albumax II	

Blut (sterile, humane Erythrozyten, Blutgruppe 0+)

10x PBS für die *P. falciparum* Zellkultur

NaCl	1,37 M
KCl	28,6 mM
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	80,6 mM
KO ₂ PO ₄	14,7 mM
Add 1 L Aqua dest.; pH 7,4	

Synchronisierungslösung

(5 %iges D-Sorbitol)

D-Sorbitol	25 g/L
Add 500 mL Aqua dest.	

Malaria Thawing Solution (MTS)

NaCl	35 g/L
Add 1 L Aqua dest.	

60 %ige Percolllösung

90 %ige Percolllösung	6,7 mL
D-Sorbitol	0,8 g
Zellkulturmedium	3,3 mL

Bindungsmedium

RPMI 1640	16,4 g/L
Glucose (wasserfrei)	20 g/L
Add 1L Aqua dest.; pH 7,2	

Giemsa-Färbelösung

Giemsa-Stocklösung	10 %
Add 100 mL Aqua dest.	

2.1.11.2 CHO-Zellkultur

Zellkulturmedium (Komplettmedium)

Ham's F12 mit L-Glutamin und 25 mM
 HEPES 500 mL
 Fetales Kälberserum 50 mL
 (inaktiviert bei 56 °C für 45 min)
 Penicillin/Streptomycin Mix 5 mL
 (100x)

10x PBS für die CHO-Zellkultur

NaCl 1,37 M
 KCl 27 mM
 Na₂HPO₄ (wasserfrei) 101 mM
 KH₂PO₄ 18 mM
 Add 1 L Aqua dest.; pH 7,4

Einfrierlösung für CHO-Zellen

CHO-Zellkulturmedium 45 mL
 DMSO (10 % - steril) 5 mL

2.1.11.3 Puffer und Lösungen

50x TAE-Puffer

Tris (pur) 2 M
 Natriumacetate 250 mM
 Na₂-EDTA (wasserfrei) 100 mM
 Add 2 L Aqua dest.

TB-Puffer

Na₂PO₄ 90 mM
 KCl 5 mM
 CaCl₂ 0,15 mM
 HEPES 50 mM
 pH 7,3

TE-Puffer

Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM
 EDTA 1 mM

10x TBS

Tris-HCl pH 7,5 0,5 M
 NaCl 1,5 M

Stripping-Puffer

Glycin pH 2,5 0,2 M
 DTT 50 mM
 Tween20 0,05 % (v/v)

10x TBE

Tris 892 mM
 Borsäure 890 mM
 Na₂EDTA, pH 8,0 20 mM

LB-Medium

LB-Medium (Lennox) 20 g/L
 Add 1 L Aqua dest.

LB-Agar

LB-Agar (Lennox) 35 g/L
 Add 1 L Aqua dest.

10x Kathodenpuffer

Tris	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,1 % (w/v)
pH 8,25	

Coomassie-Färbelösung

Methanol	45 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R	0,05 % (w/v)

ECL-Lösung A

Tris-HCl pH 8,6	100 mM
Luminal	50 mg

Add 200 mL Aqua dest.

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

Tris-Pure	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
pH 6,8	

10x SDS-Elektrophoresepuffer

SDS	1 % (w/v)
Tris	250 mM
Glycin	1,92 M

Weiser Puffer

Na ₂ HPO ₄	2,18 g
KH ₂ HPO ₄	0,98 g

Add 2L Aqua des.; pH 7,0

TBS-Tween

0,05 % Tween20 (v/v) in 1x TBS

10x Anodenpuffer

Tris	0,2 M
pH 8,9	

Coomassie-Entfärbelösung

Methanol	45 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
Aqua dest.	45 % (v/v)

ECL-Lösung B

DMSO	10 mL
Parahydroxycoumarinsäure	11 mg

SDS-PAGE-Trenngelpuffer

Tris-Pure	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
pH 8,8	

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 Transferpuffer

Glycin	960 mM
Tris pH 8,3	125 mM
SDS	0,2 % (w/v)

Vor Gebrauch 20 % Methanol (v/v) zugeben

2.1.12 *E. coli*-Stämme

E. coli Stella-Zellen (Takara Bio. Inc., Japan)

One Shot™ TOP10 E.coli (Invotrogen, USA)

2.1.13 *P. falciparum*-Stämme

3D7-Stamm (AG Spielmann, BNITM, Hamburg)

2.1.14 CHO-Zelllinien

Name	Vektor	Konjugat
CHO-745-AcGFP-Klon3	pAcGFP-N1	-
CHO-745-CD36-AcGFP-Klon3	pAcGFP-N1	CD36
CHO-745-ICAM-1-AcGFP	pAcGFP-N1	ICAM-1
CHO-VCAM-1-AcGFP	pAcGFP-N1	VCAM-1
CHO-745-P-Selektin-AcGFP-Klon4	pAcGFP-N1	P-Selektin

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 *Plasmodium falciparum* Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von *P. falciparum*

Die Kultivierung des Laborstamms *P. falciparum* 3D7-BNI erfolgte in Petrischalen mit einem Volumen von 5 mL, 10 mL oder 20 mL. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 0,5 % Albumax II verwendet. Der Hämatokritwert betrug 5 %, verwendet wurde Blut mit der Blutgruppe 0+. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und einer Gaszusammensetzung von 1 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid und 94 % Stickstoff. Das Medium wurde mindestens jeden dritten Tag gewechselt, bei einer Parasitämie von > 5 % erfolgte der Wechsel täglich.

2.2.1.2 Giemsa-Färbung

Für die Bestimmung der Parasitämie sowie des Entwicklungsstadium des Parasiten, wurden Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet, ca. 20 Sekunden in Methanol fixiert und anschließend für mindestens 10 min in einer 10 %igen Giemsalösung angefärbt. Im Anschluss wurde die Färbelösung abgewaschen, die Ausstriche luftgetrocknet und mittels eines Lichtmikroskops untersucht.

2.2.1.3 Synchronisierung von *P. falciparum* mittels Sorbitol

Um die *P. falciparum*-Kultur zu synchronisieren, wurde der Zuckeralkohol Sorbitol verwendet. Dafür wurde die Kultur für 5 min bei 800 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit dem 6-fachen Volumen in vorgewärmten 5 %igen Sorbitol resuspendiert. Die Kultur wurde für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und regelmäßig geschüttelt. Im Anschluss wurde für 5 min bei 800 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment einmal mit Kulturmedium gewaschen. Die weitergehende Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.1.4 Anreicherung der Parasiten mittels MACS-Säule

P. falciparum nutzt u.a. das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin als Nährstoffquelle. Dabei wird dieses zu Hämozin degradiert, welches Fe(III) enthält. Dieses ist magnetisch und ermöglicht eine Anreicherung der reiferen Parasitenstadien mittels eines Magneten. In dieser Arbeit wurde ein Vario MACS™ Magnet der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die *P. falciparum* Kultur hatte mindestens eine Parasitämie von 5 % und ein Volumen von 40 mL. Am Magneten wurde eine MACS CS-Säule befestigt, die über einen Dreiweghahn mit einer Kanüle (0,8 mm) sowie einer 20 mL-Spritze verbunden war. Für die Äquilibrierung der Säule wurde entweder PBS/ 1% BSA (Kontrolle der Oberflächenlokalisation mittels Trypsin-Behandlung, Kapitel 2.2.1.9) oder auf 37 °C vorgewärmtes Bindungsmedium (Bindungsexperimente unter Flussbedingungen, Kapitel 2.3.13) verwendet. Die Spritze wurde mit der entsprechenden Lösung befüllt und die Säule durch vorsichtiges Auf- und Abziehen der Spritze äquilibriert, wobei alle Luftblasen entfernt wurden. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde auf ca. 1 Tropfen pro Sekunde eingestellt und anschließend die Parasitenkultur auf die Säule geladen. Nach Durchfluss der Kultur wurde die Säule mit 50 mL der entsprechenden Lösung (PBS/1 % BSA oder Bindungsmedium) gewaschen, ohne dass die Säule trocken lief. Vor der Elution der reifen Parasiten wurde die Säule vom Magneten gelöst, um 180° gedreht und mit der Öffnung in ein Zentrifugenröhrchen (50 mL) gehalten. Für die Elution wurde das in der Spritze verbliebene Volumen (20 mL) in die Säule injiziert. Zur Kontrolle der Qualität wurde eine Giemsa-Färbung durchgeführt und für die Quantität eine Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.1.5 Anreicherung der Parasiten mittels Percoll-Gradient

Neben der Anreicherung der Parasiten mittels MACS-Säule ist es auch möglich diese mittels eines Percoll-Gradienten aufzutrennen. Dabei ist es möglich, nach Trophozoiten, Schizonten, Merozoiten und Zelltrümmern zu selektionieren. Für die Transfektion von *P. falciparum* mittels Elektroporation (Kapitel 2.2.1.6) wurden Schizonten benötigt. Diese befinden sich nach dem Zentrifugieren zwischen den beiden Phasen. Dafür wurden 4 mL einer 60 %igen Percoll-Lösung langsam am Rand in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) pipettiert. Die Kultur (Parasitämie > 5 %) wurden in 8 mL Kulturmedium resuspendiert und vorsichtig auf die Percoll-Lösung gegeben. Anschließend wurde für 6 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis 1 cm über der bräunlichen Phase abgenommen und dann die braune Phase vollständig in eine neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nachfolgend wurde die Percoll-Lösung durch 1x Waschen mit Kulturmedium entfernt. Der Überstand wurde fast vollständig verworfen und das Sediment mit den isolierten Schizonten wurde für die Transfektion verwendet (Kapitel 2.2.1.6).

2.2.1.6 Transfektion von *P. falciparum* mittels Elektroporation

Mit der Transfektion wird der Prozess bezeichnet, bei dem Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle eingebracht wird. In dieser Arbeit wurde das Protokoll für die Transfektion von zirkulären Plasmiden in den Kern von *P. falciparum* nach Moon und Kollegen verwendet (Moon et al. 2013). Für die Transfektion wurden 50 µg Plasmid-DNA in 10 µL TE-Puffer resuspendiert und mit 90 µL TB-Puffer verdünnt. Von den isolierten Schizonten wurden 15 µL zu der verdünnten Plasmid-DNA, gemischt und in eine 0,2 cm Transfektionsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 310 V und 950 µF mit Hilfe des Nucleofector™ 2b Device der Firma Lonza, Schweiz. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß, welches vorher mit 500 µL vorgewärmten Kulturmedium und 300 µL frischem Blut (0+) befüllt worden ist, überführt und für 30 min bei 37 °C und 650 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in 5 mL aufgenommen und in eine Petrischale überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben. Der Selektionsmarker wurde nach 24 h hinzugegeben.

2.2.1.7 Einfrieren von *P. falciparum*-Dauerstabilaten

Für die Herstellung von Dauerstabilaten wurde eine Parasitenkultur verwendet, die eine möglichst hohe Parasitämie (Ringstadium) aufwies. Diese wurde für 5 min bei 800 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in dem 4-fachen Volumen vorgewärmter *Malaria freezing solution* (MFS) resuspendiert und dann in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte unter kontrollierten Bedingungen (1 °C pro Minute) über Nacht bei -80 °C. Die langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.1.8 Auftauen von *P. falciparum*-Dauerstabilaten

Um die Dauerstabilate aufzutauen wurden diese im 37 °C-Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) überführt und das Kryoröhrchen mit der gleichen Menge vorgewärmten *Malaria Thawing Solution* (MTS) nachgespült und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Kultur wurde 5 min bei 800 x g zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Das Sediment wurde anschließend zweimal mit je 1 mL MTS gewaschen. Dann wurde das Sediment in 5 mL Kulturmedium resuspendiert und unter Standardbedingungen kultiviert.

2.2.1.9 Kontrolle der Oberflächenlokalisierung mittels Trypsin-Behandlung

Um zu überprüfen, ob die untersuchten VIR-Proteine an der Oberfläche der iE lokalisieren, wurden ein tryptischer Verdau der Oberflächenproteine durchgeführt. Trypsin ist eine Protease, die Peptidbindungen selektiv nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet. Bei einer anschließenden Western Blot-Analyse kann dann ein möglicher Unterschied in der Signalintensität zwischen Kontrolle und mit Trypsin behandelte Probe nachgewiesen werden.

Per MACS angereicherte Parasiten (Kapitel 2.2.1.4) wurden dreimal mit 1x PBS gewaschen und die Zellen in 1x PBS so resuspendiert, dass sich eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ μ L ergab. In allen nachfolgenden Schritten wurde die Flüssigkeitsmenge immer so gewählt, dass die Zellzahl 1×10^6 Zellen/ μ L betrug. Dann wurde die Probe gleichmäßig auf zwei 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt. Die eine Probe wurde 10 min bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in PBS versetzt mit 1 mg/mL Trypsin resuspendiert. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit Trypsininhibitor (2 mg/mL in PBS) gestoppt (5 min, auf Eis). Währenddessen wurde die zweite Probe die ganze Zeit auf Eis gelagert. Alle nachfolgenden

Schritte wurden für beide Proben gleich durchgeführt. Die Proben wurden 10 min bei 4 °C und 2000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in HEPES-Puffer (pH 7,2) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C im Heizblock wieder aufgetaut, dies erfolgte dreimal. Im Anschluss wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 8000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde die Probe in 2x Lämmli-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Probe mit Proteinase-Inhibitorenmix M (100x) versetzt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2 CHO-Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung von CHO-Zellen

Für die CHO-Zellen wurden zwei verschiedene Gewebekulturflaschen verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Grundfläche unterschieden (T25 = 25 cm²; T75 = 75 cm²), aber beide für adhären-wachsende Zellen geeignet sind. Für die T25-Flasche wurden 5 mL Kulturmedium verwendet und für die T75-Flasche 15 mL, die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Wachstum der Zellen (Konfluenz) wurde mit einem Inversmikroskop kontrolliert und um die Vitalität zu erhalten spätestens jeden dritten Tag verdünnt. Dafür wurde das verbrauchte Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit vorgewärmten 1x CHO-PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen wurde Accutase auf diese gegeben (T25-Flasche = 300 µL; T75-Flasche = 1000 µL) und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnten die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst werden und die Accutase wurde mit Kulturmedium inhibiert. Die Verdünnung erfolgte in Abhängigkeit der Konfluenz und betrug zwischen 1:2 und 1:30. Die Flaschen wurden wieder mit frischem Kulturmedium aufgefüllt und zu transgenen CHO-Zelllinien Neomycin (G418; 50 mg/mL; Endkonz. 0,7 mg/mL) gegeben.

2.2.2.2 Einfrieren von CHO-Dauerstabilaten

Für die Herstellung von Dauerstabilaten wurden Zellkulturflaschen verwendet, die eine möglichst hohe Konfluenz an CHO-Zellen aufwiesen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Accutase abgelöst, in 5 mL (T25), bzw. 10 mL (T75) Zellkulturmedium resuspendiert, zentrifugiert (5 min, 300 x g) und der Überstand verworfen. In Abhängigkeit von der Größe des Sediments wurde dieses in 3 – 8 mL CHO-Einfrierlösung resuspendiert und als 1 mL Aliquots in Kryoröhrchen eingefroren. Das Einfrieren bei -80 °C erfolgte in

speziellen Behältern, die eine langsame Abkühlung bewirken (1 °C pro Minute), für die Langzeitlagerung wurden die Zellen anschließend in Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.2.3 Auftauen von CHO-Dauerstabilaten

Die Dauerstabilate wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde vollständig in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) überführt und mit 1 mL vorgewärmten Kulturmedium nachgespült. Das Zentrifugenröhrchen wurde dann auf 10 mL mit Kulturmedium aufgefüllt und für 2 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 5 mL Kulturmedium resuspendiert, in eine T25-Kulturflasche überführt und transgene CHO-Zelllinien mit Neomycin versetzt. Die Kultur wurde dann nach Standardbedingungen kultiviert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die DNA-Amplifikation wurde mittels PCR durchgeführt. Im Nachfolgenden ist der Reaktionsansatz für 20 µL aufgeführt:

DNA-Matrize	1 µL
Oligonukleotide <i>forward</i> (10 µM)	2 µL
Oligonukleotide <i>reverse</i> (10 µM)	2 µL
dNTPS (je 2,5 µL)	2 µL
<i>5x Green Go Taq Flexi Buffer</i>	4 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
<i>Go Taq DNA-Polymerase</i> (5 U/ µL)	0,2 µL
Nuklease-freies Wasser	7,3 µL
<hr/>	
Gesamtvolumen	20 µL

Die verwendeten Temperaturen und Zeiten für die einzelnen PCR sind in der nachfolgenden Auflistung aufgeführt.

Parameter der PCR für PVX_115475.

95 °C	2 min	}	30 Zyklen
95 °C	45 sek		
56 °C	30 sek		
68 °C	1 min 10 sek		
72 °C	10 min		

Parameter der PCR für PVX_060690, PVX101560 und PVX_113230.

95 °C	2 min	}	30 Zyklen
95 °C	45 sek		
56 °C	30 sek		
68 °C	2 min 10 sek		
72 °C	10 min		

2.3.2 Restriktionsverdau

Mittels des Restriktionsverdaus wurde überprüft, ob das in den pARL1-Vektor ligierte DNA-Fragmente die korrekte Größe aufwies und die Klonierung erfolgreich war. Dafür wurden Enzyme der Firma *New England Biolabs GmbH* verwendet. Im nachfolgenden ist der Reaktionsansatz aufgeführt:

pARL1-Vektor mit Zielgen	2 µL
Enzym 1	1 µL
Enzym 2	1 µL
<i>10x CutSmart Buffer</i>	1 µL
Nuklease-freies Wasser	5 µL
Gesamtvolumen	10 µL

Verwendet wurden folgende Restriktionsenzyme in Kombination:

- KpnI + AvrII (Zielgen)
- KpnI + XhoI (Zielgen + 3x-HA-Tag)

Die Reaktionen fanden bei 37 °C im Heizblock für 1,5 h. Sollte der Vektor im Anschluss für die Ligation verwendet werden, erfolgte die Reaktion über Nacht.

2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden DNA-Fragmente auf Grund ihrer Größe aufgetrennt, in dieser Arbeit erfolgte dies zu analytischen und präparativen Zwecken. Die Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst, wobei dessen Konzentration in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentgröße entweder 1 % oder 2 % (w/v) betrug. Für die spätere Visualisierung

unter UV-Licht wurde die Agarose mit Ethidiumbromid (0,1 µg/mL) versetzt. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer (Thermo Fischer Scientific, USA) versetzt. In jede Vertiefungen des Gels wurde eine Probe pipettiert, zusätzlich dazu in einer weiteren Spur der Marker *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fischer Scientific, USA). Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet und eine Spannung von 100 Volt an das Gel angelegt. Die Laufzeit variierte nach Konzentration der Agarose, sowie nach der Größe des DNA-Fragments.

2.3.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Bei dieser Methode wird die in einem Agarosegel aufgetrennte DNA aus dem Gel extrahiert, wobei unerwünschte Nebenprodukte oder Enzyme im Gel verbleiben. Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des Kits *NucleoSpin PCR and Gel Clean-Up* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben.

2.3.5 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der Sequenzierung wurde überprüft, ob das DNA-Fragment die korrekte Nukleotidsequenz aufweist oder es beispielsweise während der PCR zu einer Mutation oder Deletion kam. Dafür wurden 12 µL Vektor (pARL1_3x-HA + Zielgen) mit 3 µL eines für die Sequenzierung geeigneten Oligonukleotids in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vermischt. Die Sequenzierung wurde durch die Firma Microsynth AG, Schweiz nach Sanger durchgeführt. Nach Erhalt der Daten wurden diese mit Hilfe des Programms MacVector (Vers. 13.5.5 (39)) mit der Originalsequenz verglichen.

2.3.6 Ethanolfällung

Da für die Transfektion von *P. falciparum* eine definierte Menge an DNA (50 µg) benötigt wurde, musste diese mittels Ethanol präzipitiert und in 10 µL TE-Puffer resuspendiert werden. Mit Hilfe der DNA-Konzentration wurde errechnet, welches Volumen vom Großansatz eingesetzt werden musste. Dazu wurde 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat, pH 5,4 und das dreifache Volumen 100 % Ethanol dazu gegeben und gut vermischt. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 14 000 × g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Sediment wurde 50 µL 70 %iger Ethanol gegeben und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment luftgetrocknet. Anschließend wurden 10 µL TE-Puffer dazu gegeben und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.7 Klonierung mittels InFusion-Technik

Für dieses Experiment wurde das *InFusion HD Cloning Kit* der Firma Takara Bio Inc., Japan verwendet. Es wurde das beiliegende Protokoll verwendet, jedoch wurde nur die Hälfte des angegebenen Ansatzes verwendet.

2.3.8 Transformation

Bei der Transformation wird fremde Plasmid-DNA mittels eines Hitzeschocks in einen chemisch-kompetenten *E. coli*-Stamm eingebracht. Verwendet wurden die *E. coli*-Zellen, die dem *InFusion HD Cloning Kit* beilagen, sowie das Plasmid, welches mittels InFusion-Technik hergestellt worden ist. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 50 μL in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 μL des *InFusion*-Ansatzes vermischt. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 45 sek in einen 42 °C warmen Heizblock gestellt und abschließend wieder für 5 min aus Eis gelagert. Zu der Suspension wurden dann 500 μL vorgewärmtes SOK-Medium gegeben und 1 h bei 37 °C und 800 rpm im Heizblock inkubiert. Danach wurde die Probe 1 min bei 12 000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 100 μL LB-Medium resuspendiert. Davon wurden 25 μL auf eine LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Selektionsmarker wurde das Antibiotikum Ampicillin verwendet, da der pARL1-Vektor eine Ampicillinresistenz vermittelt.

2.3.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zu analysierende Proteine wurden auf Grund ihrer Masse in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. In Tabelle 6 ist die Zusammensetzung der Gele aufgelistet.

Tabelle 6: Zusammensetzung der unterschiedlichen Trenn- und Sammelgele zur Größentrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE und Tricin-Gelen.

	SDS-PAGE				Tricin-Gel	
	6 %iges Trenngel	10 %iges Trenngel	12 %iges Trenngel	5 %iges Sammelgel	Trenngel	Sammelgel
Wasser	6,22	4,65	3,9	3,05	0,5	3,20
30 % Acrylamid 2K Mix 37,5:1 (mL)	2,25	3,25	4,5	0,65	-	-
30 % Acrylamid 2K Mix 49:1 (mL)	-	-	-	-	3,25	-
30 % Acrylamid 2K Mix 32:1 (mL)	-	-	-	-	-	0,65
Glycerin (mL)	-	-	-	-	1,5	-
SDS- Trenngelpuffer pH 8,8 (mL)	2,82	2,82	2,82	-	-	-
SDS- Sammelgelpuffer pH 6,8 (mL)	-	-	-	1,25	-	-
3x Gelpuffer pH 8,45 (mL)	-	-	-	-	2,25	1,15
25 % APS (µL)	75	75	75	25	25	25
TEMED (µL)	15	15	15	5	7,5	7,5

Für die Analyse von Proteinen mit einer erwarteten Masse von unter 40 kDa wurden Tricin-Gele verwendet, bei allen anderen Proteinen wurde ein 6 %, 10 % oder 12 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele (SDS PAGE) verwendet. Zu den vorher erzeugten Proben (Kapitel 2.2.1.9) wurden 100 mM DTT (1M) gegeben und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die SDS-PAGE erfolgte in 1x SDS-Elektrophoresepuffer. Je verwendetes Gel wurde eine Stromstärke von 20 mA verwendet bis die Lauffront das Sammelgel durchwandert hat, dann wurde die Stromstärke auf 40 mA je Gel erhöht.

2.3.10 Western Blot-Analyse

Mittels der Western Blot-Analyse und unter Zuhilfenahme von spezifischen Antikörpern kann ein bestimmtes Protein detektiert werden. Dafür wurden elektrophoretisch getrennte Proteine (Kapitel 2.3.9) mit 1x Transferpuffer auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dies erfolgte bei einer Stromstärke von 400 mA, die Zeit variierte zwischen 1 und 2 h, in Abhängigkeit der Proteinmasse. Ob der Transfer erfolgreich war, konnte mittels des *Prestained Protein Ladder* (Thermo Fischer) überprüft werden. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten in einem Zentrifugenröhrchen (50 mL) auf einem Rollschüttler. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran für 30 min in 5 % Milchpulver (1x TBS-Puffer) inkubiert. Der primäre Antikörper, gelöst in TBS/5 % Milchpulver wurde über Nacht bei 4 °C zusammen mit der Membran. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit 1x TBS-Tween 20 erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper für 2h bei RT. Im Anschluss wurde die Membran zwei für 10 min mit 1x TBS-Tween 20 gewaschen, sowie einmal abschließend für 10 min nur mit TBS. Für die Entwicklung mit ECL-Lösung wurden 5 mL ECL-Lösung A mit 500 µL ECL-Lösung B und 1,5 µL 30 %igem H₂O₂ vermischt und für 2 min bei RT auf die Membran gegeben. Das Chemolumineszenz-Signal wurde mit einem Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, USA) detektiert. Sollte die Membran für eine weitere Antikörper-Analyse verwendet werden, wurde die Membran zweimal in Stripping-Puffer bei 55 °C für 1 h inkubiert, dazwischen und am Ende dreimal mit 1x TBS gewaschen. Nach erneuter Blockierung der Membran mit 1x TBS/5 % Milchpulver konnte ein neuer Primärantikörper auf die Membran gegeben werden.

2.3.11 Immunfluoreszenzanalyse

Bei der Immunfluoreszenzanalyse (IFA) werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Antikörper verwendet, um Proteine innerhalb einer fixierten Probe im Fluoreszenzmikroskop zu visualisieren. Dabei wurden in diesem Versuchsaufbau zwei verschiedene Proteine gleichzeitig lokalisiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die beiden Erstantikörper aus verschiedenen Organismen kamen und die Zweitantikörper mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren. Die verwendeten Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung in 1x PBS/1 % BSA sind in Tabelle 1 und **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** aufgeführt. Für den IFA wurden Ausstriche der jeweiligen Parasitenkultur angefertigt, luftgetrocknet und anschließend für 30 min bei RT in Aceton

fixiert. Mittels eines Silikonstiftes (DakoCytomation, USA) wurde der Ausstrich in vier gleichgroße Felder aufgeteilt. Jedes einzelne Feld wurde mit 100 μ L 1x PBS 10 min rehydriert und anschließend 60 μ L der jeweiligen Primärantikörperlösung, verdünnt in 1x PBS/1% BSA auf jedes Feld gegeben. Die Inkubationsdauer betrug 2 h in einer abgedunkelten feuchten Kammer. Danach wurde die Lösung abpipettiert und dreimal für je 10 min mit PBS auf einem Tischschüttler gewaschen. Anschließend wurde auf jedes Feld der entsprechende Zweitantikörper verdünnt in 1x PBS/1% BSA gegeben und zusätzlich noch der Kernfarbstoff Hoechst 33342 (1:500). Die Inkubationsdauer des Zweitantikörpers betrug 1 h, ebenfalls in einer abgedunkelten feuchten Kammer. Nach der Inkubation wurde der Ausstrich wie vorher beschrieben gewaschen, auf jedes Feld ein kleiner Tropfen MOWIOL gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Die Ausstriche wurden getrocknet und bis zur Auswertung im Kühlschrank gelagert. Für die Mikroskopie wurde das Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop M1 mit einer 100x/1,4 Immersionsölinse verwendet, sowie eine Hamamatsu Orca C4742-95 Kamera und das Zeiss Axiovision Programm. Für die Bildbearbeitung wurde das Programm ImageJ (National Institute of Health, USA) verwendet.

2.3.12 Bindungsexperimente unter statischen Bedingungen

Mit dieser Methode ist es möglich, eine quantitative Aussage darüber treffen zu können, in welchem Umfang die *Plasmodien*-Parasiten an einen spezifischen Rezeptor binden. Als Rezeptoren wurden entweder CD 36 oder ICAM-1 verwendet, die von transgenen CHO-Zellen synthetisiert wurden. Gekoppelt waren diese Proteine mit einem GFP, wodurch es möglich war, die korrekte Proteinherstellung in den Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop zu kontrollieren. Als Negativkontrolle wurde eine CHO-Zelllinie verwendet, die mit einem Vektor transfiziert worden ist, in dem sich nur das *gfp*-Gen, aber kein Rezeptorgen befand (CHO-GFP). Für dieses Experiment wurde eine hoch synchronisierte Parasitenkultur verwendet, bei der die Parasiten ein Alter zwischen 28 und 30 Stunden aufwiesen. 48 h vor dem Bindungsexperiment wurden die CHO-Zellen als Triplikat in einer Platte mit 24 Vertiefungen ausgesät. Das Volumen pro Vertiefung betrug, falls nicht anders angegeben, 500 μ L. Dabei befand sich in jeder Vertiefung ein rundes Deckgläschen, welches 30 min mit 1 % Gelatine gelöst in 1x PBS überschichtet wurde. Zusätzlich wurde pro Parasiten-Zelllinie noch eine T25-Flasche mit CHO-GFP-Zellen ausgesät (Präabsorptionsflasche). Die Zellzahl pro Vertiefung betrug $1,5 \times 10^4$ Zellen, resuspendiert in Bindungsmedium. Am Tag des

Bindungsversuchs wurde die Parasitämie, sowie die Zellzahl der Plasmodien bestimmt und diese in Bindungsmedium so verdünnt, dass die Parasitämie 5 % betrug. Zusätzlich wurde noch frisches Blut hinzu gegeben, so dass der Hämatokritwert bei 1 % lag. Die Lösung wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurden die Präabsorptionsflaschen mit 4 mL Bindungsmedium gewaschen, für 5 min bei 37 °C inkubiert und das Medium anschließend wieder abgesaugt. Dann wurden die Parasiten in die Flasche gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert, wobei die Flasche alle 15 min vorsichtig geschwenkt wurde. Nach 45 min wurde das Medium aus den Platten mit den CHO-Zellen abgesaugt und diese mit Bindungsmedium für mind. 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die präabsorbierten Parasiten in die jeweiligen Vertiefung mit den CHO-Zellen gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert, wobei wieder alle 15 min die Platte vorsichtig geschwenkt wurde. Während der Inkubationszeit wurde eine neue Platte vorbereitet, in die pro Vertiefungen 600 µL Bindungsmedium pipettiert wurden. Diese Platte wurde in einem 45 ° Winkel fixiert. Danach wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette aus den Vertiefungen geholt, in Bechergläsern, gefüllt mit Bindungsmedium, vorsichtig gewaschen und dann für 45 min bei RT mit der bewachsenen Seite nach unten in die vorbereitete Platte gelegt. Im Anschluss wurden die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach oben in eine neue Platte überführt und mit 1 % Glutaraldehyd (verdünnt in 1x PBS) überschichtet. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei RT. Die Glutaraldehydverdünnung wurde abgesaugt und die Zellen mit einer Giemsa-Färbelösung (1:10 verdünnt in weißem Puffer) 15 min bei RT gefärbt. Danach wurden die Zellen durch dreimaliges eintauchen in Aqua dest. gewaschen und luftgetrocknet. Die Deckgläschen wurden dann mit einem Tropfen *CV Leica Mounting Solution* mit der bewachsenen Seite nach unten zeigend auf einem Objektträger fixiert und über Nacht getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop, wobei ermittelt wurde, wie viele infizierte Erythrozyten an 100 CHO-Zellen gebunden haben. Als Kontrollen, dass keine unspezifischen Bindungen an den CHO-Zellen stattgefunden haben, wurden Deckgläschen, bewachsen mit CHO-GFP verwendet; für die Positivkontrolle wurde eine nicht transfizierte 3D7-Zelllinie verwendet, deren Bindungskapazität bekannt war.

2.3.13 Bindungsexperimente unter Flussbedingungen

Diese Methode wurde verwendet, um die Bindungseigenschaften der iE der verschiedenen Transfektanten an einen ausgewählten Endothelzellrezeptor zu

charakterisieren. In dieser Arbeit wurde der unidirektionale Laminarfluss untersucht. Daher steht in dieser Arbeit der Begriff Flussbedingung für die unterschiedlichen Flussraten (mL/s). Um die Flussbedingung weiter zu definieren, wurde die Scherkraft verwendet. Dieses ist die Kraft erzeugt durch den Fluss, welche auf die Zellen wirkt. Dabei stehen die Flussrate und die Scherkraft in direkter Korrelation, steigt die Flussrate, so steigt auch die Scherkraft. Die Scherkraft wird in dyn/cm² angegeben.

Für die Durchführung der Experimente wurde das *Flow Chamber System* der Firma ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland) verwendet. Dieses System ermöglicht einen kontinuierlichen unidirektionalen Laminarfluss bei verschiedenen wählbaren Parametern. Für die Steuerung wurde die *PumpControl Software* der Firma ibidi GmbH verwendet.

Als Rezeptor wurde CD36 verwendet, welcher von transgenen CHO-Zellen synthetisiert wurde. Für diese Experimente wurden synchrone iE im Trophozoitenstadium (ca. 28 h nach Invasion) verwendet. 48 h vor dem Experiment wurden transfizierte CHO-Zellen ohne Rezeptorgen in einer T75-Flasche so ausgesät, dass am Tag des Versuchs die Konfluenz bei ca. 80 % lag. Zusätzlich wurden $1,5 \times 10^5$ CHO-CD36-Zellen in einer Flusskammer (μ -Slide 0,8 Luer ibiTreat) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Kulturmedium enthielt den Selektionsmarker G418 (50 mg/mL). Das Kulturmedium wurde bis zum Versuchstag morgens und abends gewechselt.

Am Tag vor der Versuchsdurchführung wurden die Schläuche und die Reservoir zusammen gebaut und für 24 h bei 37 °C vorgewärmt. Zusätzlich wurden noch ca. 50 mL Bindungsmedium für 24 h bei 37 °C warmgestellt.

Am Tag der Versuchsdurchführung wurden die iE im Trophozoitenstadium wie in Kapitel 2.2.1.4 mittels MACS-Säule angereichert. Anschließend wurden die isolierten iE in Bindungsmedium aufgenommen und zusammen mit den CHO-GFP-Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert (Präabsorption). Währenddessen wurden 12,6 mL Bindungsmedium in die Reservoir gegeben, die Flusseinheit an das Pumpensystem angeschlossen und bei 50 mbar gespült, bis alle Blasen aus dem System entfernt waren. Nach der Präabsorption wurden die pARL_PVX_XXXXXX^{HA} iE in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 800 × g zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt, 1×10^7 Zellen in 1 mL aufgenommen und in ein Reservoir gefüllt. Die Flusskammer wurde an die Flusseinheit angeschlossen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Schläuche mit einer Klemme verschlossen waren. Die Klemme wurde bis Versuchsbeginn nicht mehr gelöst. Die Flusskammer wurde in das

Inversmikroskop eingebaut, die Klammer gelöst und die Kontrollprogramme für das Pumpensystem und für das Inversmikroskop gleichzeitig gestartet. Für das Programm der Flusseinheit wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Parameter eingestellt. Für die Aufnahmen wurde das Inversmikroskop EVOS FL Auto (Thermo Fisher Scientific, USA) mit einer 20x/0,5 Linse verwendet. Das Mikroskop hat alle 5 Sekunden ein Bild aufgenommen.

Tabelle 7: Parameter für die Bindungsexperimente

Scherkraft [dyn/cm ²]	6	4	3	2	1,5	0,9
Zeit [min]	10	10	10	10	10	30

2.3.14 Auswertung der Bindungsversuche

Die Bindungsversuche wurden mit dem Programm ImageJ (Version 1.52p, National Institutes of Health, USA) ausgewertet. Dafür wurden die Einzelbilder in das Programm als Bildsequenz importiert und die Anzahl der gebundenen iE gezählt, die bei jeder Scherkraft gebunden haben.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, VIR-Proteine zu identifizieren, welche die Bindung zwischen Endothelzellrezeptoren und infizierten Erythrozyten vermitteln. Eine solche Interaktion konnte bisher erst einmal für ein VIR-Protein nachgewiesen werden (Bernabeu et al. 2012). Deshalb wurde in dieser Arbeit von 13 VIR-Proteine die Lokalisation innerhalb des infizierten Erythrozyten ermittelt, Untersuchungen zu einer möglichen Oberflächenlokalisierung durchgeführt, sowie die Bindungseigenschaften an vier Endothelzellrezeptoren untersucht.














Da eine kontinuierliche Zellkultur mit *P. vivax* nicht möglich ist, wurde entschieden, eine *P. falciparum* Stammkultur 3D7 mit je einem VIR-Proteine zu transfizieren. Dafür wurde das jeweilige VIR-Protein in den sog. pARL1-Vektor kloniert, welcher eine Promotorregion hat, die von *P. falciparum* erkannt wird. Zusätzlich wurde noch die *codon usage* an das Genom von *P. falciparum* angepasst. Im nachfolgenden werden die infizierten Erythrozyten der *P. falciparum*-Zelllinien, welche mit einem *vir*-Gen transfiziert wurden, wie folgt bezeichnet: pARL_PVX_XXXXXX^{HA}-iE, wobei die sechs X für die Zahl des VIR-Proteins steht; die mit der Stammkultur 3D7 infizierten Erythrozyten als 3D7-iE

3.1 *In silico*-Analysen der 13 VIR-Proteine

In dieser Arbeit wurden 13 VIR-Proteine aus *P. vivax* untersucht. Deren Auswahl erfolgte auf Grundlage einer vorangegangenen Arbeit (Lubiana 2017). Bei der Auswahl der Proteine wurde darauf geachtet, dass diese mit einer Ausnahme alle mindestens eine Transmembrandomäne haben und verschiedene Größen aufweisen. Das Protein ohne Transmembrandomäne sollte als Kontrolle verwendet werden. In Tabelle 8 ist der schematische Aufbau der 13 VIR-Proteine dargestellt. Des Weiteren wurden mittels einer *in silico*-Analyse nach Domänenregionen innerhalb der 13 VIR-Proteine gesucht. Dafür wurde das Onlineprogramm InterPro verwendet (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>; Stand 14.02.2012). Dabei wurde bei allen VIR-Proteinen mit Ausnahme von PVX_050690 eine Transmembrandomäne gefunden (Tabelle 8; Dunkelgrau). Nur in der Sequenz von PVX_000020 konnte ein Signalpeptid detektiert werden (Tabelle 8; Blau). Des Weiteren wurden die Proteine dahingehend analysiert, ob sie ein PEXEL (RXLxE/Q/D) oder PEXEL-ähnliches Motiv (RXLxx) innerhalb der ersten 70 Aminosäuren aufweisen. Dafür wurde das

Onlineprogramm 3of5 verwendet (<https://www.dkfz.de/mga2/3of5/3of5.html>; Stand 14.02.2020). Dabei wurde bei dem VIR-Protein PVX_096925 ein PEXEL-Motiv gefunden und ein PEXEL-ähnliches Motiv bei PVX_097525 und PVX_101560. Zusätzlich wurde noch nach einem reifen N-Terminus (MAQ/MAA/MEE) gesucht. Dieser wurde bei PVX_081850, PVX_107235, sowie PVX_115475 nachgewiesen (Tabelle 8; Grün).

Tabelle 8: Übersicht über den Aufbau der für diese Arbeit ausgewählten VIR-Proteine und deren errechnete molekulare Masse. Angegeben ist die errechnete molekulare Masse der VIR-Proteine in kDa inklusive des 3xHA-Tags. Hellgrau: VIR-Protein; Dunkelgrau: Transmembrandomäne; Blau: Signalpeptid; Grün: reifer N-Terminus; Gelb: PEXEL-Motiv; Orange: PEXEL-ähnliches Motiv; Rot: 3xHA-Tag.

Gen-ID	Schematische Darstellung	kDa
PVX_050690		443 AS 51,4
PVX_000020		272 AS 32,4
PVX_060690		694 AS 76,6
PVX_068690		567 AS 62,5
PVX_077695		583 AS 64,2
PVX_081850		646 AS 71,2
PVX_093715		528 AS 58,2
PVX_096925		307 AS 33,9
PVX_097525		546 AS 60,2
PVX_101560		491 AS 54,1
PVX_107235		620 AS 68,3
PVX_113230		430 AS 47,4
PVX_115475		405 AS 44,7

3.2 Vergleich von zwei C-terminalen Markierungen für die Detektion der VIR-Proteine

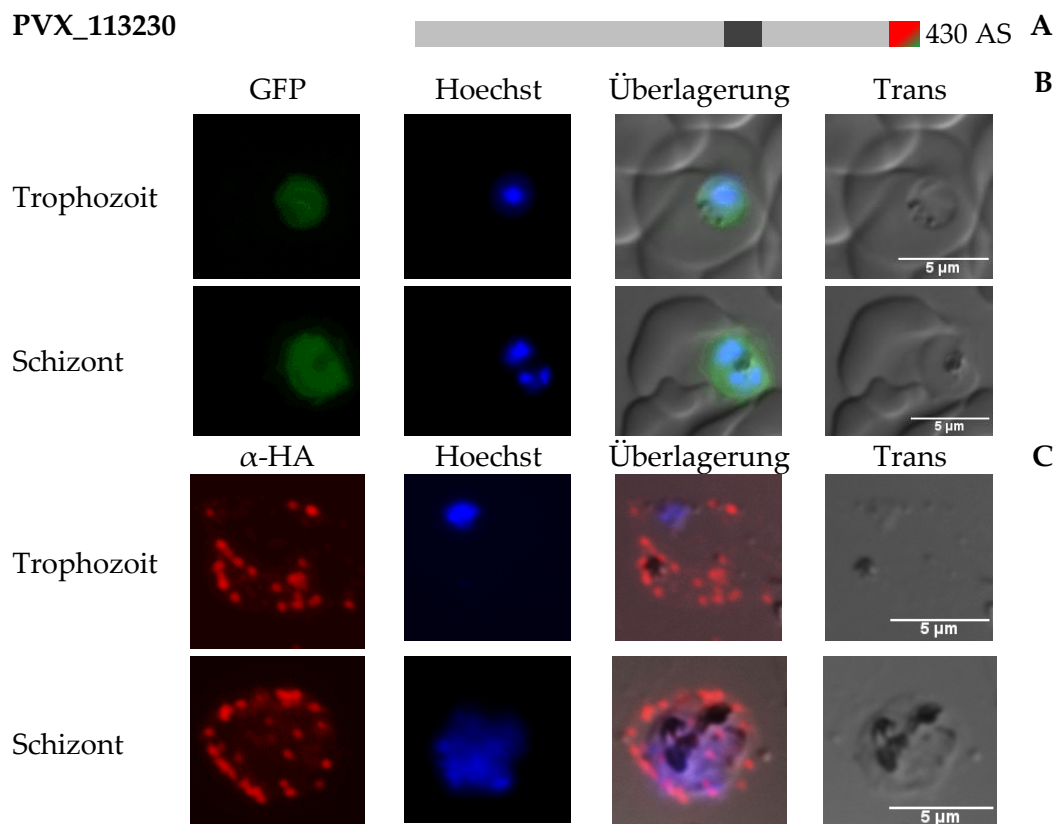


Abbildung 5: Vergleich der Lokalisierung von dem GFP-Fusionsprotein PVX_113230 mit dem 3xHA-Fusionsprotein PVX_113230 in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. **A:** Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_113230-GFP, bzw. -3xHA. Am C-Terminus ist der Lokalisierungsmarker dargestellt, der entweder aus einem 3xHA-Tag (rot) besteht oder aus GFP (grün) (Transmembrandomäne: dunkelgrau) **B-C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_113230 in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. **B:** Überprüfung der Lokalisation des Fusionsproteins mit dem Marker GFP. **C:** Überprüfung der Lokalisation des Fusionsproteins mit dem Marker 3xHA. Für die Detektion des 3xHA-Tags wurde ein spezifischer Antikörper verwendet. Ein zweiter fluoreszenzmarkierter Antikörper wurde verwendet, um den ersten Antikörper zu detektieren. Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

Um die Fusionsproteine zu detektieren, wurde an deren C-Terminus ein Marker fusioniert. Im ersten Versuchsansatz wurde GFP verwendet, da dadurch die Analyse der Fusionsproteine ohne zusätzlichen Färbeschritt im Fluoreszenzmikroskop möglich ist. In einem zweiten Versuchsansatz wurde als Marker ein 3xHA-Tag verwendet. Dieser ist kleiner als das GFP (4,3 kDa zu 26,9 kDa), jedoch ist die Detektion aufwendiger, da diese mittels eines Antikörpers geschieht. Aus diesem Grund wurde zuerst der erste Versuchsansatz probiert.

Wie in Abbildung 5B zu sehen ist, wurde das GFP von der Zelle produziert. Jedoch zeigt sich bei der Überlagerung, dass das GFP-Signal in beiden untersuchten Entwicklungsstadien (Trophozoit und Schizont) mit dem Parasiten und der Kernfärbung kolokalisiert. Bei der Zelllinie mit dem 3xHA-Tag markierten Fusionsprotein ist ein

punktiertes Muster im Zytoplasma des Erythrozyten (beide untersuchten Stadien) und an der Erythrozytenoberfläche (nur Schizontenstadium) zu sehen (Abbildung 5C).

3.3 Vergleich der Lokalisation von SBP1 und der ATS-Domäne der *PfEMP1*

Um zu überprüfen, ob es eine Kolokalisation zwischen dem Signal des α -SBP1-Antikörper (SBP1 engl. *skeleton binding protein 1*) und dem α -ATS-Antikörper gibt, wurde eine Immunfluoreszenzanalyse mit diesen beiden Antikörpern mit pARL1_PVX_081850^{HA}-iE durchgeführt.

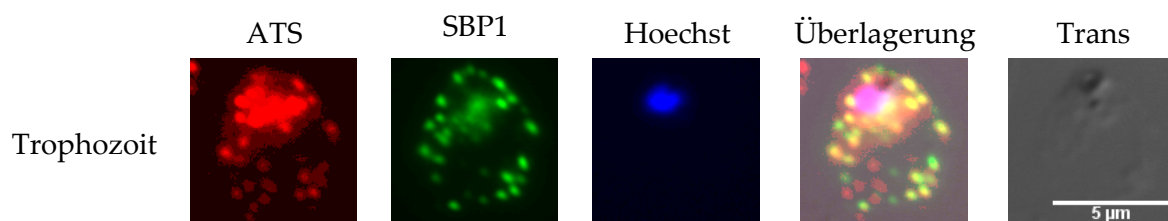


Abbildung 6: Kolokalisation zwischen den Signalen vom α -ATS-Antikörper und α -SBP1-Antikörper. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisation vom Maurer'schen Spaltenprotein SBP1 und der ATS-Domäne der *PfEMP1* im Trophozoitenstadium des Parasiten. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

Es konnte eine partielle Kolokalisation zwischen dem Signal vom α -ATS-Antikörper und α -SBP1-Antikörper nachgewiesen werden, zu sehen an den gelben Punkten in Abbildung 6, Überlagerung.

3.4 Lokalisation von 13 VIR-Proteinen im iE und deren Kolokalisation mit *P. falciparum* spezifischen Zellkompartimenten

Um die zu untersuchenden VIR-Proteine im infizierten Erythrozyten lokalisieren zu können, wurde von jedem VIR-Protein eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Es wurden immer zwei spezifische Erstantikörper verwendet, wovon der eine den 3xHA-Tag und der andere eines der spezifischen Zellkompartimente detektiert (Protein der parasitophore Vakuolenmembran, Protein der Maurer'sche Spalten, das Oberflächen-assoziierte Protein *PfEMP1*, sowie ein Protein aus der Erythrozytenmembran). Für die Visualisierung der Erstantikörper wurden zwei weitere Antikörper verwendet, welche mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugierter waren. Der Zweitantikörper, welcher den α -HA-Antikörper detektiert, war mit dem Farbstoff Alexa Fluor 594 (rotes Signal) konjugiert. Der andere Zweitantikörper, welcher den Erstantikörper gegen eines der Zellkompartimente detektiert, war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 (grünes

Signal) konjugiert. Von jeder Transfektante wurden insgesamt 120 iE ausgezählt. Dabei wurde notiert, wo im iE das Signal des VIR-Proteins lokalisiert war und ob es zu einer Überlagerung von dem 3xHA-Signal der Fusionsproteine mit dem Signal der vier Zellkompartimente kam (Koklokalisierung; sichtbar an den gelben Punkten in den Überlagerungsbildern). Im nachfolgenden sind die Ergebnisse dieser Analysen aufgeführt.

PVX_050690

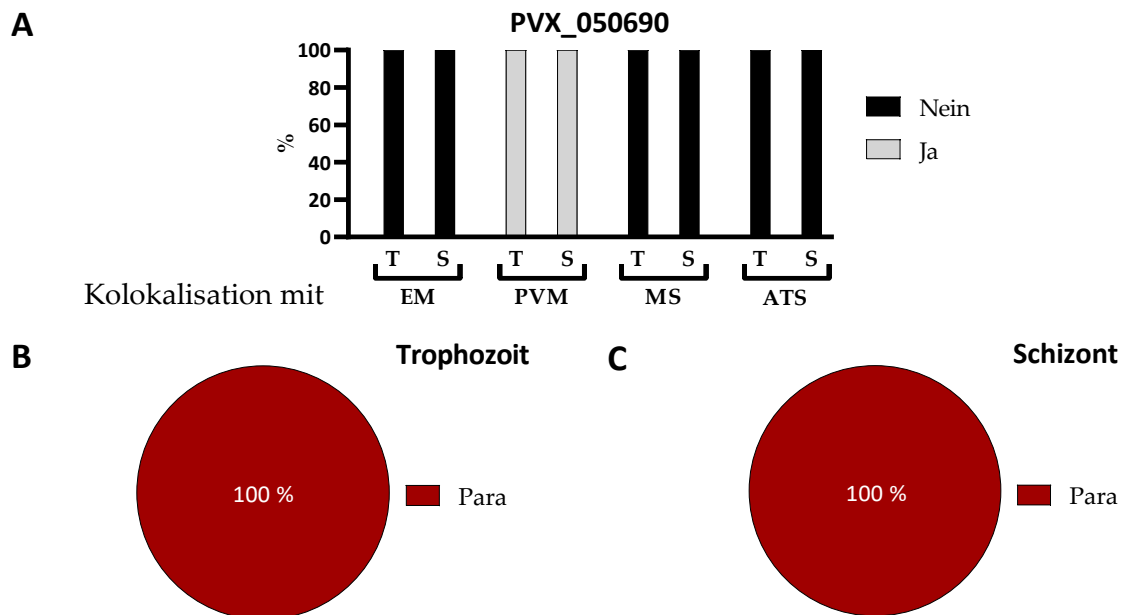


Abbildung 7: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_050690-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisierung des Fusionsproteins PVX_050690-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), und ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont. Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisierung zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: Lokalisierung im Parasiten; Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

PVX_050690 ist in dieser Arbeit das einzige untersuchte VIR-Protein, bei dem keine Transmembrandomäne, Signalpeptid, PEXEL-, bzw. PEXEL-ähnliches Motiv oder reifer N-Terminus vorhanden ist.

Wie in Abbildung 8, sowie in Abbildung 7B und C zu sehen ist, wurde das Signal des VIR-Proteins in beiden untersuchten Entwicklungsstadien nur im Parasiten detektiert. Eine Kolokalisation konnte nur für das Protein der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM), ETRAMP5 (Abbildung 8, Abbildung 7A) nachgewiesen werden. Es konnte keine Kolokalisation mit Spektrin, SBP1 oder der ATS-Domäne der PfEMP1 festgestellt werden.

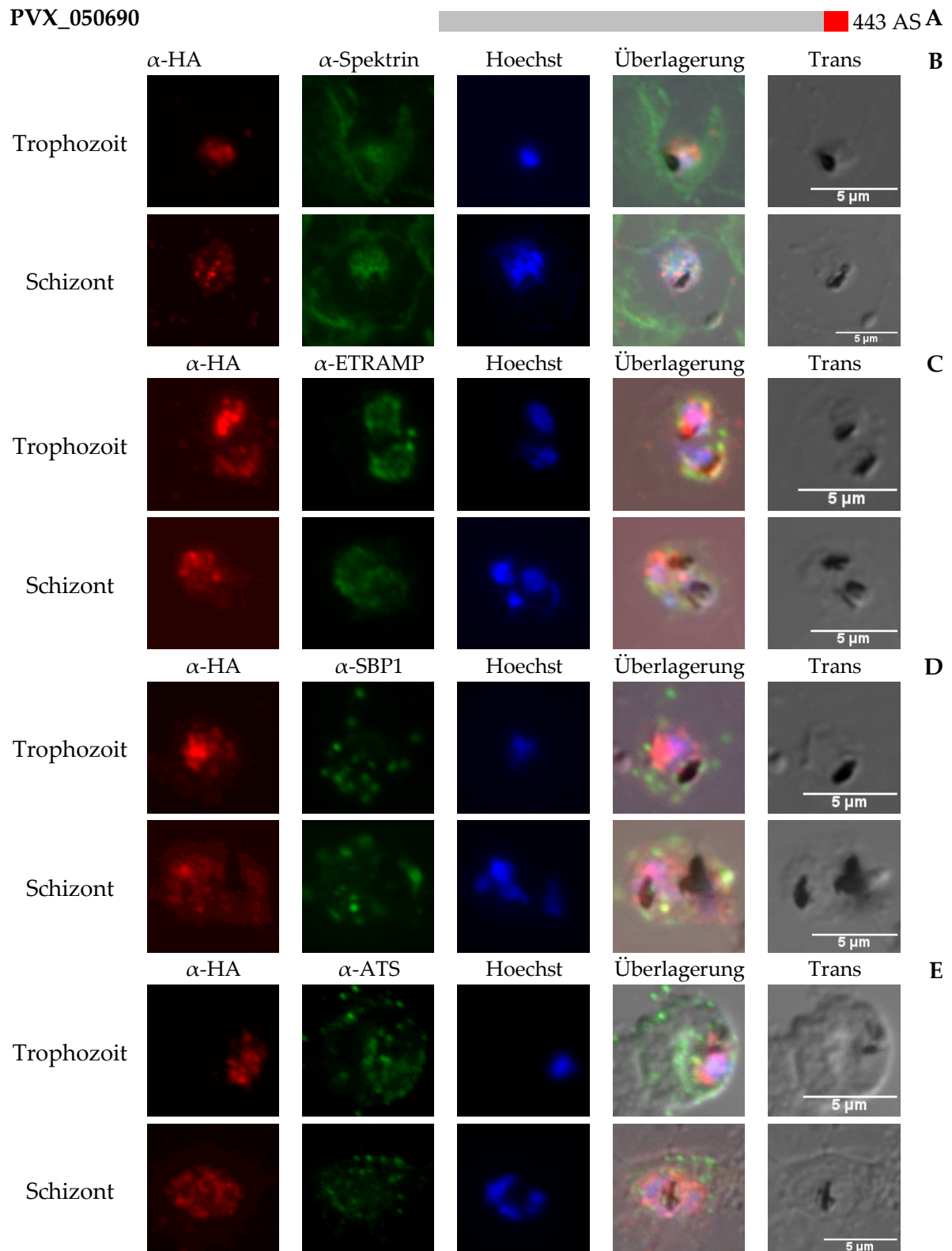


Abbildung 8: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_050690-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_050690-3xHA (3xHA: rot) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_050690-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kollokalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kollokalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kollokalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kollokalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

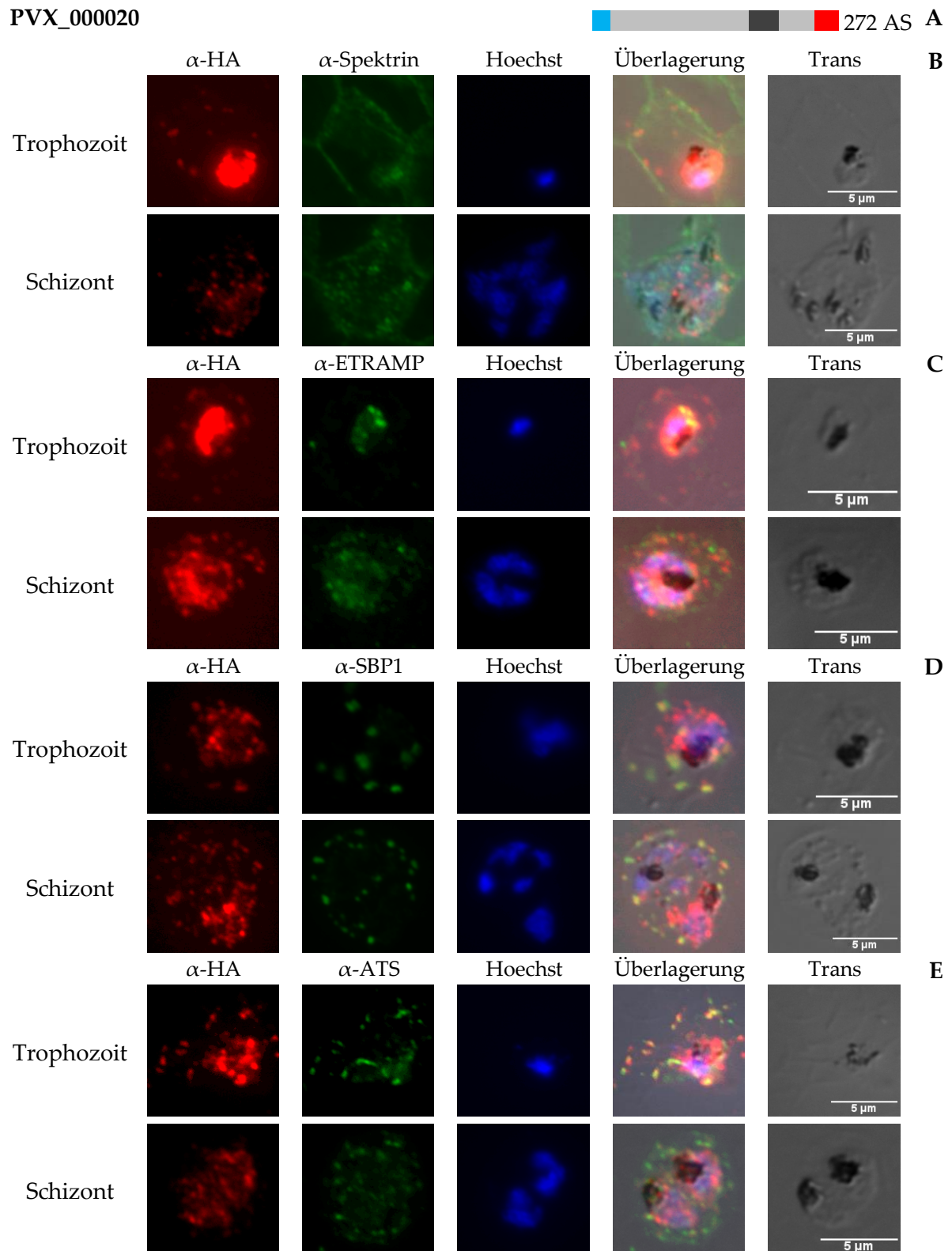


Abbildung 9: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_000020-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_000020-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau; Signalpeptid: blau) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_000020-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

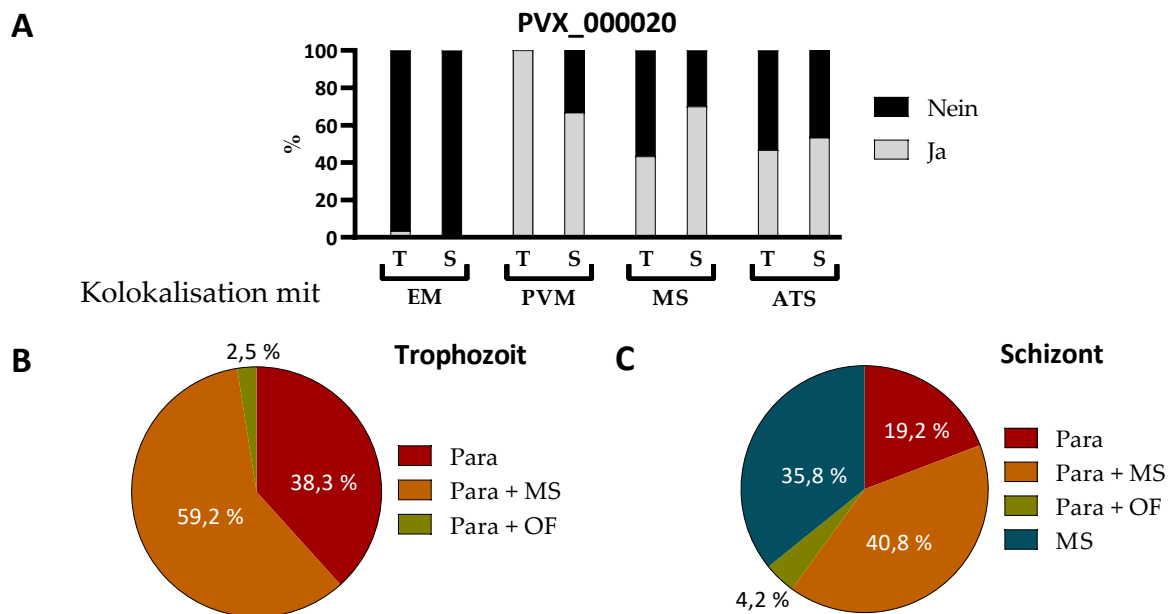


Abbildung 10: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_000020-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisierung zwischen dem Fusionsproteins PVX_000020-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisierung zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

Bei der Analyse der Aminosäuresequenz von PVX_000020 wurde ein Signalpeptid und eine Transmembrandomäne nachgewiesen (Abbildung 9A). In den IFA-Bilder (Abbildung 9) ist zu sehen, dass im Trophozoiten- und Schizontenstadium das Signal sowohl im Parasiten als auch punktuell im Zytoplasma des iE zu sehen ist. Dies zeigen auch die Ergebnisse der Auszählung bezüglich der Lokalisation (Abbildung 10B und C). Im Trophozoiten ist das Signal am häufigsten im Parasiten und den Maurer'schen Spalten zu sehen (59,2 %), gefolgt von einer Lokalisation nur im Parasiten (38,3 %) und nur zu einem geringen Teil im Parasiten und an der Oberfläche (2,5 %). Im Schizont verlagert sich die Verteilung des Proteins aus dem Parasiten heraus in den iE. Der Anteil, bei dem das Signal nur im Parasiten sichtbar war, hat sich auf 19,2 % verringert, ebenso wie bei der Detektion des Signals im Parasiten und in den Maurer'schen Spalten (40,8 %). Gering zugenommen hat der Anteil der iE, bei denen das Signal im Parasiten und an der Oberfläche zu sehen war (4,2 %). Des Weiteren ist das Signal bei 35,8 % der Schizonten nur in den Maurer'schen Spalten zu sehen.

Es konnte keine Kolokalisation zwischen dem VIR-Protein und Spektrin beobachtet werden. Mit ETRAMP5 kolokalisierten im Trophozoitenstadium 100 % der mikroskopierten iE und im Schizontenstadium 66,7 %. Eine partielle Kolokalisation mit SBP1 fand in 43,3 % (Trophozoit), bzw. 70 % (Schizont) statt, zu sehen an den gelben Punkten in Abbildung 9D. Auch bei den Bildern mit ATS sind gelbe Punkte in beiden Stadien zu sehen. Hierbei fand eine

Kolokalisation im Trophozoitenstadium in 46,7 % der mikroskopierten iE statt, sowie bei 53,3 % der iE im Schizontenstadium.

PVX_060690

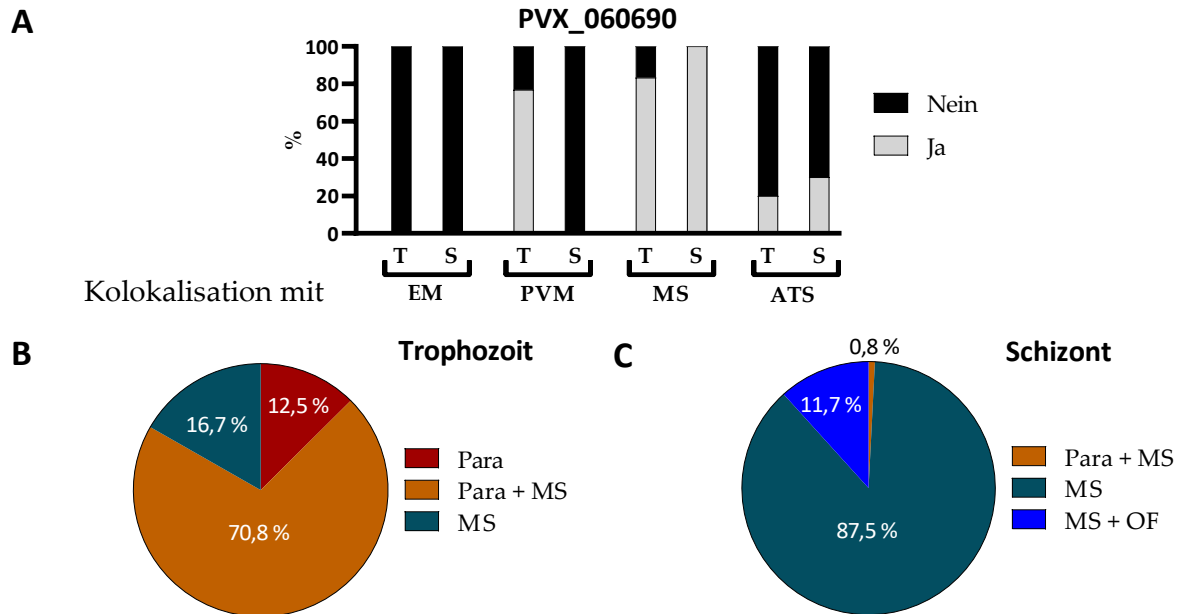


Abbildung 11: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_060690-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisierung zwischen dem Fusionsproteins PVX_060690-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisierung zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

Das VIR-Protein PVX_060690 weist nur eine Transmembrandomäne und kein Exportsignal auf. In beiden untersuchten Stadien ist ein im Zytosol des iE verteiltes punktiertes Muster zu sehen, wobei im Trophozoitenstadium bei einem Teil der untersuchten iE das Signal ausschließlich im Parasiten detektiert wurde (12,5 %). In 70,8 % der untersuchten iE wurde das Signal im Parasiten und in den Maurer'schen Spalten gesehen und in 16,7 % nur in diesen (Abbildung 11B). In den Schizonten war das Signal bei sehr wenigen iE im Parasiten zu sehen (0,8 %) und hauptsächlich in den Maurer'schen Spalten (87,5 %). Des Weiteren wurde bei 11,7 % der Schizonten das Signal sowohl in den Maurer'schen Spalten als auch an der Oberfläche detektiert.

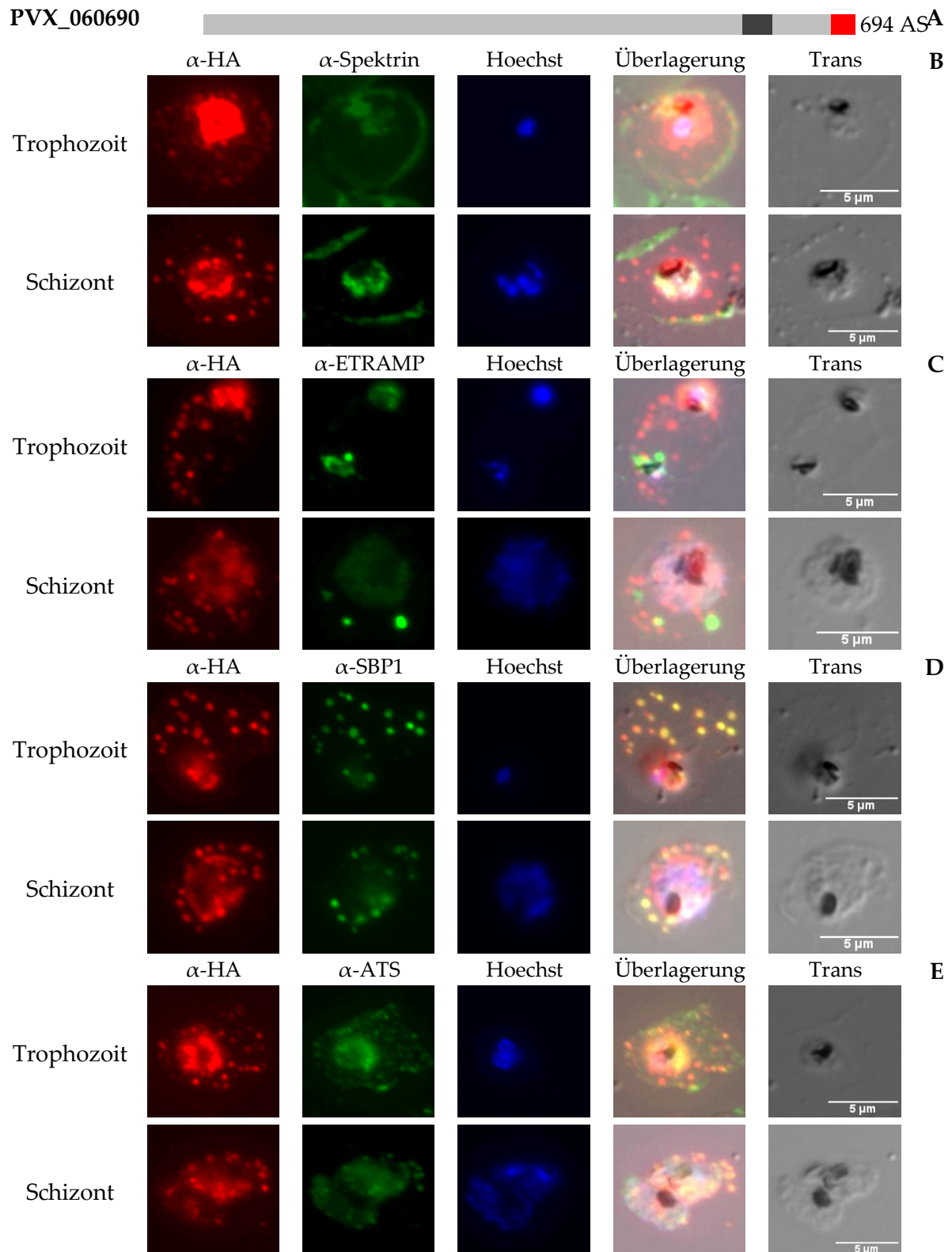


Abbildung 12: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_060690-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_060690-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_060690-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

Für Spektrin konnte keine Kolokalisation mit dem Signal von PVX_060690 beobachtet werden und mit ETRAMP5 nur im Trophozoitenstadium. Im Gegensatz dazu wurde eine Kolokalisation mit SBP1 als auch mit ATS nachgewiesen, zu sehen an den gelben Punkten (Abbildung 12). Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Auszählung der Lokalisation (Abbildung 11A). Mit Spektrin konnte in beiden Stadien keine Kolokalisation mit dem Fusionsprotein festgestellt werden und mit ETRAMP5 nur im Trophozoitenstadium (76,7%). Mit SBP1 konnte eine Kolokalisation bei 83,3 % der mikroskopierten iE im Trophozoitenstadium gesehen werden und im Schizontenstadium bei allen untersuchten iE. Mit ATS konnte bei 20 % im Trophozoitenstadium, bzw. 30 % im Schizontenstadium der untersuchten iE eine Kolokalisation nachgewiesen werden.

PVX_068690

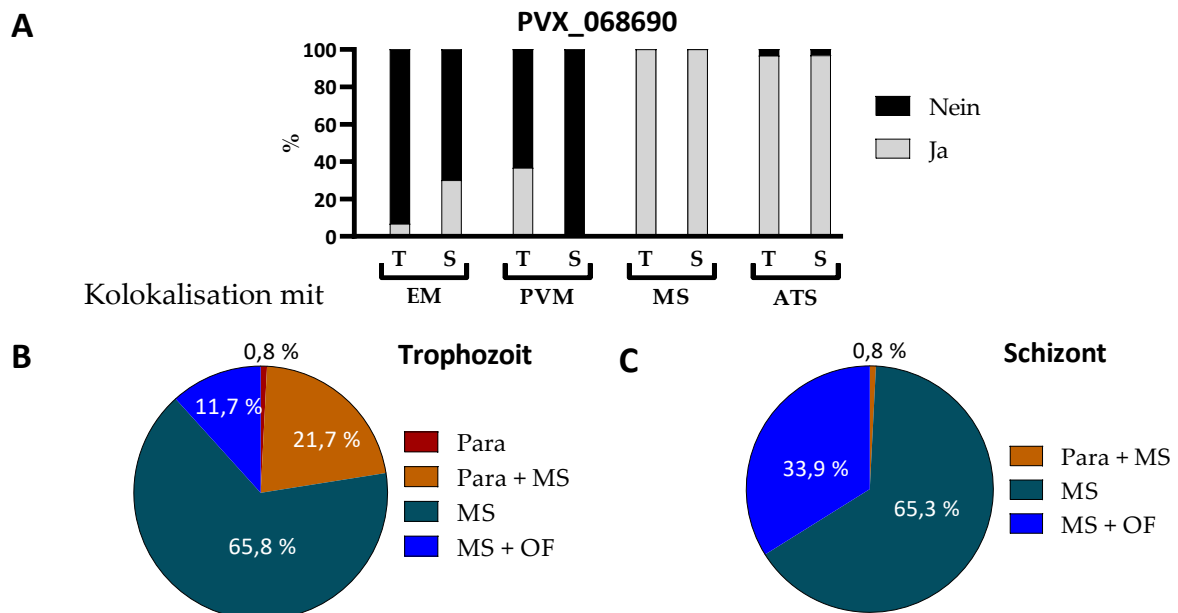


Abbildung 13: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_068690-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisierung zwischen dem Fusionsproteins PVX_068690-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisierung zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

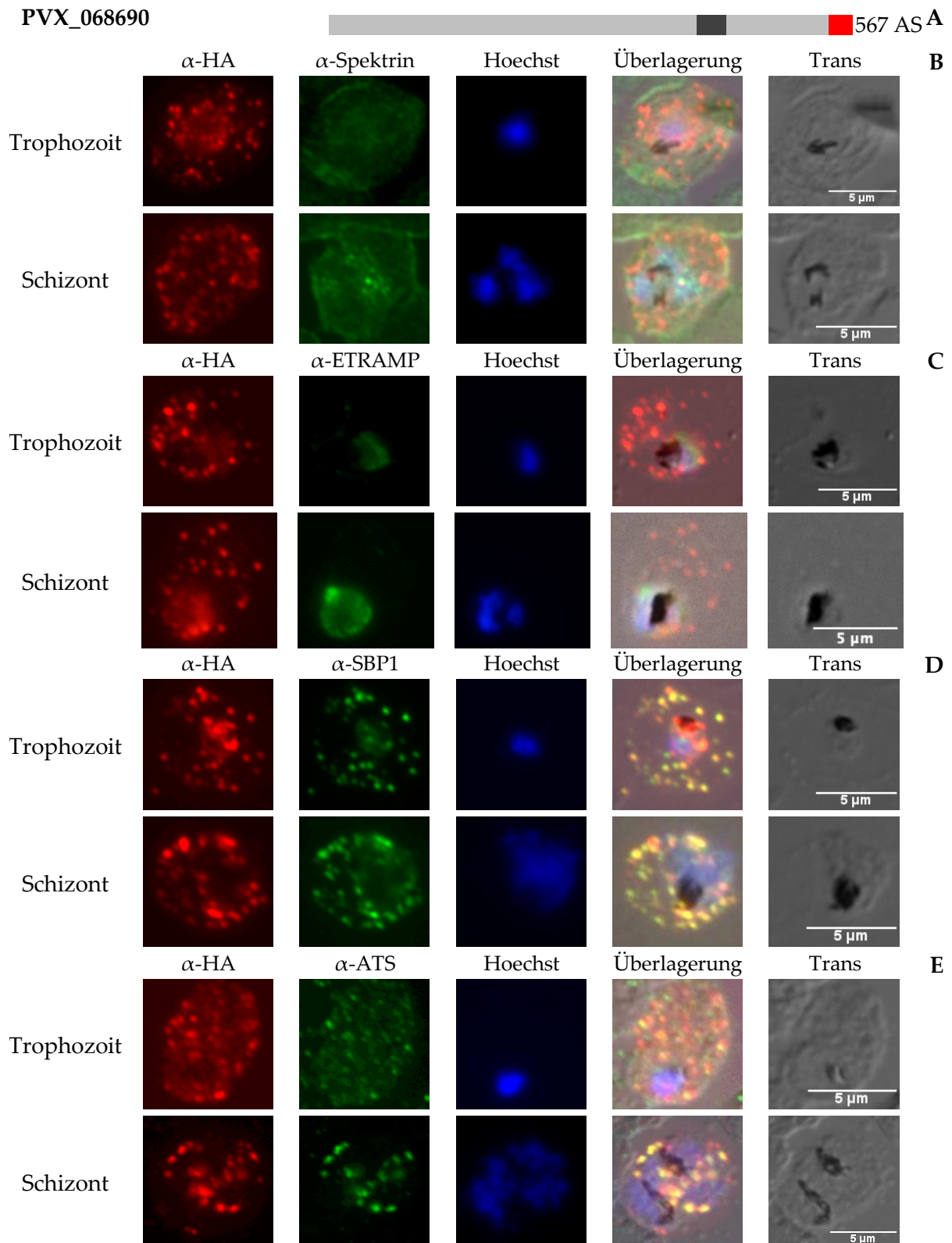


Abbildung 14: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_068690-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_068690-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_068690-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

Bei der *in silico*-Analyse wurde nur eine putative Transmembrandomäne gefunden. Überwiegend lokalisiert das Protein in den Maurer'schen Spalten, sowohl im Trophozoiten (65,8 %) als auch im Schizonten (65,3 %). Zusätzlich dazu wurde das Protein im Trophozoitenstadium im Parasiten (0,8 %), im Parasiten und in den Maurer'schen Spalten (21,7 %) und in den Maurer'schen Spalten und an der Oberfläche (11,7 %) detektiert. Im Schizontenstadium lokalisiert das Protein nur bei 0,8 % der untersuchten iE im Parasiten. Bei 33,9 % der iE konnte das Signal in den Maurer'schen Spalten und an der Oberfläche nachgewiesen werden (Abbildung 13B und C).

Für Spektrin konnte eine geringe Kolo­kalisierung mit PVX_068690 nachgewiesen werden (Trophozoit: 6,7 %, Schizont: 30 %). Mit ETRAMP5 kam es im Trophozoitenstadium bei 36,7 % der mikroskopierten iE zu einer Kolo­kalisierung, allerdings wurde keine im Schizonten beobachtet. Bei SBP1 gab es dagegen im Trophozoiten- als auch im Schizontenstadium bei allen untersuchten iE eine Kolo­kalisierung. Dies ist auch an den gelben Punkten in den IFA-Bildern zu sehen (Abbildung 14D). Ähnlich ist es mit ATS, dort kommt es in beiden untersuchten Stadien bei 96,7 % aller iE zu einer Kolo­kalisierung zwischen dem Protein und ATS, ebenfalls an den gelben Punkten zu sehen (Abbildung 14E).

PVX_077695

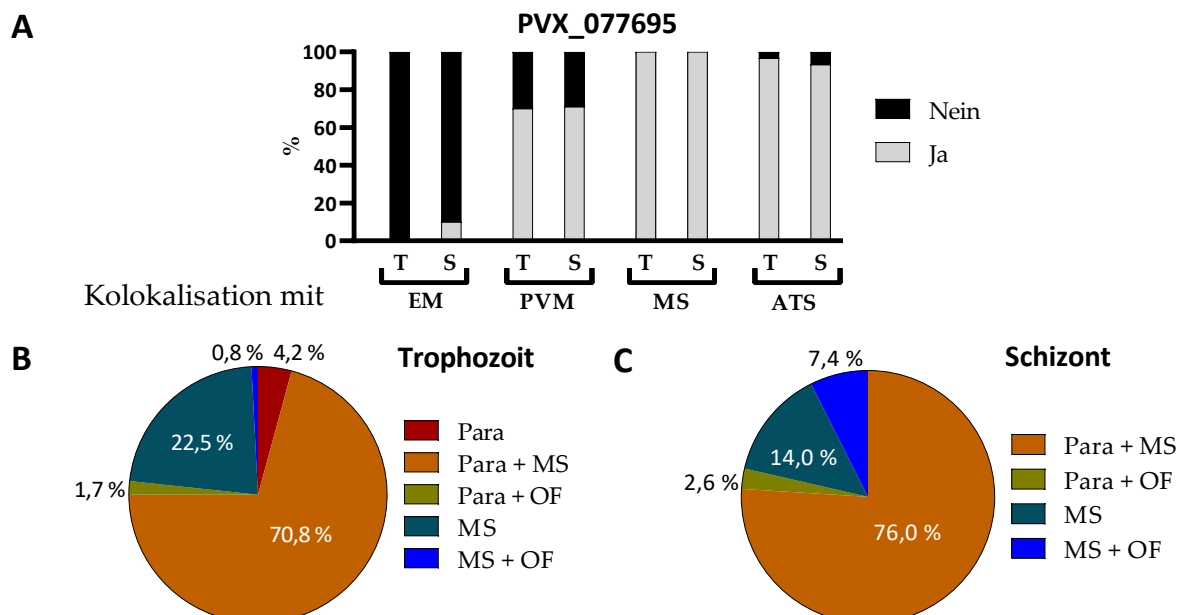


Abbildung 15: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_077695-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolo­kalisierung zwischen dem Fusionsproteins PVX_077695-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des *PfEMP1* Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolo­kalisierung zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

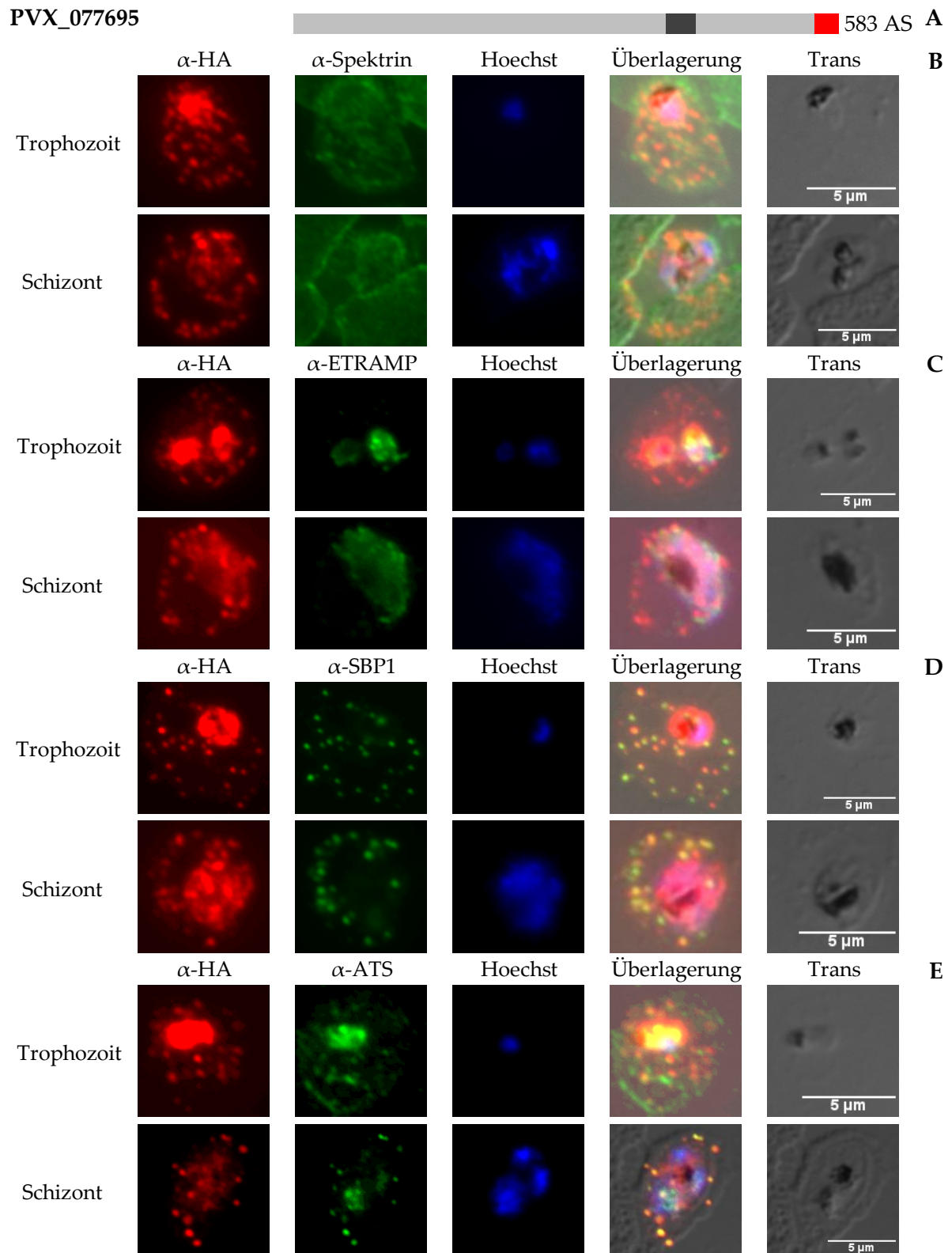


Abbildung 16: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_077695-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_077695-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_077695-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

Auch bei dem VIR-Protein PVX_077695 wurde in der *in silico*-Analyse nur eine Transmembrandomäne, jedoch kein Exportsignal gefunden. In beiden Stadien lokalisiert es hauptsächlich im Parasiten und den Maurer'schen Spalten (Trophozoit: 70,8 %, Schizont: 76,0 %) oder nur in den Maurer'schen Spalten (Trophozoit: 22,5 %, Schizont: 14,0 %). Im Schizontenstadium lokalisiert es zusätzlich noch zu 7,4 % in den Maurer'schen Spalten und an der Oberfläche (Abbildung 15B und C).

In den IFA-Bildern (Abbildung 16) ist die Akkumulation des Proteins im Parasiten sehr gut zu sehen, besonders bei den Parasiten im Trophozoitenstadium. Zusätzlich dazu ist eine punktuelle Verteilung des Signals über den gesamten iE sichtbar. Mit Spektrin war nur im Schizonten eine Kolokalisation mit dem Fusionsprotein sichtbar (10 %), bei ETRAMP5 dagegen in beiden Stadien bei 70 % der mikroskopierten iE. Bei allen untersuchten iE in beiden Stadien konnte eine Kolokalisation mit SBP1 detektiert werden, sichtbar an den gelben Punkten in Abbildung 16D. Mit ATS haben 96,7 % der iE im Trophozoitenstadium kolokalisiert und 93,3 % im Schizonten, ebenfalls an den gelben Punkten in Abbildung 16 zu sehen.

PVX_081850

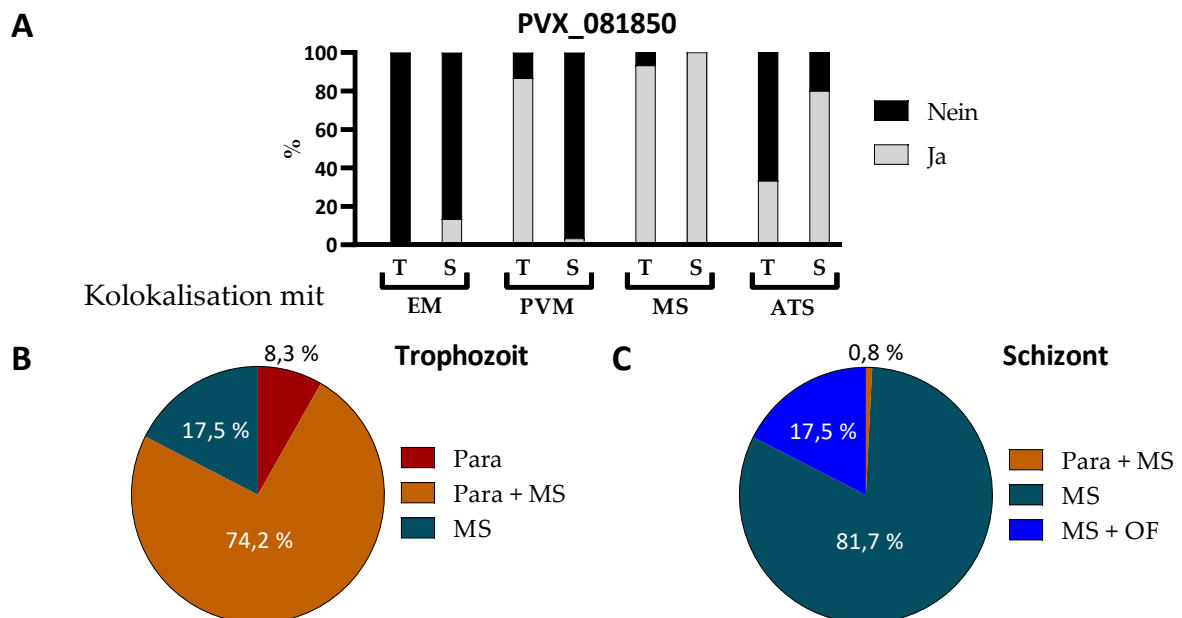


Abbildung 17: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_081850-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisierung zwischen dem Fusionsproteins PVX_081850-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des *PfEMP1* Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisierung zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

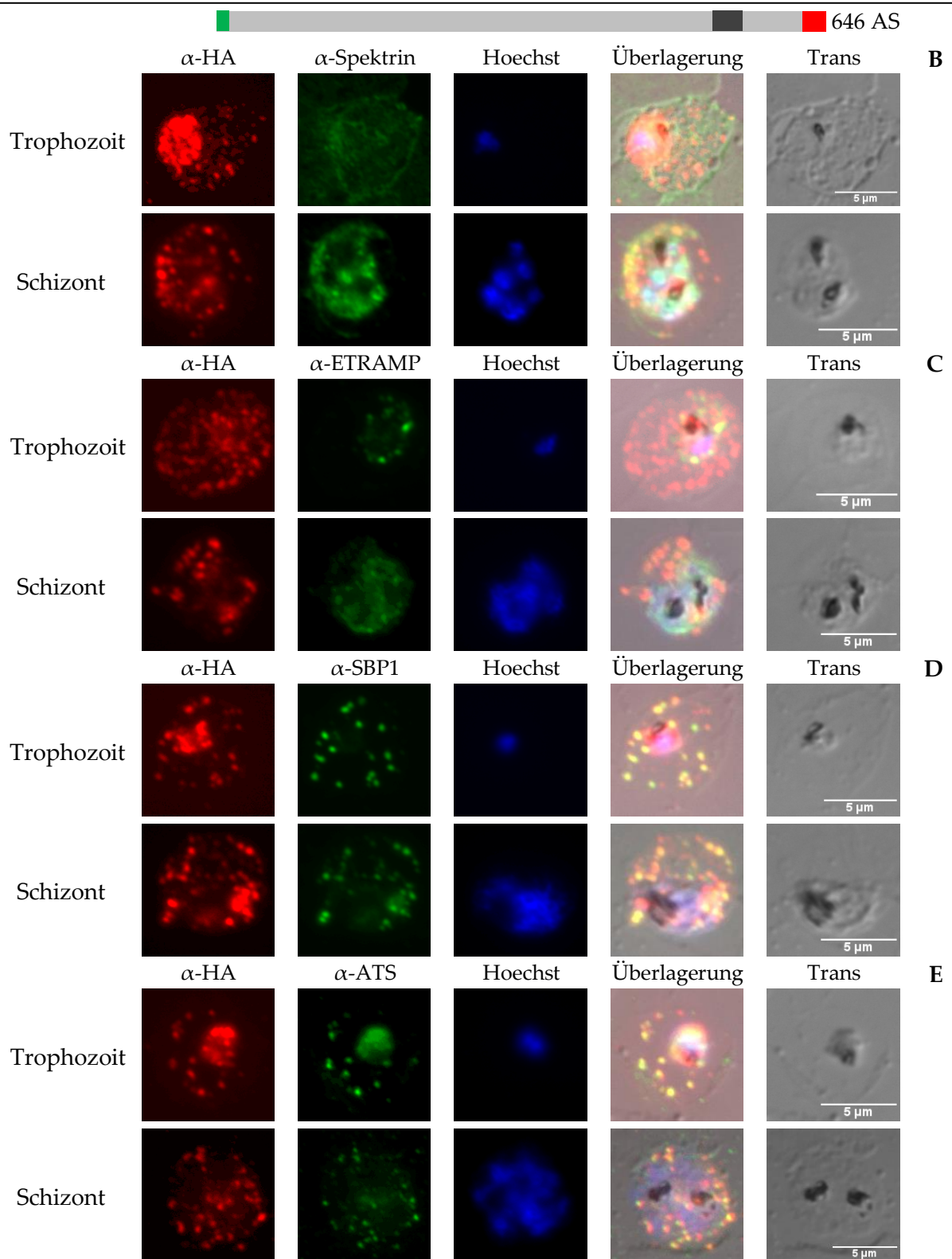


Abbildung 18: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_081850-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_081850-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau; Reifer N-Terminus: Grün) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_081850-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

Bei der Analyse der Aminosäuresequenz des VIR-Protein PVX_081850 wurde neben einer Transmembrandomäne auch ein reifer N-Terminus vorhergesagt. Bei 8,3 % der untersuchten iE wurde das Signal im Parasiten nachgewiesen. Eine Lokalisation im Parasiten und den Maurer'schen Spalten, wie sie in den IFA-Bildern zu sehen ist (Abbildung 18), wurde bei 74,2 % der mikroskopierten iE gesehen. 17,5 % der iE lokalisierten nur in den Maurer'schen Spalten. Im Schizontenstadium dagegen wurde das Protein nur bei 0,8 % der mikroskopierten iE im Parasiten und den Maurer'schen Spalten detektiert, dagegen bei 81,7 % in den Maurer'schen Spalten alleine und bei 17,5 % noch zusätzlich an der Oberfläche des iE (Abbildung 17B und C).

Mit Spektrin kolokalisiert das VIR-Protein bei 13,3 % der untersuchten iE, allerdings nur im Schizontenstadium. Die Kolokalisation mit ETRAMP5 betrug 86,7 % im Trophozoiten- und 3,3 % im Schizontenstadium. Für SBP1 beträgt die Kolokalisationsrate mit PVX_081850 im Trophozoitenstadium 93,3 % und im Schizontenstadium 100 %. Dies ist in den IFA-Bildern in Abbildung 18D an den gelben Punkten zu sehen. Bei ATS zeigt sich ein Unterschied zwischen den beiden Stadien; im Trophozoitenstadium kolokalisieren nur 33,3 % der mikroskopierten iE mit ATS, während es im Schizontenstadium 80 % sind. Auch dies ist in den IFA-Bildern in Abbildung 18E an den gelben Punkten zu sehen.

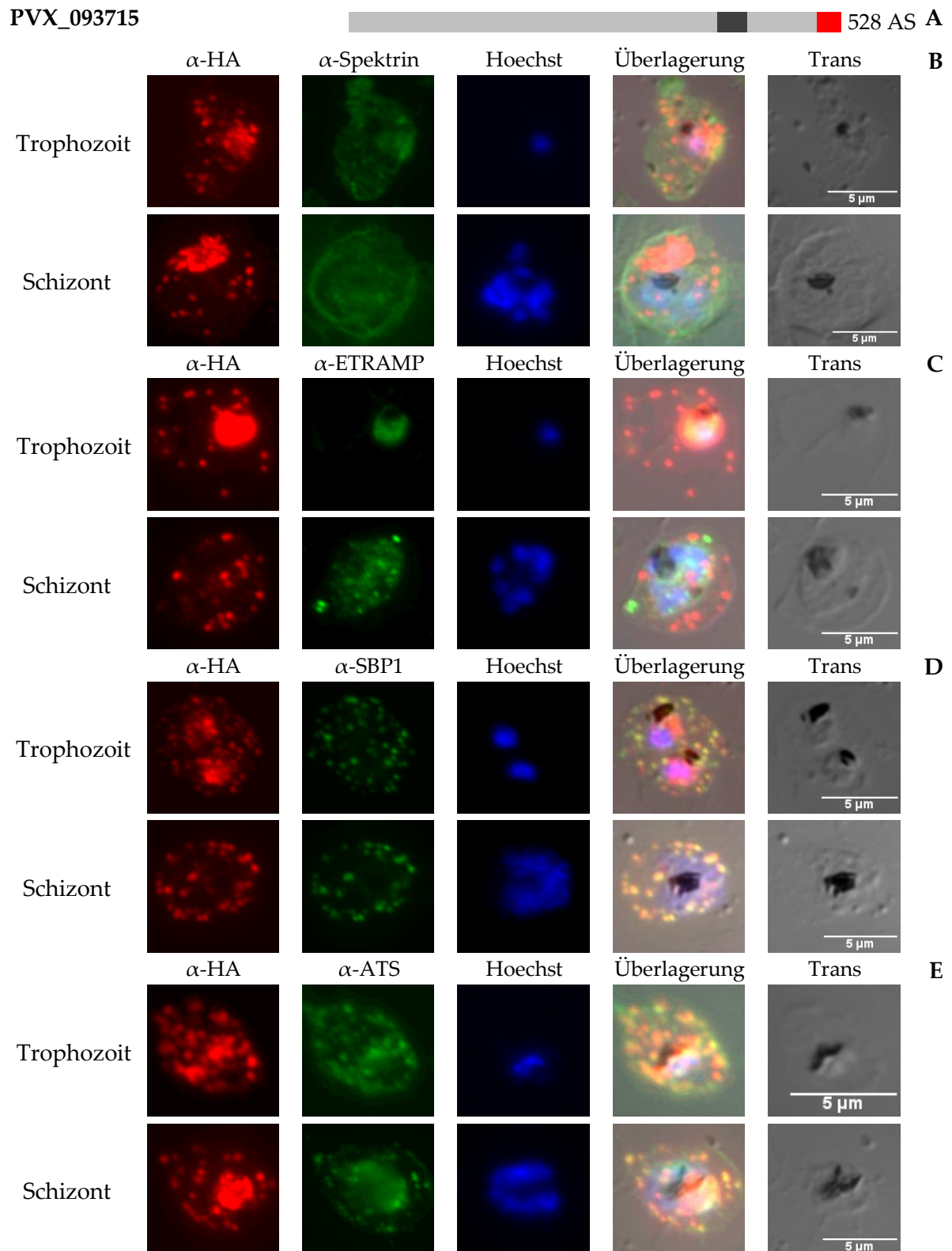


Abbildung 19: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_093715-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_093715-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_093715-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

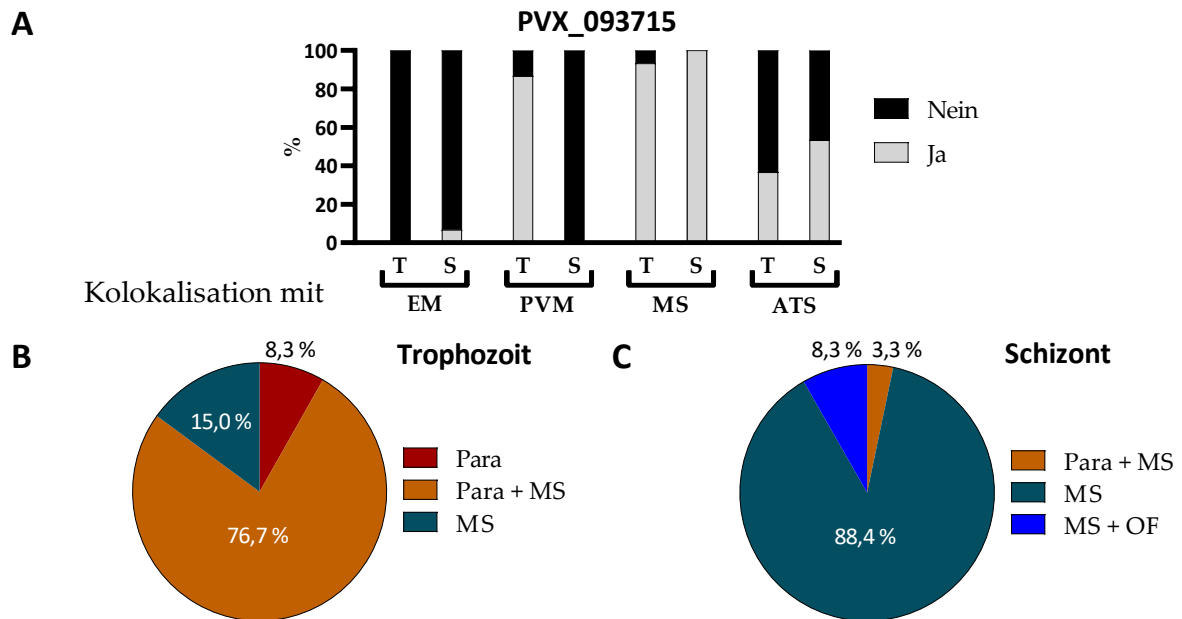


Abbildung 20: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_093715-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisierung zwischen dem Fusionsproteins PVX_093715-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisierung zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

Bei der *in silico*-Analyse der Aminosäuresequenz vom VIR-Protein PVX_093715 wurde nur eine Transmembrandomäne vorhergesagt. Das Protein zeigt in beiden untersuchten Stadien eine punktuelle Verteilung über den gesamten iE, allerdings im Trophozoitenstadium auch eine Akkumulation des Signals im Parasiten (Abbildung 19). Bei 76,7 % der untersuchten iE im Trophozoitenstadium war das Signal des VIR-Proteins sowohl im Parasiten als auch in den Maurer'schen Spalten sichtbar, bei 15 % nur in den Maurer'schen Spalten und bei 8,3 % nur im Parasiten. Im Schizontenstadium wurde das Signal bei 88,4 % der mikroskopierten iE in den Maurer'schen Spalten detektiert und zusätzlich an der Oberfläche (8,3 %), bzw. im Parasiten (3,3 %).

Nur bei 8,3 % der untersuchten iE im Schizontenstadium kolokalisierte das VIR-Protein mit Spektrin, wohingegen es bei 86,7 % der iE mit ETRAMP5 kolokalisiert, aber nur im Trophozoitenstadium. Mit SBP1 wurde eine hohe Kolokalisationsrate festgestellt (Trophozoit: 93,3 %, Schizont: 100 %), sichtbar an den gelben Punkten in Abbildung 19D. PVX_093715 kolokalisierte mit ATS in 36,7 % der untersuchten iE (Trophozoit), bzw. 53,3 % (Schizont), ebenfalls in Abbildung 19E an den gelben Färbung zu sehen.

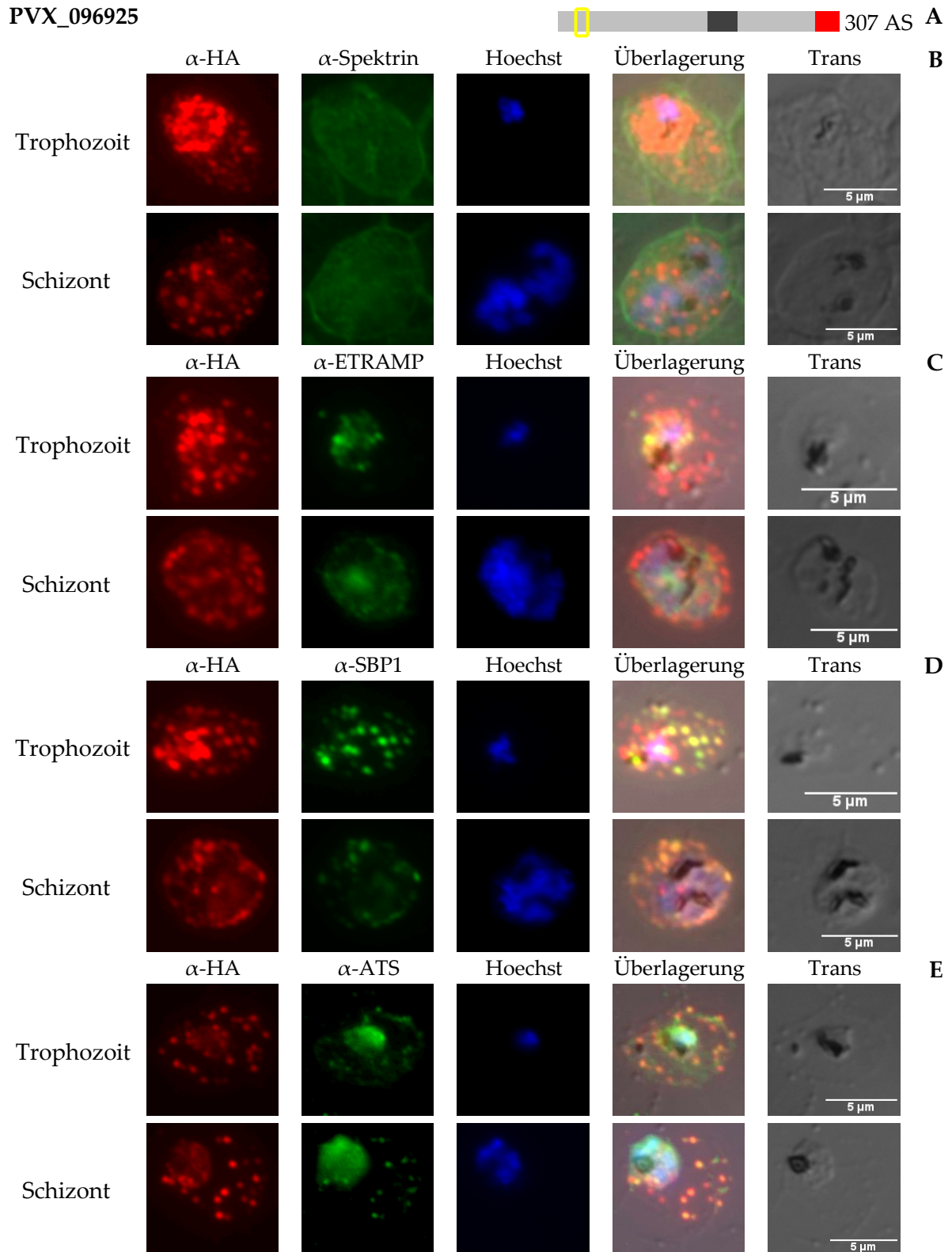


Abbildung 21: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_096925-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_096925-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau; PEXEL-Motiv: gelb) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_096925-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kolo-kalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kolo-kalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kolo-kalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kolo-kalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

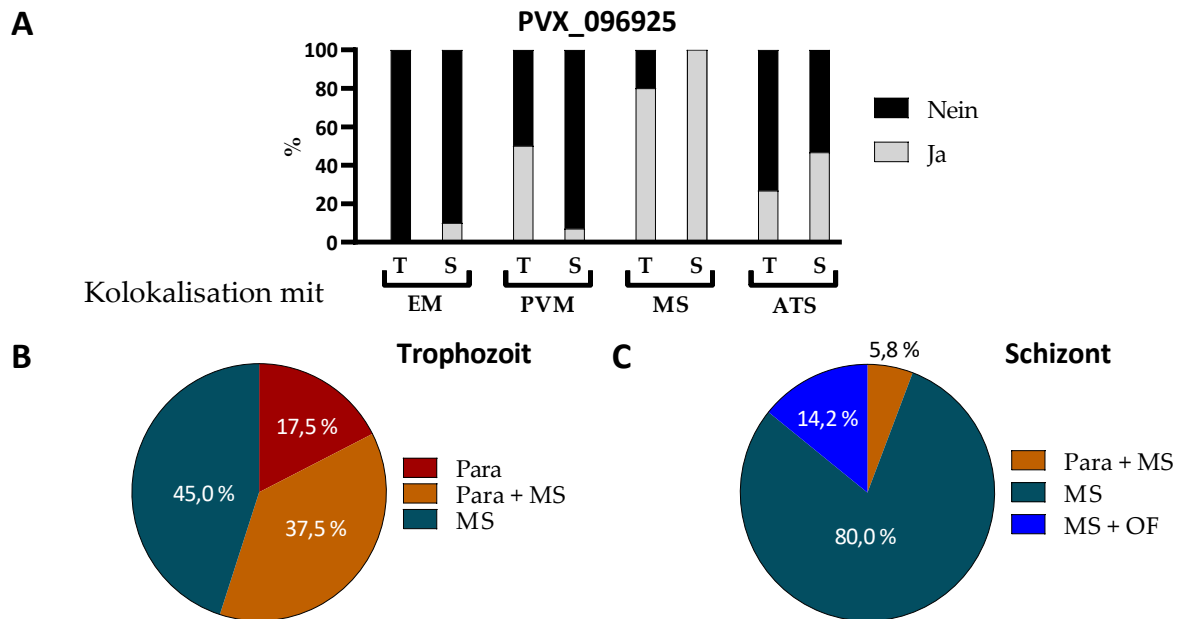


Abbildung 22: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_096925-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisation zwischen dem Fusionsproteins PVX_096925-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisation zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. B, C: Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

Das VIR-Protein PVX_096925 ist das einzige Protein in dieser Arbeit, bei dem neben der putativen Transmembrandomäne ein PEXEL-Motiv vorhergesagt wurde. In den IFA-Bildern ist teilweise eine Akkumulation des Signals im Parasiten zu sehen, sowie eine punktuelle Verteilung des Signals im Zytosol der Wirtszelle. In den Lokalisationsstudien zeigte sich im Trophozoitenstadium hauptsächlich eine Verteilung in den Maurer'schen Spalten (45 %) oder im Parasiten und den Maurer'schen Spalten (37,5 %). Nur in 17,5 % der untersuchten iE lokalisierte das Protein im Parasiten (Abbildung 22B). Im Schizontenstadium lokalisiert das Protein in 80 % der mikroskopierten iE in den Maurer'schen Spalten, bei 14,2 % zusätzlich an der Oberfläche, bzw. bei 5,8 % zusätzlich im Parasiten (Abbildung 22C).

Mit Spektrin kolokalisiert das VIR-Protein nur im Schizontenstadium bei 10 % der untersuchten iE, nicht im Trophozoitenstadium. Eine Kolokalisation mit ETRAMP5 wurde bei 50 % der untersuchten Trophozoiten, bzw. 7 % der Schizonten gesehen. Bei 80 % der iE im Trophozoiten- und 100 % im Schizontenstadium wurde eine Kolokalisation mit SBP1 gesehen. Bei ATS liegt die Kolokalisationsrate bei 26,7 % (Trophozoit), bzw. 46,7 % (Schizont).

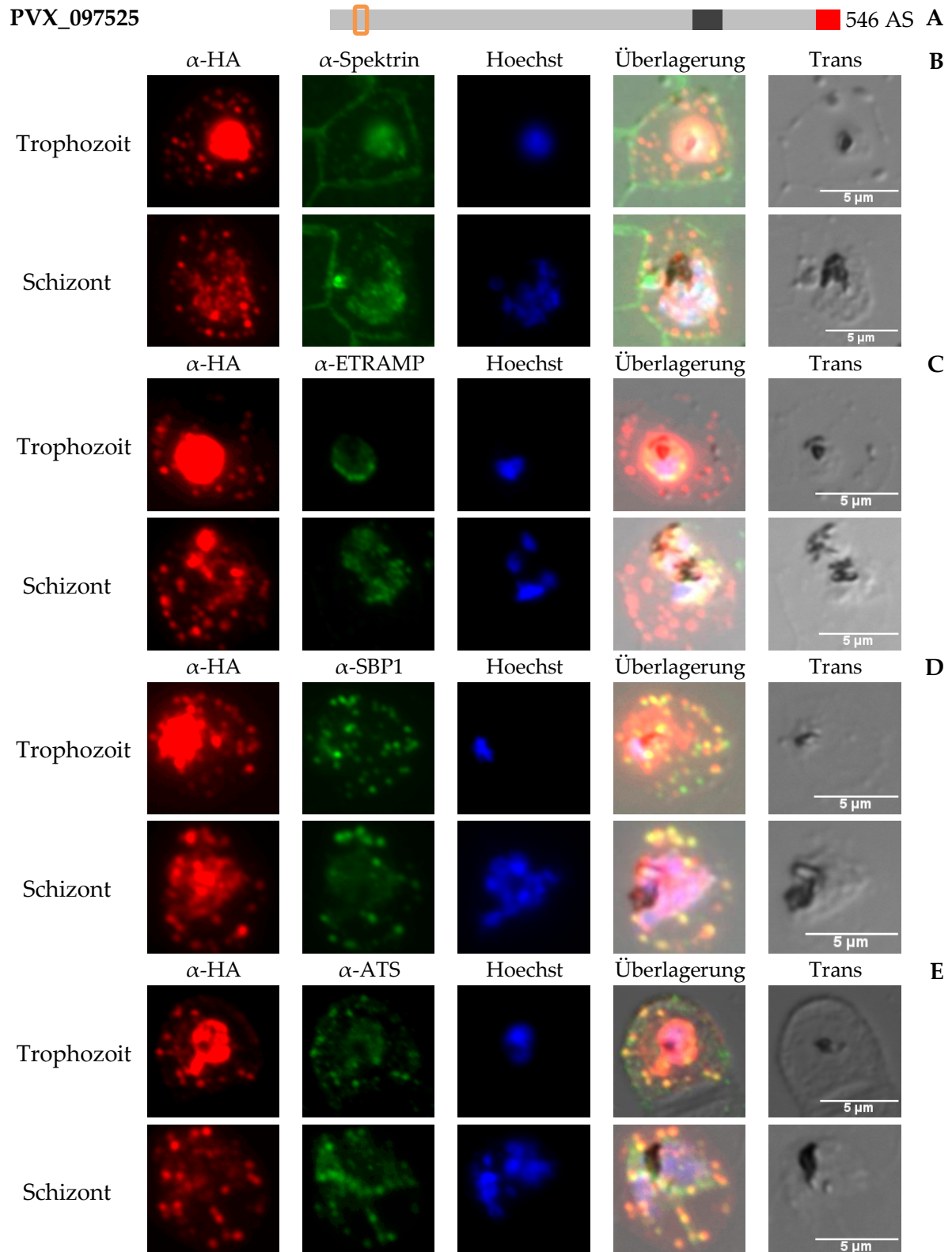


Abbildung 23: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_097525-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_097525-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau; Pexel-ähnliches Motiv: orange) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_097525-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kolo-kalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kolo-kalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kolo-kalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kolo-kalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

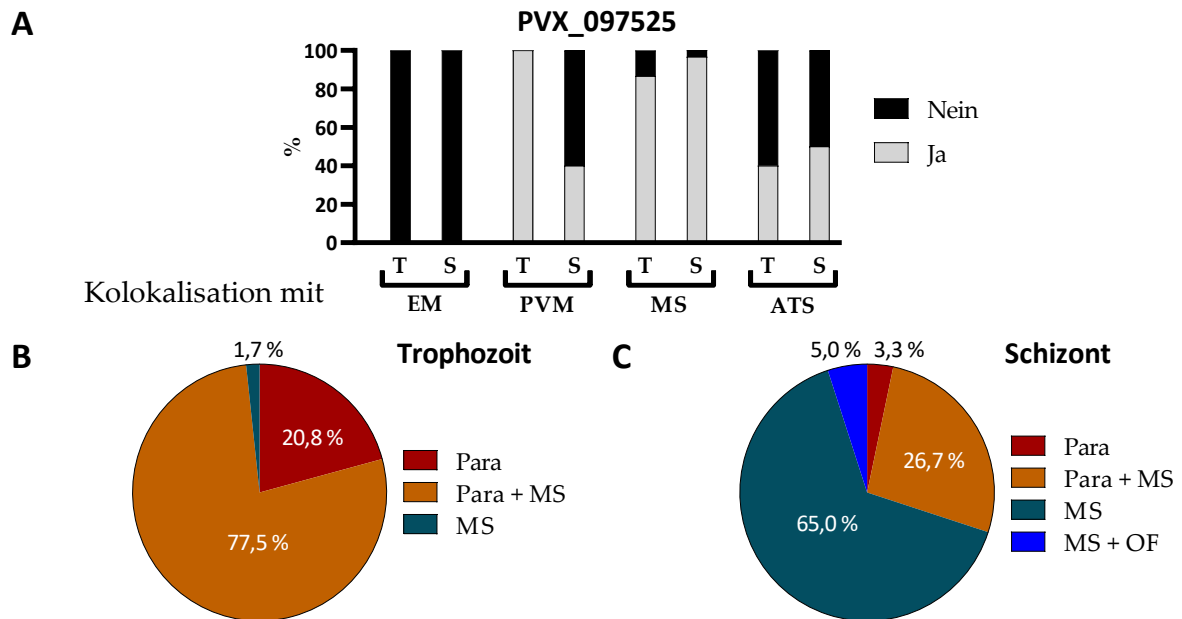


Abbildung 24: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_097525-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisierung zwischen dem Fusionsproteins PVX_097525-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisierung zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. B, C: Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

PVX_097525 ist eines von zwei Proteinen, bei dessen *in silico*-Analyse ein PEXEL-ähnliches Motiv und eine putative Transmembrandomäne vorhergesagt wurde. Auch hier wurde das Signal des Proteins wieder als punktiertes Muster im Zytosol der Wirtszelle gesehen, sowie akkumuliert im Parasiten. In den Lokalisationsstudien vom Trophozoitenstadium wurde das Protein bei 77,5 % der untersuchten iE im Parasiten und den Maurer'schen Spalten detektiert und bei 20,8 % nur im Parasiten. Nur bei 1,7 % der untersuchten iE lokalisierte das Protein ausschließlich in den Maurer'schen Spalten. Im Schizontenstadium dagegen lokalisierte das Protein hauptsächlich in den Maurer'schen Spalten (65 %) und nur zu 26,7 % im Parasiten und den Maurer'schen Spalten. Bei 3,3 % der untersuchten iE lokalisierte es im Parasiten und bei 5 % in den Maurer'schen Spalten und an der Oberfläche.

Mit Spektrin kolokalisiert das Protein in keinem der beiden Stadien, dagegen mit ETRAMP5 zu 100 % im Trophozoitenstadium und zu 40 % im Schizontenstadium. PVX_097525 kolokalisiert mit SBP1 im Trophozoitenstadium bei 86,7 % der untersuchten iE und im Schizontenstadium bei 96,7 %. Auch mit ATS kolokalisiert das VIR-Protein, zu 40 % im Trophozoitenstadium und zu 50 % im Schizontenstadium. Die Kolokalisation ist an den gelben Punkten in Abbildung 23 zu sehen.

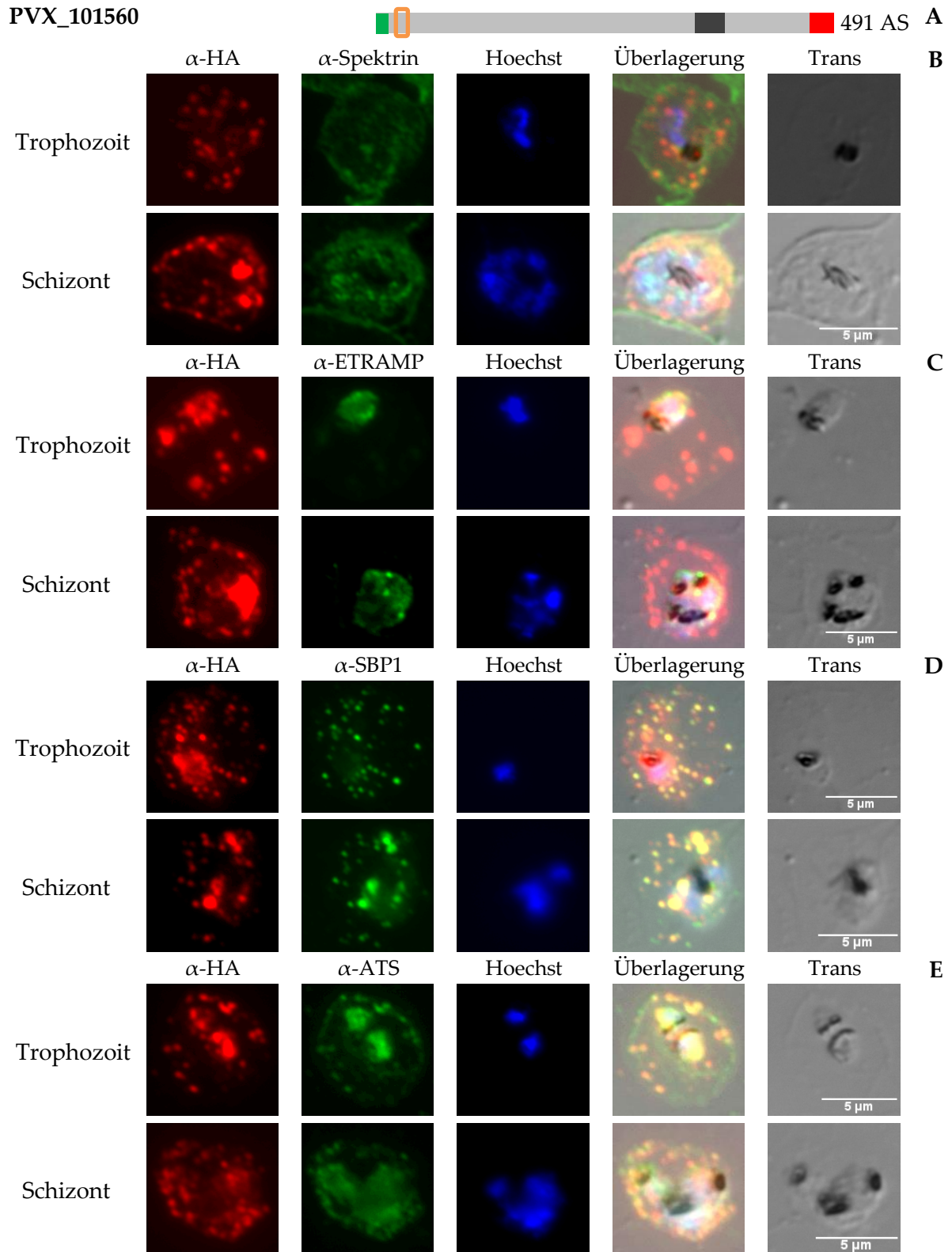


Abbildung 25: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_101560-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_101560-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau; Reifer N-Terminus: grün; Pexel-ähnliches Motiv: orange) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_101560-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kollokalisierung des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

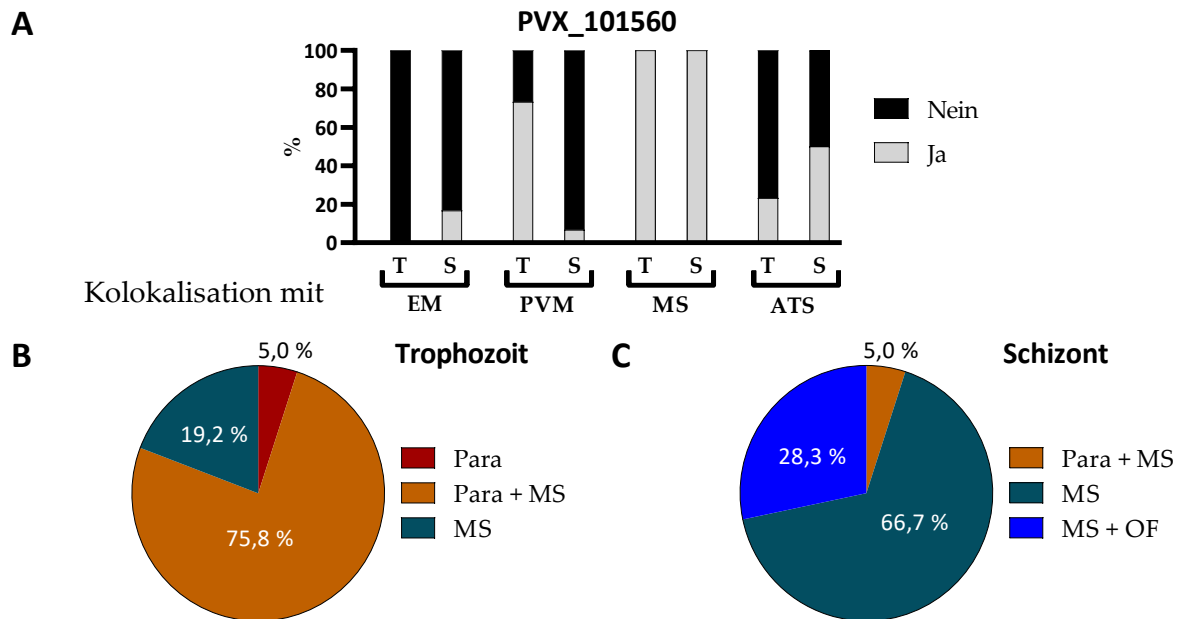


Abbildung 26: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_101560-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisation zwischen dem Fusionsproteins PVX_101560-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisation zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

Für das VIR-Protein PVX_101560 wurde ein PEXEL-ähnliches Motiv, ein reifer N-Terminus und eine Transmembrandomäne vorhergesagt. Auch bei diesem Protein wurde das Signal sowohl im Parasiten als auch punktuell über den gesamten iE verteilt gesehen. Im Trophozoitenstadium wurde bei 5 % der untersuchten iE das Signal des Proteins im Parasiten detektiert, in 75,8 % im Parasiten und den Maurer'schen Spalten und in 19,2 % nur in den Maurer'schen Spalten (Abbildung 26B). Im Schizontenstadium verschiebt sich die Verteilung und das Signal des Proteins wurde vermehrt in den Maurer'schen Spalten detektiert (66,7 %), sowie in diesen und an der Oberfläche des iE (28,3 %). Am seltensten wurde das Protein im Parasiten und den Maurer'schen Spalten detektiert (5,0 %; Abbildung 26C).

Bei 16,7 % der untersuchten iE kolokalisierte PVX_101560 mit Spektrin im Schizontenstadium, jedoch nicht im Trophozoitenstadium. Mit ETRAMP5 kolokalisierte das Protein bei 73,3 % der untersuchten iE im Trophozoitenstadium, bzw. 6,7 % im Schizontenstadium. Die Kolokalisation mit SBP1 betrug in beiden Stadien 100 %. Mit ATS kolokalisiert das VIR-Protein im Trophozoitenstadium bei 23,3 % der mikroskopierten iE und im Schizontenstadium bei 50 % (Abbildung 26A). In den IFA-Bildern ist die Kolokalisation in der Überlagerung an den gelben Punkten zu sehen (Abbildung 25D und E).

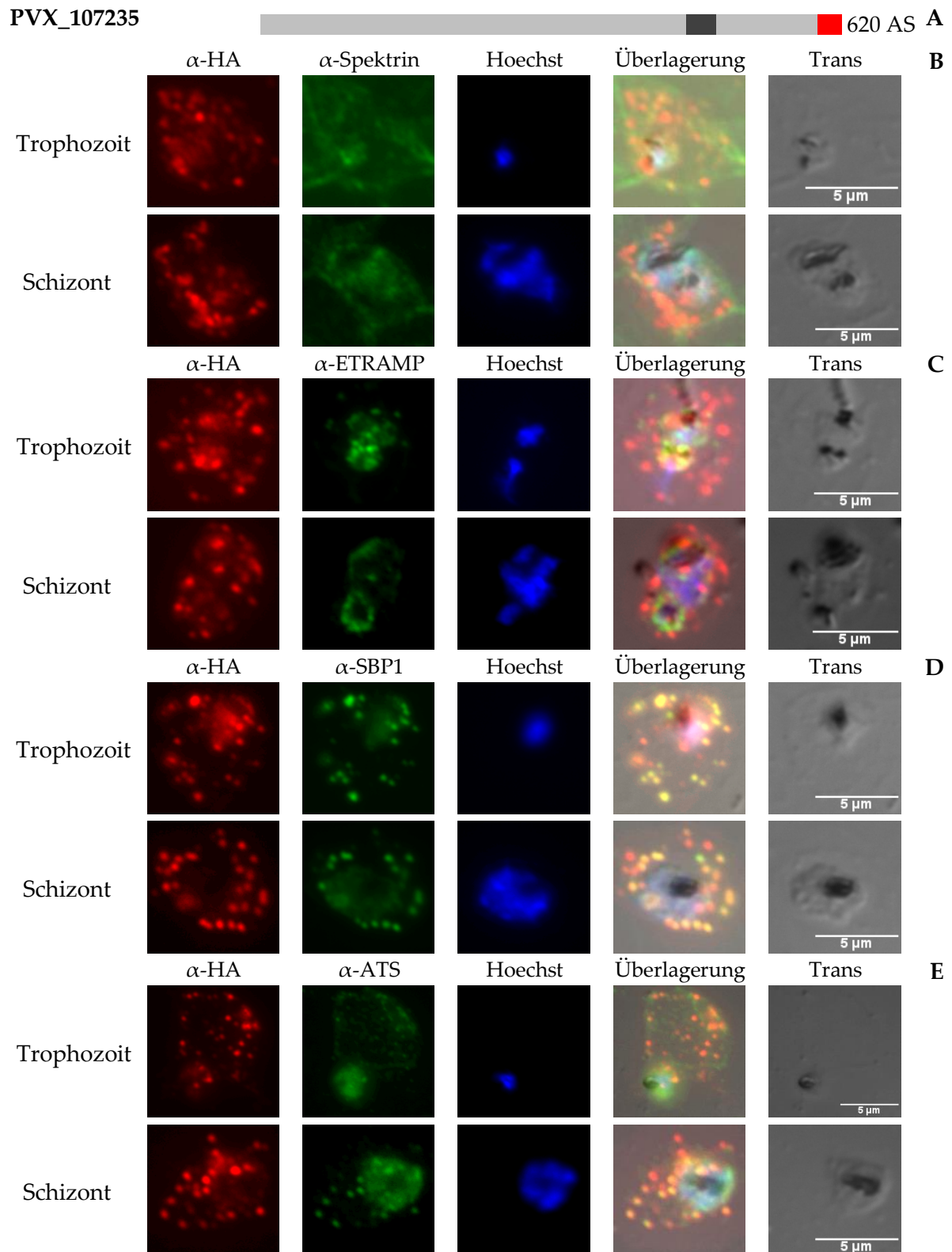


Abbildung 27: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_107235-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_107235-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau) B-E: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_107235-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. B: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. C: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. D: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. E: Überprüfung einer Kolo­kalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

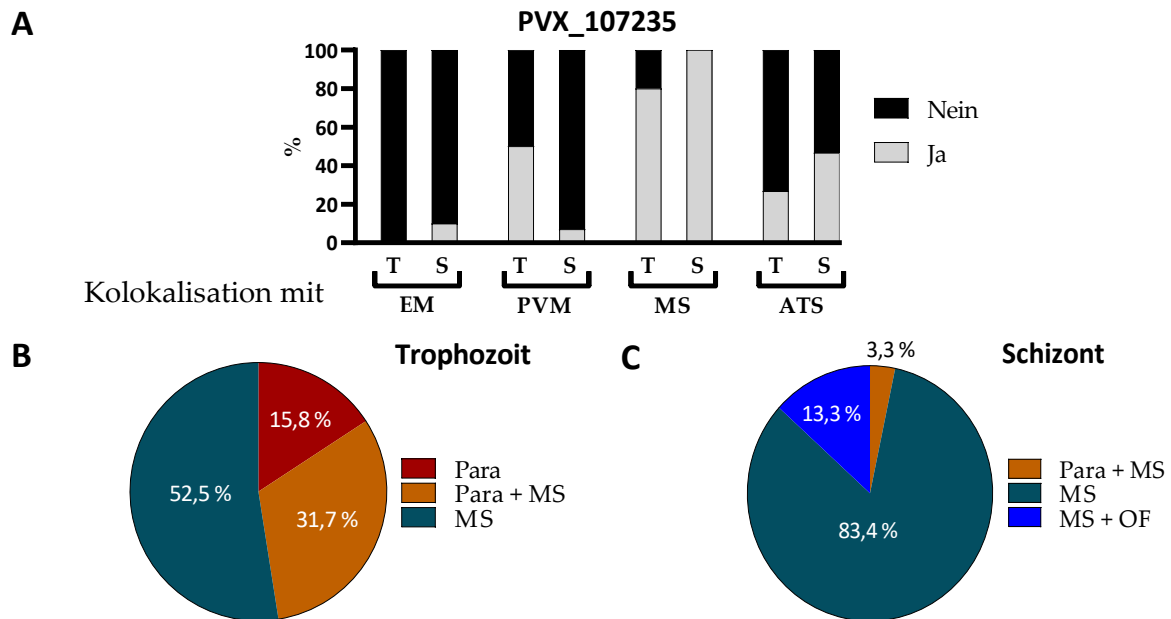


Abbildung 28: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_107235-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisierung zwischen dem Fusionsproteins PVX_107235-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisierung zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

Das VIR-Protein PVX_107235 weist neben einer putativen Transmembrandomäne keine anderen Exportsignale auf. Das Signal wurde sowohl punktiert verteilt über den gesamten Erythrozyten detektiert als auch nur im Parasiten. Im Trophozoitenstadium wurde das Protein bei 15,8 % aller untersuchten iE im Parasiten detektiert und bei 31,7 % zusätzlich noch in den Maurer'schen Spalten. Ausschließlich in diesen lokalisierte es bei 52,5 % der mikroskopierten iE (Abbildung 28B). Im Schizontenstadium wurde das Signal des Proteins bei 3,3 % der untersuchten iE im Parasiten und den Maurer'schen Spalten lokalisiert, aber zu 83,4 % nur in den Maurer'schen Spalten. In den Maurer'schen Spalten und an der Oberfläche wurde es bei 13,3 % der untersuchten iE gefunden (Abbildung 28C).

Mit Spektrin findet im Trophozoitenstadium keine Kolokalisation statt und im Schizontenstadium bei 10 % der untersuchten iE. Eine Kolokalisation des Proteins mit ETRAMP5 findet bei 50 % der untersuchten iE (Trophozoit), bzw. 7 % (Schizont) statt. Die höchste Kolokalisationsrate wurde in beiden Stadien mit SBP1 nachgewiesen (Trophozoit: 80 %, Schizont: 100 %). Auch mit ATS kommt es in beiden Stadien zu einer Kolokalisation (Trophozoit: 26,7 %, Schizont: 46,7 %). Die Kolokalisation ist in den IFA-Abbildung 27D und E an den gelben Punkten zu sehen.

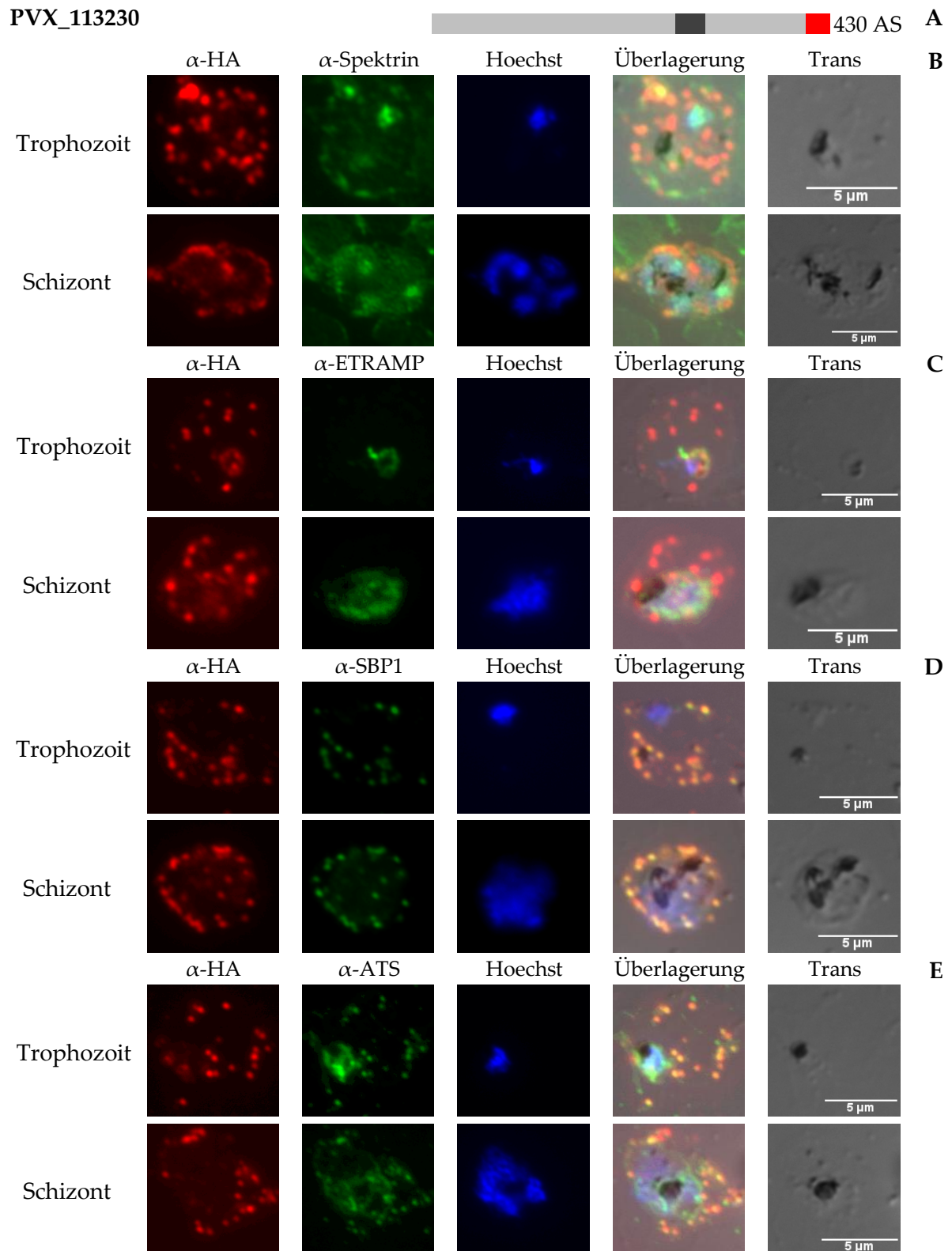


Abbildung 29: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_113230-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. **A:** Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_113230-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau) **B-E:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_113230-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. **B:** Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. **C:** Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. **D:** Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. **E:** Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

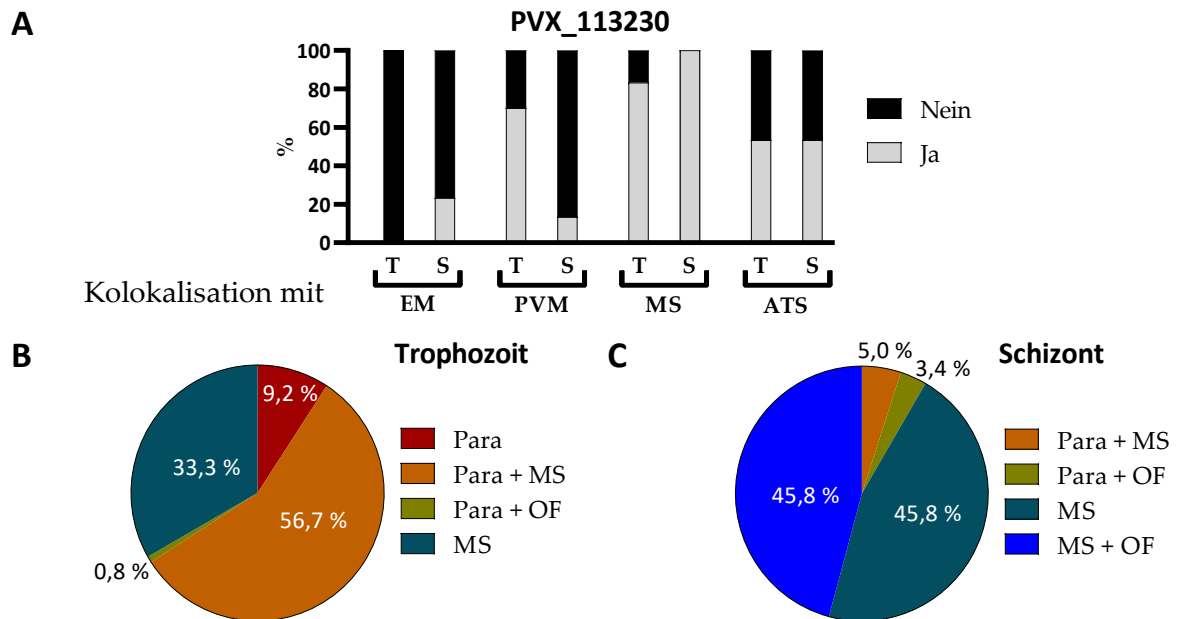


Abbildung 30: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_113230-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisation zwischen dem Fusionsproteins PVX_113230-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisation zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. **B, C:** Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

Bei der *in silico*-Analyse des VIR-Proteins PVX_113230 wurde nur eine Transmembrandomäne vorhergesagt. Auch hier wurde eine punktuelle Verteilung über den gesamten iE und eine Lokalisation im Parasiten beobachtet. Im Trophozoitenstadium lokalisierte das Protein bei 56,7 % aller mikroskopierten iE im Parasiten und den Maurer'schen Spalten. Des Weiteren wurde es bei 9,2 % nur im Parasiten und bei 0,8 % zusätzlich an der Oberfläche nachgewiesen. Bei 33,3 % aller untersuchten iE wurde PVX_113230 nur in den Maurer'schen Spalten detektiert (Abbildung 30B). Im Schizontenstadium lokalisiert es bei 45,8 % aller untersuchten iE in die Maurer'schen Spalten und bei 45,8% zusätzlich noch an der Oberfläche. Im Parasiten und den Maurer'schen Spalten wurde es bei 5 % der untersuchten iE detektiert und bei 3,4 % im Parasiten und an der Oberfläche (Abbildung 30C).

Mit Spektrin kolokalisierte das Protein nur im Schizontenstadium (23,3 %). Bei der Kolokalisation mit ETRAMP5 wurde bei 70 % der Trophozoiten und bei 13,3 % der Schizonten eine Übereinstimmung detektiert. PVX_113230 kolokalisierte im Trophozoitenstadium bei 83,3 % der mikroskopierten iE mit SBP1 und zu 100 % im Schizontenstadium. Auch mit ATS konnte eine Kolokalisation beobachtet werden (Trophozoit: 53,3 %, Schizont: 53,3 %). Die Kolokalisationen mit SBP1 und ATS sind in den IFA-Bildern durch die gelben Punkte sichtbar (Abbildung 29D und E).

PVX_115475

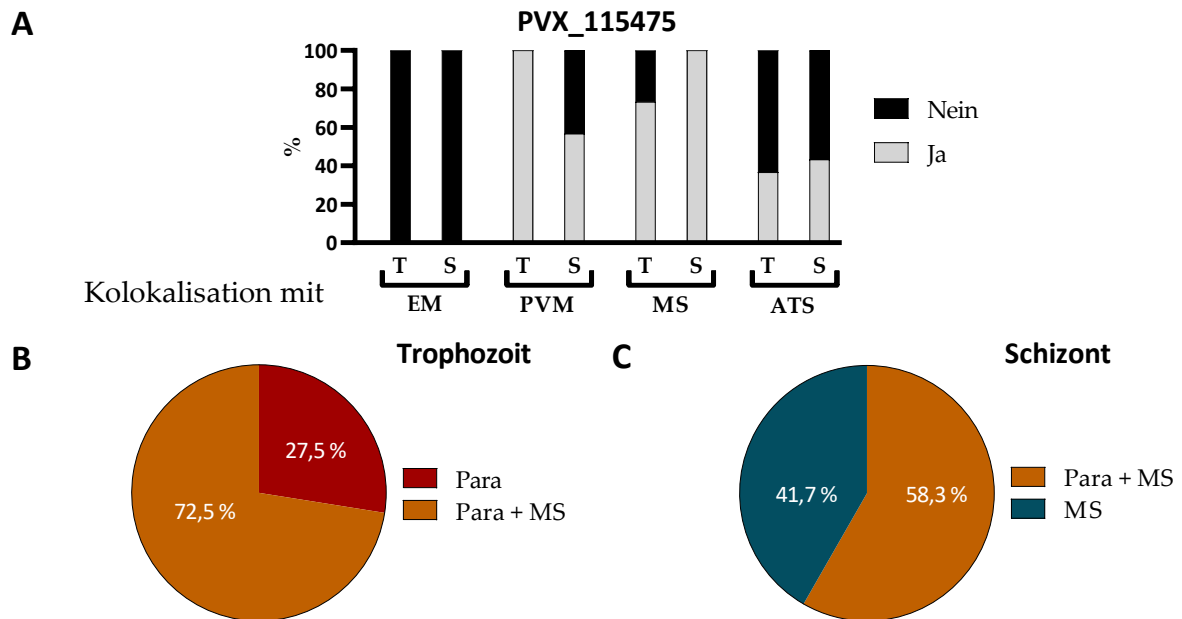


Abbildung 31: Lokalisationsstudien des Fusionsproteins PVX_115475-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. A: Kolokalisation zwischen dem Fusionsproteins PVX_115475-3xHA mit den Zellkompartimenten Erythrozytenmembran (EM), parasitophore Vakuolenmembran (PVM), Maurer'schen Spalten (MS), ATS-Domäne des PfEMP1 Proteins. T: Trophozoit; S: Schizont; Ja/Nein: Positive/Negative Kolokalisation zwischen dem Fusionsprotein und dem ausgewählten Zellkompartiment. B, C: Übersicht der Lokalisierung im Trophozoiten- (B) und Schizontenstadium (C). Para: im Parasiten; MS: in den Maurer'schen Spalten; OF: an der Erythrozytenoberfläche. Es wurden je Entwicklungsstadium 120 Parasiten mit 3xHA-Signal ausgezählt.

Das VIR-Protein PVX_115475 weist in seiner Aminosäuresequenz neben einer putative Transmembrandomäne auch einen reifen N-Terminus auf. Das Signal des Proteins wurde überwiegend im Parasiten und punktuell über den iE verteilt detektiert. Im Trophozoitenstadium ist das Protein bei 27,5 % der untersuchten iE im Parasiten lokalisiert und bei 72,5 % zusätzlich in den Maurer'schen Spalten (Abbildung 31B). Im Schizontenstadium lokalisierte das Protein bei 58,3 % der untersuchten iE im Parasiten und den Maurer'schen Spalten und bei 41,7 % nur in diesen (Abbildung 31C).

Mit Spektrin konnte in keinem der beiden Stadien eine Kolokalisation festgestellt werden, dagegen kolokalisieren alle iE im Trophozoitenstadium mit ETRAMP5 und 56,7 % im Schizontenstadium. Bei der Kolokalisation mit SBP1 sind dies 73,3 % (Trophozoit), bzw. 100 % (Schizont) und mit ATS kolokalisieren 36,7 % der iE im Trophozoitenstadium und 43,3 % im Schizontenstadium. Auch bei diesem VIR-Protein ist die Kolokalisation in den IFA-Bildern an den gelben Punkten zu sehen (Abbildung 32).

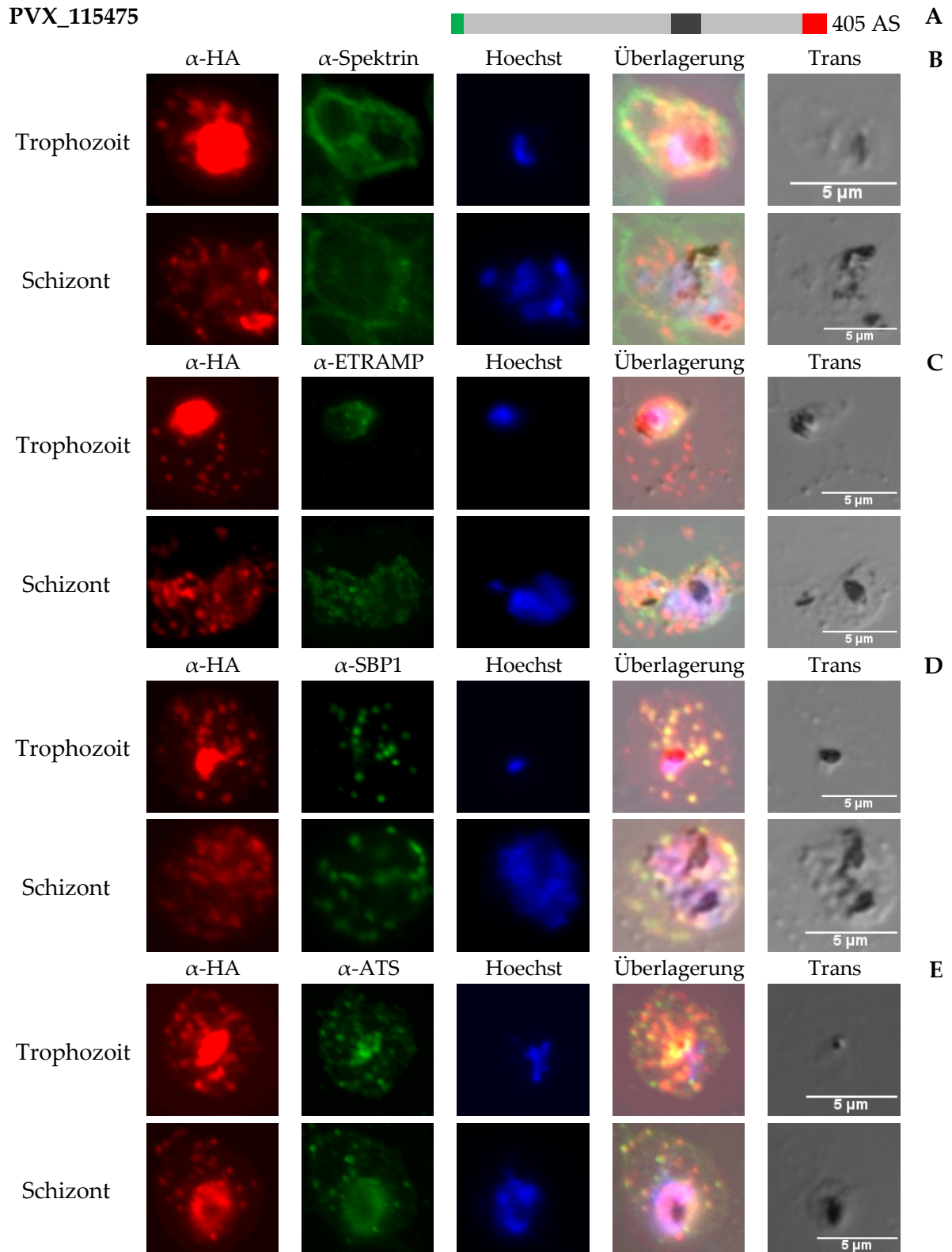


Abbildung 32: Lokalisation des VIR-Proteins PVX_115475-3xHA in einer transgenen *P. falciparum* Zelllinie. **A:** Schematische Darstellung des Fusionsproteins PVX_115475-3xHA (3xHA: rot; Transmembrandomäne: dunkelgrau; Reifer N-Terminus: grün) **B-E:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transgener Parasiten zur Lokalisation des Fusionsproteins PVX_115475-3xHA in den zwei Entwicklungsstadien Trophozoit und Schizont. **B:** Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Erythrozytenmembran-assoziierten Protein Spektrin. **C:** Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem parasitophoren Vakuolenmembran-Protein ETRAMP5. **D:** Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Maurer'schen Spalten-Protein SBP1. **E:** Überprüfung einer Kolokalisation des Fusionsproteins mit der ATS-Domäne des Oberflächen-assoziierten Proteins PfEMP1. Roter Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 594; Grüner Fluoreszenzfarbstoff: Alexa Fluor 488 Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst verwendet.

3.5 Detektion einer möglichen Oberflächenlokalisierung der 13 untersuchten VIR-Proteine mittels Western Blot-Analyse

Mit der Western Blot-Analyse sollte eine mögliche Oberflächenlokalisierung bestätigt werden. Dafür wurden iE, welche sich im späten Schizontenstadium befanden, gesammelt und in zwei gleich große Proben geteilt. Die eine Probe wurde mit dem Enzym Trypsin versetzt, wodurch alle sich auf der Oberfläche befindlichen Proteine abgebaut wurden. Die andere Probe wurde nicht mit Trypsin behandelt und diente im weiteren Verlauf als Kontrolle. Nach der Inkubation mit dem Enzym wurden beide Proben für die Western Blot-Analyse aufgearbeitet und mittels dieser untersucht. Dabei erfolgten insgesamt drei Analysen mit drei verschiedenen Antikörpern. Für die erste Analyse wurde ein Antikörper verwendet, welcher das Maurer'sche Spalten-Protein SBP1 detektiert. Diese Analyse war eine Kontrolle, ob die verwendete Probenmenge gleich war. Bei der zweiten Analyse wurde ein Antikörper benutzt, welcher an die ATS-Domäne der PfEMP1 bindet. Dies war die Kontrolle, ob der enzymatische Abbau erfolgreich war. Dabei sollte das Signal der mit Trypsin behandelten Probe im Vergleich schwächer sein als das Signal von dessen Kontrolle. Bei der dritten Analyse wurde geprüft, ob das VIR-Protein eine Oberflächenlokalisierung aufweist. Dafür wurde der α -HA-Antikörper verwendet. Wurde ein Unterschied in der Signalintensität zwischen der mit Trypsin behandelten Probe und der Kontrolle festgestellt, so deutet dies auf eine Oberflächenlokalisierung hin. Für alle drei Analysen wurde neben dem spezifischen Erstantikörper noch ein zweiter Antikörper verwendet, welcher an den ersten bindet und mit dem Enzym HRP (engl. *horseradish peroxidase*) konjugiert ist.

Im nachfolgenden sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse aufgeführt.

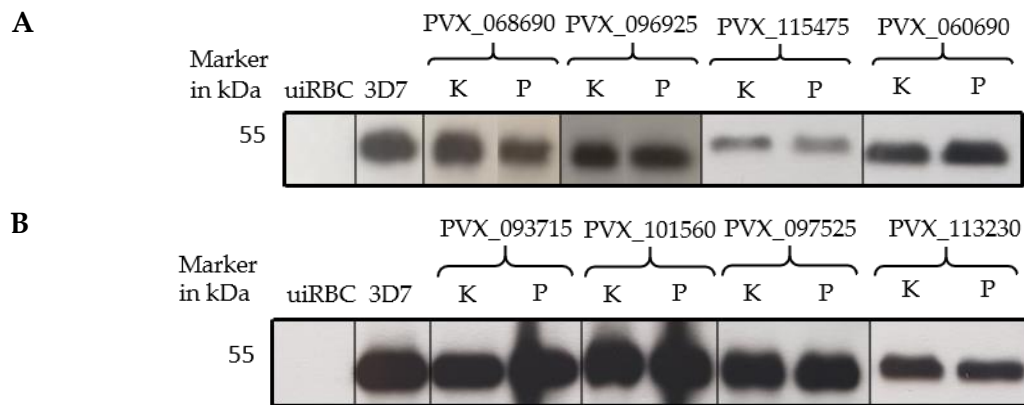


Abbildung 33: Kontrolle der verwendeten Probenmenge von 8 VIR-Fusionsproteinen. Trophozoiten (30 h nach Invasion) wurden mittels MACS angereichert. Jede Probe wurde in zwei Teile geteilt, der eine Teil als Kontrolle auf Eis gelagert (K: Kontrolle), während der andere Teil mit Trypsin behandelt wurde (P: Trypsin-behandelte Probe). Im Anschluss wurden beide Proben mit einem hypotonen Puffer lysiert, der Überstand und das Sediment durch Zentrifugation getrennt und das Sediment anschließend mittels Western Blot und Immunfärbung analysiert. In jede Bahn wurde ein Äquivalent von 1×10^7 Zellen geladen. Die Detektion erfolgte mittels α -SBP-1-Antikörper (1:2000). uiRBC: uninfierte Erythrozyten; 3D7: nicht transfizierter *P. falciparum* 3D7-Laborstamm; PVX_XXXXXX: mit dem Fusionsprotein transfizierter *P. falciparum* 3D7-Laborstamm.

Mit dieser Western Blot-Analyse wurde kontrolliert, ob die aufgetragene Probenmenge zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Probe äquivalent zueinander ist. Als weitere Kontrolle, ob der α -SBP1 Antikörper spezifisch reagiert, wurden nicht infizierte Erythrozyten (Negativkontrolle, Bahn 1) und mit der Stammkultur 3D7 infizierte Erythrozyten (Positivkontrolle, Bahn 2) aufgetragen.

Für alle untersuchten Transfektanten ergab die Western Blot-Analyse eine gleiche Signalintensität für SBP1 zwischen der Kontrolle und der jeweiligen Probe (Abbildung 33).

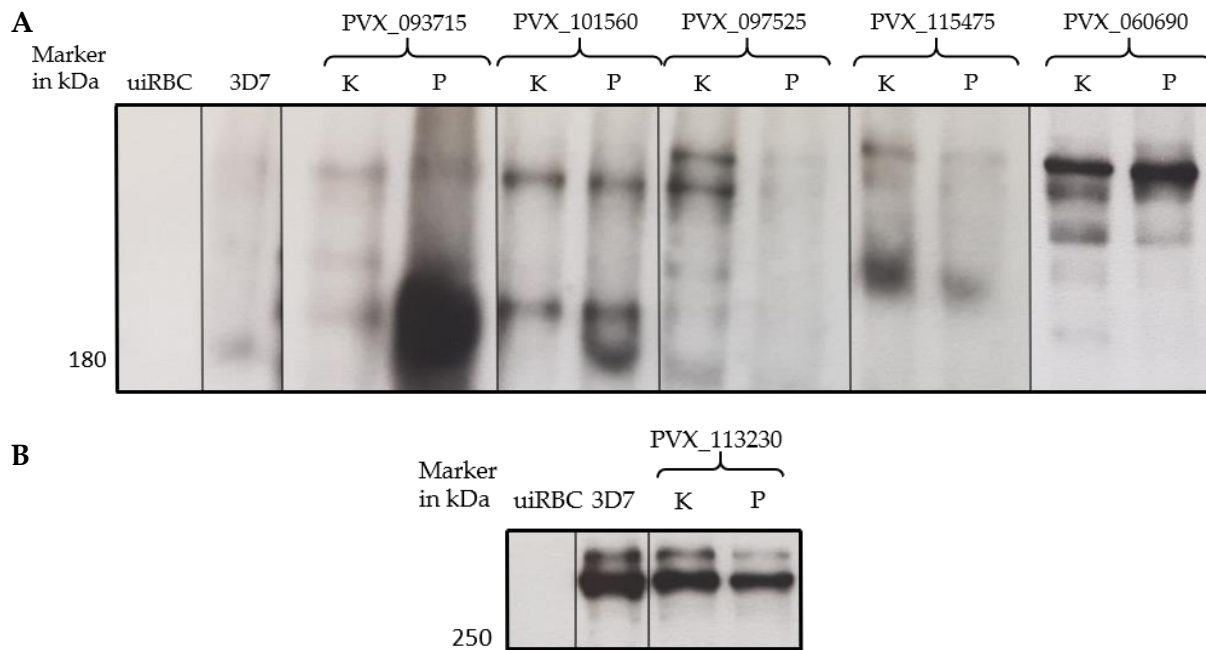


Abbildung 34: Kontrolle des enzymatischen Abbaus der Proteine auf der Erythrozytenmembran mittels *Pf*EMP1. Trophozoiten (30 h nach Invasion) wurden mittels MACS angereichert. Jede Probe wurde in zwei Teile geteilt, der eine Teil als Kontrolle auf Eis gelagert (K: Kontrolle), während der andere Teil mit Trypsin behandelt wurde (P: Trypsin-behandelte Probe). Im Anschluss wurden beide Proben mit einem hypotonen Puffer lysiert, der Überstand und das Sediment durch Zentrifugation getrennt und das Sediment anschließend mittels Western Blot und Immunfärbung analysiert. In jede Bahn wurde ein Äquivalent von 1×10^7 Zellen geladen. Die Detektion erfolgte mittels α -ATS-Antikörper (1:500). uiRBC: uninfizierte Erythrozyten; 3D7: nicht transfizierter *P. falciparum* 3D7-Laborstamm; PVX_XXXXXX: mit dem Fusionsprotein transfizierter *P. falciparum* 3D7-Laborstamm.

*Pf*EMP1 sind auf der Oberfläche von iE situiert und sind aus mehreren Domänen aufgebaut, u. a. der am C-Terminus lokalisierten ATS-Domäne. Diese Domäne wird von einem spezifischen Antikörper erkannt, wodurch die Detektion der *Pf*EMP1 in der Western Blot-Analyse möglich ist. In dieser Arbeit wurde der Antikörper als Kontrolle verwendet, ob der enzymatische Abbau des extrazellulären Teils des *Pf*EMP1 Proteins mittels Trypsin erfolgreich war oder nicht. Dabei wird erwartet, dass die mit Trypsin behandelten Proben ein schwächeres Signal zeigen als die PBS-Kontrolle der jeweiligen Proben. Als Kontrollen wurden ebenfalls wieder uninfizierte Erythrozyten und die Stammkultur 3D7 verwendet. Ein Signal sollte nur bei der Stammkultur detektiert werden, jedoch nicht bei der Kontrolle mit den uninfizierten Erythrozyten.

Eine Abnahme des Signals wurde nur bei den Proben von PVX_097525 und PVX_115475 beobachtet. Bei allen anderen VIR-Proteinen konnte keine Signalabnahme beobachtet werden. Die Western Blot-Analyse von PVX_068690 und PVX_096925 war nicht erfolgreich. Bei den Proben von PVX_060690, PVX_093715, PVX_101560 und PVX_113230 konnte in der Signalintensität zwischen PBS-Kontrolle und mit Trypsin behandelte Probe kein Unterschied festgestellt werden.

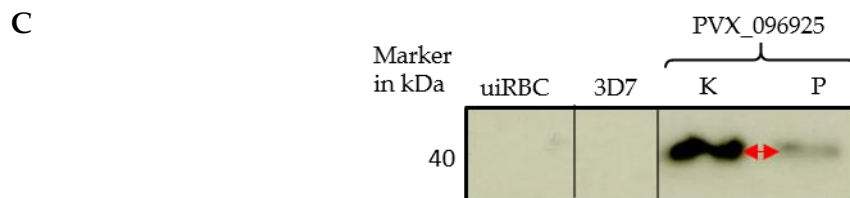
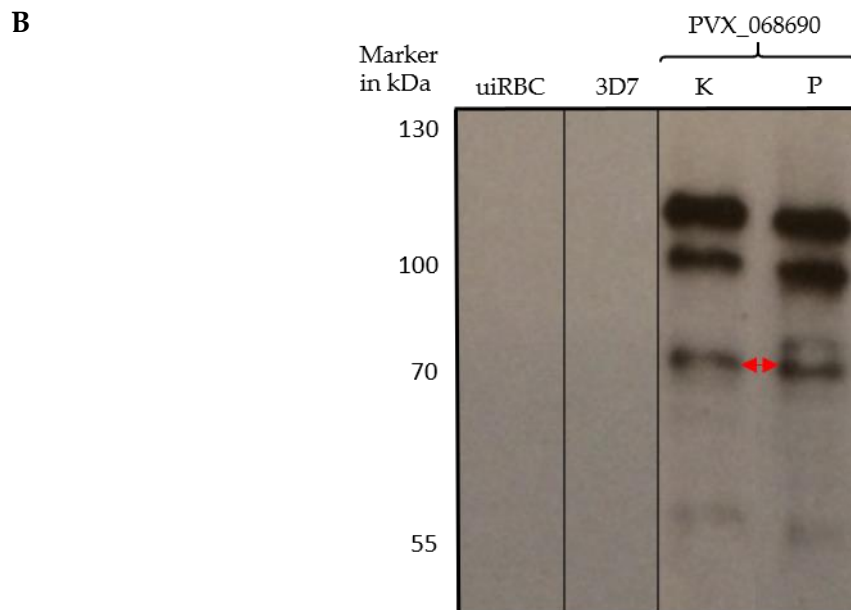
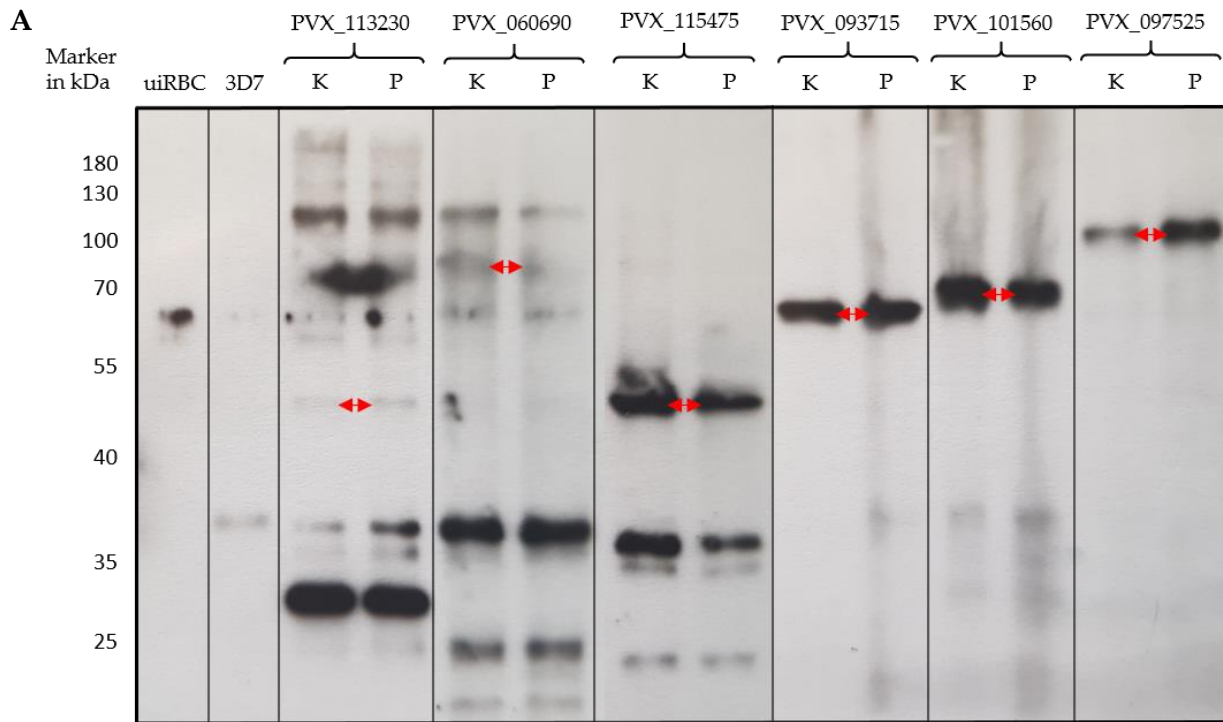


Abbildung 35: Untersuchung der Oberflächenassoziation von 8 VIR-Proteinen. Trophozoit (30 h nach Invasion) wurden mittels MACS angereichert. Jede Probe wurde in zwei Teile geteilt, der eine Teil als Kontrolle auf Eis gelagert (K: Kontrolle), während der andere Teil mit Trypsin behandelt wurde (P: Trypsin-behandelte Probe). Im Anschluss wurden beide Proben mit einem hypotonen Puffer lysiert, der Überstand und das Sediment durch Zentrifugation getrennt und das Sediment anschließend mittels Western Blot und Immunfärbung analysiert. In jede Bahn wurde ein Äquivalent von 1×10^7 Zellen geladen. Die Detektion erfolgte mittels α -HA (1:3000). Der rote Pfeil markiert das VIR-Protein mit errechneten molekularen Masse. uiRBC: uninfizierte Erythrozyten; 3D7: nicht transfizierter *P. falciparum* 3D7-Laborstamm; PVX_XXXXXX: mit dem Fusionsprotein transfizierter *P. falciparum* 3D7-Laborstamm.

Bei den Western Blot-Analysen mit dem α -HA-Antikörper wurden als Kontrolle ebenfalls nicht infizierte Erythrozyten und die nicht transfizierte Stammkultur 3D7 verwendet. Bei beiden Kontrollen sollte kein Signal detektiert werden. Bei der Betrachtung der Bilder sieht man jedoch, dass in der Bahn von der Stammkultur 3D7 in Abbildung 35A ein Signal bei 37 kDa zu sehen ist. Jedoch ist in den anderen Western Blot-Analysen kein Signal zu sehen, obwohl für alle Analysen dieselben Proben der Stammkultur 3D7 verwendet wurden.

Die errechnete molekulare Masse von PVX_113230 inklusive dem 3xHA-Tag beträgt 47,4 kDa. Bei der Western Blot-Analyse von PVX_113230 wurden mehrere Signale detektiert, u.a. ein schwaches Signal bei ca. 50 kDa. Das stärkste Signal liegt bei ca. 30 kDa. Weitere eindeutige Signale sind bei ca. 37 kDa, 38 kDa, 60 kDa sowie 110 kDa sichtbar. Es konnte kein Unterschied in der Signalintensität zwischen der Kontrolle und der Probe festgestellt werden (Abbildung 35A).

Für PVX_060690 inklusive dem 3xHA-Tag wurde eine molekulare Masse von 76,6 kDa ausgerechnet. In der Western Blot-Analyse sind insgesamt sechs Signale zu sehen, wobei ein sehr schwaches bei ca. 80 kDa zu sehen ist. Das stärkste Signal ist bei ca. 37 kDa sichtbar. Die weiteren Signale wurden bei ca. 20 kDa, 25 kDa, 60 kDa, und 110 kDa detektiert. Die Signale der Kontrolle und der Probe weisen die gleiche Signalintensität auf (Abbildung 35A).

Bei der Western Blot-Analyse von PVX_115475 wurden vier Signale von ca. 24 kDa, 35 kDa, 36 kDa und ca. 50 kDa detektiert. Die errechnete molekulare Masse des Fusionsproteins beträgt 44,7 kDa. Zwischen der Kontrolle und der Probe wurde kein Unterschied in der Signalintensität nachgewiesen (Abbildung 35A).

Die errechnete molekulare Masse für PVX_093715 inklusive dem 3xHA-Tag beträgt 58,2 kDa. In der Western Blot-Analyse wurde nur ein Signal bei ca. 60 kDa detektiert. In der Signalintensität zwischen Kontrolle und Probe konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 35A).

Bei der Western Blot-Analyse von PVX_101560 wurde nur ein Signal bei ca. 68 kDa detektiert. Die molekulare Masse des VIR-Proteins inklusive dem 3xHA-Tag beträgt 54,1 kDa. Bei der Intensität der Signale zwischen Kontrolle und Probe konnte kein Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 35A).

Die errechnete molekulare Masse von PVX_097525 inklusive dem 3xHA-Tag beträgt 60,2 kDa. In der Western Blot-Analyse konnte nur ein Signal bei 100 kDa detektiert werden.

Bei diesem Protein ist das Signal der Kontrolle schwächer als das Signal der mit Trypsin behandelten Probe (Abbildung 35A).

Bei PVX_068690 wurden vier Signale detektiert. Das schwächste Signal bei ca. 58 kDa, die nächsten bei ca. 70 kDa und ca. 100 kDa und das stärkste bei ca. 110 kDa. Die Intensität der Signale zwischen Kontrolle und Probe unterscheidet sich nicht. Die errechnete molekulare Masse inklusive dem 3xHA-Tag beträgt 62,5 kDa (Abbildung 35B).

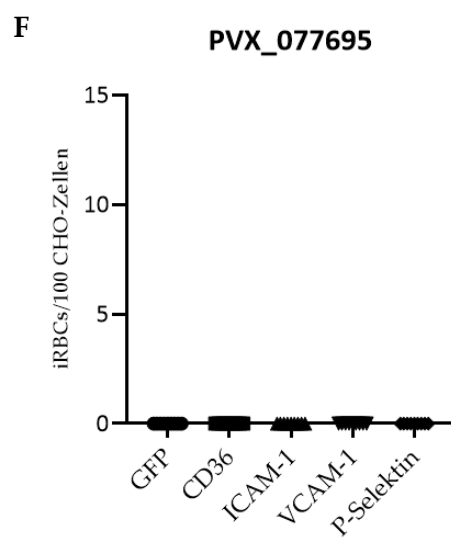
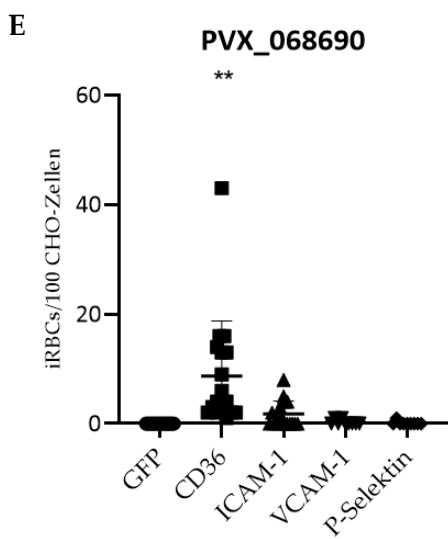
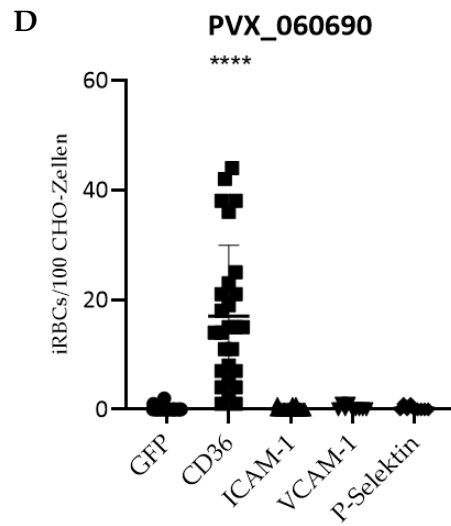
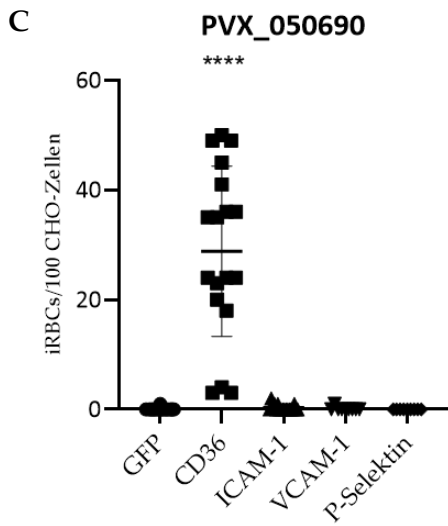
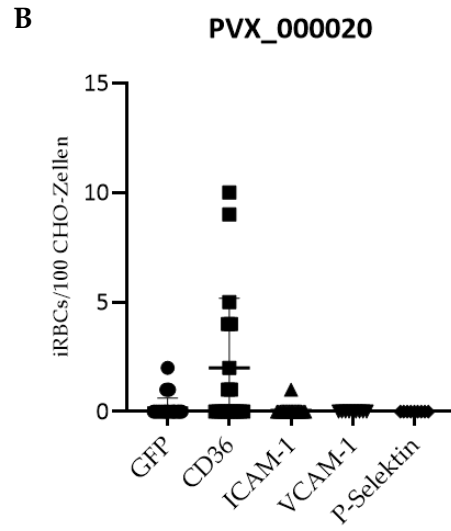
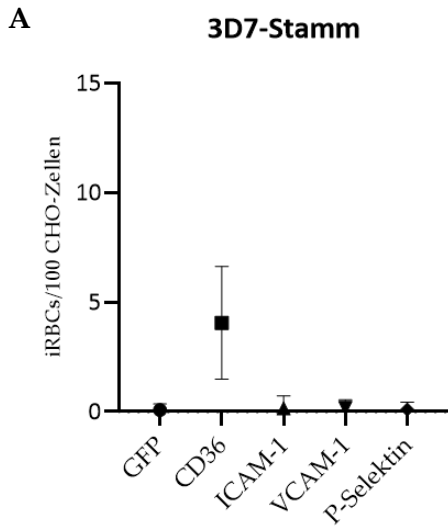
Beim Fusionsprotein PVX_096925 war das Signal der mit Trypsin behandelten Probe schwächer als das Signal der Kontrolle. Dies konnte bei einer Wiederholung des Versuchs bestätigt werden (Abbildung nicht gezeigt). Das Signal wurde bei ca. 40 kDa detektiert, die errechnete molekulare Masse des Fusionsproteins beträgt 33,9 kDa (Abbildung 35C).

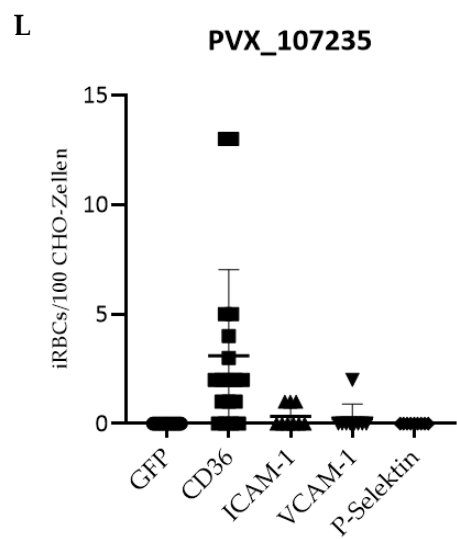
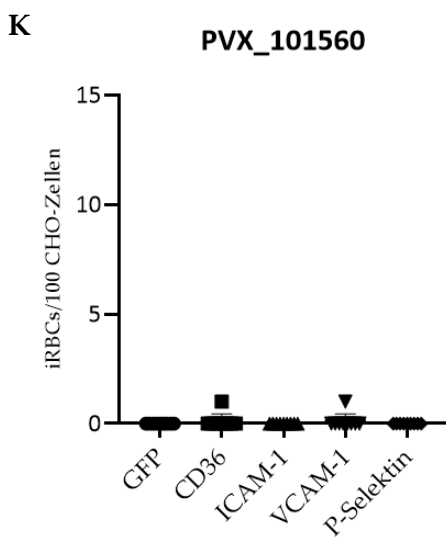
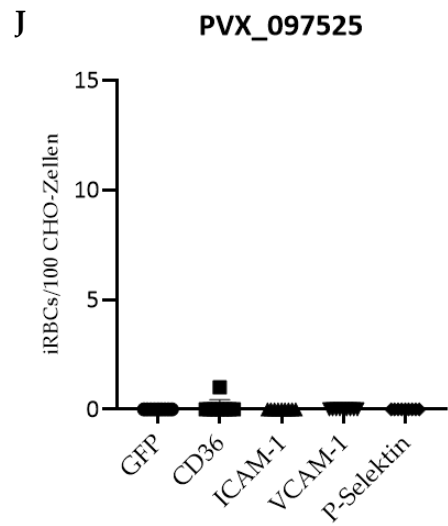
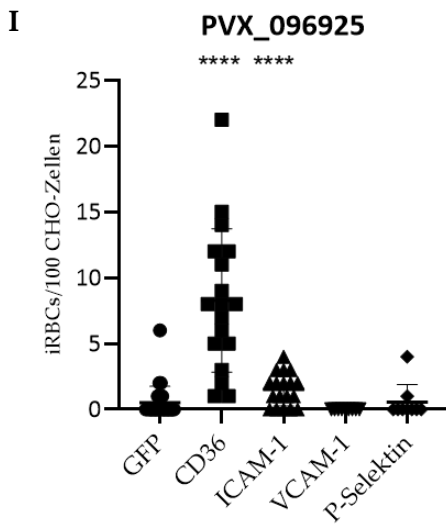
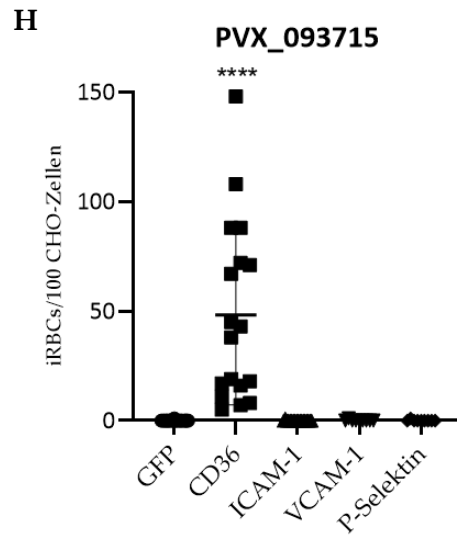
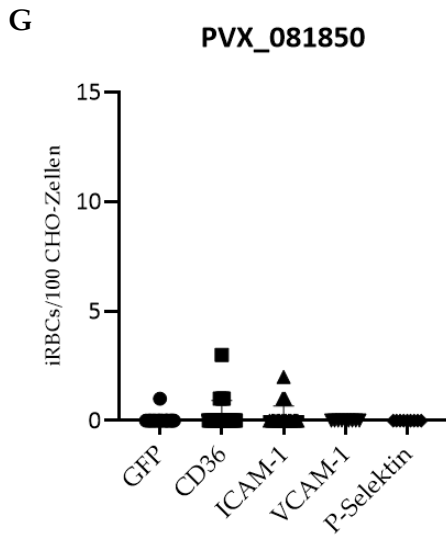
3.6 Analyse der Adhäsion der *P. falciparum* VIR-Transfektanten an die Endothelzellrezeptoren CD36, ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin

3.6.1 Bindungsversuche unter statischen Bedingungen

Um die Bindungspartner der mit den *vir*-Gen transfizierten *P. falciparum*-Zelllinien zu ermitteln, wurde ein Bindungsversuch unter statischen Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden vier verschiedene Endothelzellrezeptoren verwendet, sowie ein Kontrolle. Für die Synthese der Rezeptoren, sowie für die Kontrolle wurden CHO-Zelllinien verwendet, welche mit einem Vektor, in dem das jeweiligen Rezeptorgen ligiert war, transfiziert wurden. Bei der Kontrolle wurden die CHO-Zellen mit einem Vektor ohne Rezeptorgen transfiziert. Die Kontrolle wird im nachfolgenden als CHO-GFP bezeichnet und die vier anderen Zelllinien jeweils nach dem Rezeptor, CHO-CD36, CHO-ICAM-1, CHO-VCAM-1 und CHO-P-Selektin. Es wurde die Bindung der infizierten Erythrozyten der 13 transgenen *P. falciparum*-Zelllinien sowie die Stammkultur 3D7 (Kontrolle) an diese Rezeptoren untersucht. Die für die Bindungsversuche verwendeten iE waren alle im Trophozoitenstadium (ca. 28h nach Invasion).

Im nachfolgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Bindungsversuche aufgeführt. Eine Bindung wird als „schwach“ bezeichnet, wenn ≤ 3 iE gebunden haben, Bindungen darüber werden als „moderat“ bezeichnet.





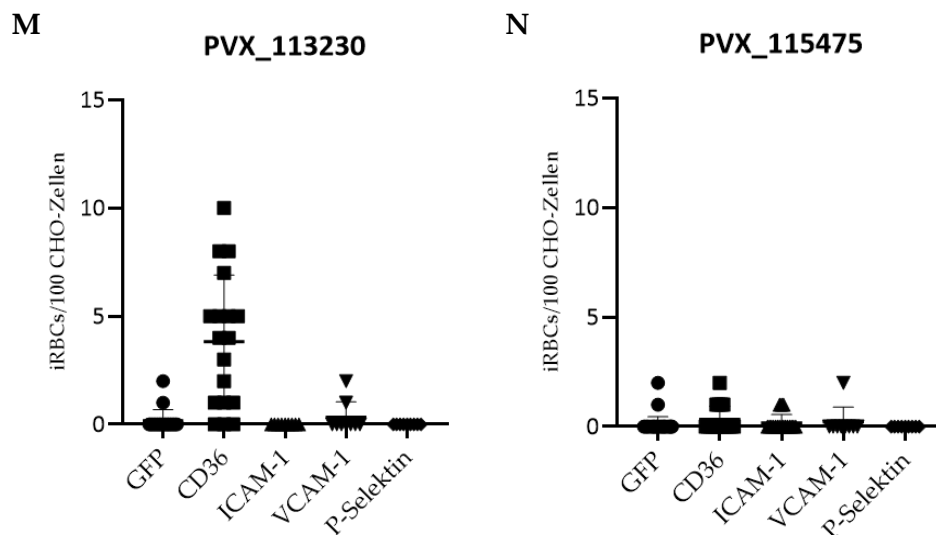


Abbildung 36: Statische Bindungsexperimente mit den iE der Stammkultur 3D7 und den iE der 13 verschiedenen transgenen *P. falciparum*-Zelllinien. Die Punkte geben an, wie viele Erythrozyten spezifisch an 100 CHO-Zellen gebunden haben, auf denen die Endothelzellrezeptor CD36, ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin präsentiert werden. Die Negativkontrolle (GFP) synthetisiert keinen spezifischen Rezeptor. Die Experimente wurden als Triplikat durchgeführt und pro Experiment 300 CHO-Zellen mikroskopisch ausgezählt. A: Die Signifikanz bezieht sich auf die Werte von CD36 in Abbildung 36A und wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. ****: $p < 0,0001$; **: $p < 0,01$

An die Kontrolle CHO-GFP konnte keine, bzw. nur eine sehr schwache Bindung beobachtet werden.

Von 3D7-iE wurde eine moderate Bindung an CHO-CD36 ($4,1 \pm 2,6$ (iRBCs/100 CHO-Zellen)) beobachtet. Für pARL_PVX_050690^{HA}-iE, pARL_PVX_060690^{HA}-iE, pARL_PVX_068690^{HA}-iE, pARL_PVX_093715^{HA}-iE und pARL_PVX_096925^{HA}-iE wurde ebenfalls eine moderate Bindung detektiert. Dabei zeigt pARL_PVX_093715^{HA}-iE die höchste Bindung mit $48,3 \pm 41,0$ iRBCs/100 CHO-Zellen ($p < 0,0001$) gefolgt von pARL_PVX_050690^{HA}-iE ($28,8 \pm 15,5$ (iRBCs/100 CHO-Zellen); $p < 0,0001$) und pARL_PVX_060690^{HA}-iE ($17,0 \pm 12,9$ (iRBCs/100 CHO-Zellen); $p < 0,0001$). pARL_PVX_068690^{HA}-iE ($8,7 \pm 10,1$ (iRBCs/100 CHO-Zellen); $p < 0,01$) und pARL_PVX_096925^{HA}-iE ($8,3 \pm 5,4$ (iRBCs/100 CHO-Zellen); $p < 0,0001$) weisen sehr ähnliche Bindungswerte auf, wobei die Signifikanz von pARL_PVX_068690^{HA}-iE zur Stammkultur niedriger ist. Für pARL_PVX_000020^{HA}-iE, pARL_PVX_107235^{HA}-iE und pARL_PVX_113230^{HA}-iE ist eine Bindung zu beobachten, die schwächer ist als die von 3D7-iE (Abbildung 36B: $2,0 \pm 3,2$ iRBCs/100 CHO-Zellen; Abbildung 36F: $3,1 \pm 3,9$ iRBCs/100 CHO-Zellen; Abbildung 36A: $3,8 \pm 3,1$ iRBCs/100 CHO-Zellen). Für pARL_PVX_081850^{HA}-iE, pARL_PVX_097525^{HA}-iE, pARL_PVX_101560^{HA}-iE und pARL_PVX_115475^{HA}-iE konnte nur eine sehr schwache Bindung festgestellt werden (Abbildung 36A: $0,3 \pm 0,7$ iRBCs/100 CHO-

Zellen; Abbildung 36D: $0,1 \pm 0,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen; Abbildung 36E: $0,1 \pm 0,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen; Abbildung 36B: $0,3 \pm 0,6$ iRBCs/100 CHO-Zellen). Keine Bindung konnte für pARL_PVX_077695^{HA}-iE nachgewiesen werden.

An den Rezeptor ICAM-1 konnte nur für die iE der transgenen Zelllinie von pARL_PVX_096925^{HA}-iE eine signifikante Bindung detektiert werden ($1,5 \pm 1,2$ iRBCs/100 CHO-Zellen). Für die iE der anderen 12 transgenen Zelllinien mit dem jeweiligen Fusionsprotein wurde entweder keine Bindung (pARL_PVX_077695^{HA}-iE, pARL_PVX_097525^{HA}-iE, pARL_PVX_101560^{HA}-iE, pARL_PVX_113230^{HA}-iE) oder nur eine sehr schwache Bindung gesehen (3D7-iE: $0,2 \pm 0,6$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_000020^{HA}-iE: $0,1 \pm 0,2$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_050690^{HA}-iE: $0,3 \pm 0,6$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_060690^{HA}-iE: $0,1 \pm 0,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_068690^{HA}-iE: $1,8 \pm 2,4$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_081850^{HA}-iE: $0,2 \pm 0,5$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_093715^{HA}-iE: $0,1 \pm 0,2$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_107235^{HA}-iE: $0,3 \pm 0,5$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_115475^{HA}-iE: $0,2 \pm 0,4$ iRBCs/100 CHO-Zellen).

Ähnlich verhält es sich mit dem Rezeptor VCAM-1; bei diesem wurde keine Bindung bei folgenden Zelllinien detektiert: pARL_PVX_000020^{HA}-iE, pARL_PVX_077695^{HA}-iE, pARL_PVX_081850^{HA}-iE, pARL_PVX_096925^{HA}-iE und pARL_PVX_097525^{HA}-iE. Eine schwache Bindung wurde für 3D7-iE und folgende acht Zelllinien beobachtet (3D7-iE: $0,2 \pm 0,4$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_050690^{HA}-iE: $0,1 \pm 0,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_060690^{HA}-iE: $0,2 \pm 0,4$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_068690^{HA}-iE: $0,2 \pm 0,4$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_093715^{HA}-iE: $0,1 \pm 0,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_101560^{HA}-iE: $0,1 \pm 0,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_107235^{HA}-iE: $0,2 \pm 0,2$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_113230^{HA}-iE: $0,3 \pm 0,7$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_115475^{HA}-iE: $0,2 \pm 0,7$ iRBCs/100 CHO-Zellen).

Die wenigsten Bindungen konnten an CHO-P-Selektin beobachtet werden, bei diesem Rezeptor konnten bei neun Zelllinien keine gebundenen iE beobachtet werden (pARL_PVX_000020^{HA}-iE, pARL_PVX_050690^{HA}-iE, pARL_PVX_077695^{HA}-iE, pARL_PVX_081850^{HA}-iE, pARL_PVX_097525^{HA}-iE, pARL_PVX_101560^{HA}-iE, pARL_PVX_107235^{HA}-iE, pARL_PVX_113230^{HA}-iE, pARL_PVX_115475^{HA}-iE) und bei den vier anderen Zelllinien und 3D7-iE nur eine schwache Bindung der iE (3D7-iE: $0,1 \pm 0,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_060690^{HA}-iE: $0,2 \pm 0,4$ iRBCs/100 CHO-Zellen;

pARL_PVX_068690^{HA}-iE: $0,1 \pm 0,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_093715^{HA}-iE: $0,1 \pm 0,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen; pARL_PVX_096925^{HA}-iE: $0,6 \pm 1,3$ iRBCs/100 CHO-Zellen).

3.6.2 Bindungsversuch unter Flussbedingungen

Neben den Bindungsversuchen unter statischen Bedingungen wurde auch die Bindung unter Flussbedingungen getestet. Dabei wurde das laminare Flusssystem der Firma ibidi GmbH verwendet. Es wurde die Bindung von iE an CHO-CD36-Zellen getestet. Die verwendeten iE waren im Trophozoitenstadium (ca. 28 h nach Invasion). Getestet wurden 3D7-iE (Kontrolle), sowie pARL_PVX_060690^{HA}-iE, pARL_PVX_068690^{HA}-iE, pARL_PVX_093715^{HA}-iE und pARL_PVX_096925^{HA}-iE. Die Bindung der iE an CHO-CD36 wurde bei folgenden Scherkräften getestet: 6, 4, 3, 2, und 1,5 dyn/cm² für jeweils 10 min und 0,9 dyn/cm² für 30 min. Die Auswertung erfolgte im Anschluss mit Hilfe des Programms ImageJ.

Es wurde eine Bindung von 3D7-iE an CHO-CD36 detektiert. Im ersten Versuch wurden fünf iE detektiert, welche alle bei 0,9 dyn/cm² banden. Bei einer Wiederholung des Versuchs wurden 18 bindende iE detektiert, von denen Bereits vier bei 1,5 dyn/cm² eine Bindung zeigten, die restlichen iE wieder bei 0,9 dyn/cm². Bei den iE der transgenen Zelllinien konnte unter den getesteten Bedingungen keine Bindung detektiert werden.

3.7 Homologe Sequenzbereiche der 13 VIR-Proteine zu annotierten Proteinen

Um einen Hinweis auf eine mögliche Funktion der VIR-Proteine zu erhalten, wurde eine sog. Protein-Blast-Suche durchgeführt (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Als Algorithmus wurde blastp verwendet und der Organismus *Plasmodium vivax* (taxid:5855) ausgeschlossen. Des Weiteren wurden Übereinstimmungen mit einem *E-value* >0,1 von der Analyse ausgeschlossen.

Bei allen 13 untersuchten VIR-Proteinen wurden ähnliche Proteine in anderen *Plasmodium* spp. gefunden. Überwiegend waren dies Proteine, welcher der PIR-Superfamilie zugeordnet sind, jedoch ohne weitere Informationen über deren Aufgabe. Zusätzlich wurde für alle VIR-Protein außer PVX_050690 eine Übereinstimmung mit einem Oberflächenprotein aus *P. gonderi* gefunden werden. Die Suche wurde wiederholt, jedoch wurden ausgewählt,

dass die VIR-Proteine nur mit Proteinen aus *P. falciparum* verglichen werden sollten. Dabei wurden keine Übereinstimmungen entdeckt.

Bei einer dritten Suche wurde *Plasmodium* spp. (taxid:5820) ausgeschlossen. Dabei konnten für PVX_000020, PVX_060690, PVX_068690, PVX_081850, PVX_093715, und PVX_096925 keine Übereinstimmungen gefunden. Für PVX_101560 konnten mehrere Übereinstimmungen gefunden werden, welche unterschiedliche Funktionen haben. In Tabelle 9 sind die VIR-Proteine aufgeführt, bei denen eindeutige Übereinstimmungen gefunden wurden.

Tabelle 9: Übereinstimmung zwischen den VIR-Proteinen und Proteinen aus anderen Organismen. blastp-Suche, Stand: 20.02.2020, ausgeschlossen wurden *Plasmodium* spp., sowie Übereinstimmung mit einem *E-value* >0,1. Alle Übereinstimmungen sind bakteriellen Ursprungs.

VIR-Protein	Übereinstimmung
PVX_050690	DEAD/DEAH-Box-Helikase
PVX_077695	Adhäsın
PVX_097525	Kollagen α -3(VI)-Isoform, Adhäsın
PVX_107235	Kollagen α -3(VI)-Isoform
PVX_113230	PIR-Protein, uncharakterisiertes Protein
PVX_115475	PIR-Protein, uncharakterisiertes Protein

4 Diskussion

In den letzten Jahren wurden vermehrt Hinweise gefunden, dass *Plasmodium vivax* infizierten Retikulozyten (iR) zytoadhären können. Ein Indiz für die Zytoadhäsion war, dass im Vergleich weniger Parasiten im Schizontenstadium im Blut sichtbar als die anderen beiden Entwicklungsstadien. Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass *P. vivax* iE, isoliert aus Patienten, an verschiedene Endothelzellen und ausgewählten Rezeptoren adhären können (Carvalho et al. 2010, Chotivanich et al. 2012, Lopes et al. 2014, Barber et al. 2015). Postuliert wurde, dass Mitglieder der VIR-Proteinfamilie an der Zytoadhäsion beteiligt sind (del Portillo et al. 2001). Von Bernabeu und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die Untersuchung von einzelnen VIR-Proteinen mit Hilfe von transgenen *P. falciparum*-Zelllinien möglich ist und dass diese eine Bindung an den Endothelrezeptor vermitteln (Bernabeu et al. 2012).

Das Ziel dieser Arbeit war es, auf Grundlage der von Bernabeu und Kollegen verwendeten Methoden, 13 VIR-Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation innerhalb des infizierten Erythrozyten, sowie deren Bindung an vier ausgewählte Endothelzellrezeptoren (CD36, ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin) zu untersuchen.

4.1 Vergleich der Lokalisation der VIR-Proteine mit zwei verschiedenen C-terminalen Erkennungssequenzen

Um die VIR-Proteine detektieren zu können, wurde an deren C-Terminus ein GFP, bzw. ein 3x HA-Tag angefügt. Dafür wurde das kodierende Gen, bzw. die Sequenz an die Sequenz des jeweiligen *vir*-Genes fusioniert und so die VIR-Proteine als Fusionsproteine synthetisiert.

Zuerst wurde versucht, die Detektion der VIR-Proteine mit Hilfe von GFP durchzuführen. Der Grund für die Auswahl von GFP war, dass dadurch die Detektion eines Proteins in der lebenden Zelle möglich ist, ohne vorher einen Immunfluoreszenzassay durchführen zu müssen (Bernabeu et al. 2012, Jonscher et al. 2019, Mesén-Ramírez et al. 2019, Birnbaum et al. 2020). Jedoch wurde das GFP-Signal in allen untersuchten iE, unabhängig vom Entwicklungsstadium, nur im Parasiten detektiert. Erwartet wurde das Signal im Zytosol des iE, da alle ausgewählten VIR-Proteine eine putative Transmembrandomäne besitzen und sowie einige der VIR-Proteine noch weitere Exportsignale aufweisen. Daraufhin wurde eine andere Erkennungssequenz verwendet, welche ebenfalls schon in der Literatur beschrieben

ist, das 3-fache Hämagglutinin (3xHA-Tag) (Bernabeu et al. 2012, Marapana et al. 2018, Mesén-Ramírez et al. 2019). Deshalb wurde an die *vir*-Gene die Sequenz des 3xHA-Tags fusioniert und HA-Fusionsproteine synthetisiert. Bei diesen VIR-Fusionsproteinen konnte deren Signal im Zytosol des iE nachgewiesen werden. Der Frage, wieso die VIR-GFP-Fusionsproteine im Gegensatz zu den VIR-HA-Fusionsproteinen nicht exportiert wurden, wurde nicht weiter nachgegangen. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen des GFP-Signals im Zytosol könnte sein, dass das GFP von selbst im Nukleus der zu untersuchenden Zellen translokalisiert (Seibel et al. 2007). Eine weitere Erklärung könnte eine fehlerhafte Faltung des GFP-Fusionsproteins sein, wodurch der Transport in das Zytosol behindert wird (Jackson et al. 2006). Eine dritte Möglichkeit wäre die Abspaltung des GFP vom Fusionsprotein innerhalb des Parasiten, so dass nur das VIR-Protein exportiert wird. Da das GFP kein eigenes Exportsignal hat, verbleibt es somit im Parasiten.

4.2 Export der 13 untersuchten VIR-Proteine

Sowohl in Vorversuchen als auch Bernabeu und Kollegen konnten zeigen, dass der Export der VIR-Proteine in transgenen *P. falciparum*-Zelllinien erfolgreich ist (Bernabeu et al. 2012, Lubiana 2017). In dieser Arbeit konnten 12 der 13 untersuchten VIR-Proteine sowohl im Zytosol als auch im Parasiten detektiert werden. Nur das Fusionsprotein PVX_050690 war ausschließlich im Parasiten nachweisbar. Dies war für dieses Protein auch erwartet worden, da es keine Transmembrandomäne oder ein anderes Exportsignal aufweist. Bei den anderen 12 exportierten VIR-Proteinen wurden bei der *in silico*-Analyse neben einer putativen Transmembrandomäne noch weitere putative Exportsignale vorhergesagt. Diese waren ein Signalpeptid (PVX_000020), ein PEXEL Motiv (PVX_096925), ein PEXEL-ähnliches Motiv (PVX_097525, PVX_101560) oder ein reifer N-Terminus (PVX_081850, PVX_101560, PVX_115475). Bei diesen Proteinen ist es möglich, dass sie in *P. falciparum* auf ähnliche Weise wie die PNEPs transportiert werden, insbesondere, da sie mit der Transmembrandomäne die klassischen Eigenschaften dafür aufweisen (Haase et al. 2009, Grüning et al. 2012). Für PIR-Proteine, die ebenfalls nur eine Transmembrane haben, konnte ebenfalls ein Export in das Zytosol der iE nachgewiesen werden, beispielsweise KIR aus *P. knowlesi* oder CIR aus *P. chabaudi* (Cunningham et al. 2010).

Zwischen den beiden Plasmodien-Arten *P. falciparum* und *P. vivax* gibt es Unterschiede in der Nukleotidzusammensetzung der DNA. Während der A/T-Gehalt bei *P. falciparum* 80,6

% beträgt, liegt dieser bei *P. vivax* nur bei 57,3 %). Es finden sich aber auch Unterschiede in der Zellorganisation. So befinden sich bei *P. falciparum* Maurer'sche Spalten im Zytosol des iE, während *P. vivax* Schüffner'sche Tüpfelung aufweist (Aikawa et al. 1975, Lanzer et al. 2006, Carlton et al. 2008). Aus diesen Gründen bestand die Möglichkeit, dass die Fusionsproteine nicht von *P. falciparum* in das Zytosol des iE exportiert werden könnten. Daher wurde vor der Generierung der Transfektanten, der A/T-Gehalt der *vir*-Gene dem A/T-Gehalt von *P. falciparum* Genen angepasst. Wie vorher erwähnt, wurden 12 VIR-Proteine erfolgreich exportiert.

Dieses deutet darauf hin, dass es einen vergleichbaren Exportmechanismen zwischen *P. falciparum* und *P. vivax* geben muss. Beim Export der Proteine aus dem Parasiten in die Wirtszelle müssen diese auch die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) durchqueren. Der Transport erfolgt dabei hauptsächlich über den Proteinkomplex PTEX (*Plasmodium translocon of exported proteins*). Dieser besteht aus fünf verschiedenen Proteinen, von denen drei essenziell sind (HSP101 (*AAA+ ATPase heat shock protein 101*), EXP2 (*exported protein 2*), PTEX150). Diese bilden den Kanal durch die PVM. Der Transport ist ATP-abhängig und kann nur im entfalteten Zustand der zu exportierenden Proteine passieren (Elsworth et al. 2014, de Koning-Ward et al. 2016). Auch im Genom von *P. vivax* und anderen *Plasmodium* spp. wurden die Gene von *hsp101*, *exp2* und *ptex150* gefunden (Bozdech et al. 2008, de Koning-Ward et al. 2009, Goldberg and Cowman 2010, Roobsoong et al. 2011). Somit basiert der Transport durch die PVM bei den verschiedenen Plasmodien-Arten auf einem vergleichbaren Mechanismus (Goldberg and Cowman 2010). Dennoch konnte im Trophozoitenstadium eine Akkumulation der VIR-Proteine im Parasiten beobachtet werden. Im Schizontenstadium dagegen wurde die Lokalisation im Parasiten seltener festgestellt. Die Korrelation zwischen der Proteinlokalisierung und dem Entwicklungsstadium des Parasiten wurde auch schon in einer anderen Publikation beschrieben. In dieser wurden ausgewählte CIR-Proteine von *P. chabaudi* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Lokalisation der Proteine in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums veränderte. Wurden alle detektierten Proteine im Ring- und frühen Trophozoitenstadium noch in der parasitophoren Vakuole nachgewiesen, so wurden im Schizontenstadium alle CIR-Proteine entweder mit den Merozoiten oder mit der Membran des iE kolokalisiert (Yam et al. 2016). Somit ist es wahrscheinlich, dass der Export der VIR-Proteine vom Entwicklungsstadium anhängig ist.

4.3 Lokalisation und Zytoadhäsion von PVX_050690

Das VIR-Protein PVX_050690 ist in dieser Arbeit das einzige der untersuchten VIR-Proteine, welches weder eine putative Transmembrandomäne noch ein anderes Exportsignal aufweist. Bei der Immunfluoreszenzanalyse wurde in beiden untersuchten Stadien ausschließlich eine Lokalisation innerhalb des Parasiten detektiert. Eine Bestimmung der Oberflächenlokalisierung mittels Western Blot-Analyse war aus verschiedenen Gründen nicht erfolgreich. Bei den Bindungsstudien wurde eine Bindung an CHO-CD36 festgestellt, welche sich signifikant von der Stammkultur 3D7 unterschied. An den anderen drei Rezeptoren CHO-ICAM-1, CHO-VCAM-1 und CHO-P-Selektin konnte keine Bindung nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse entsprechen den Erwartungen einer Lokalisation innerhalb des Parasiten, da bei einer vorherigen *in silico*-Analyse weder Transmembrandomänen noch Exportsignale identifiziert wurden (Abbildung 37). Bei den Bindungsversuchen wurde jedoch erwartet, dass PVX_050690 einen ähnlichen Bindungsphänotyp wie die Stammkultur 3D7 zeigt, welche hauptsächlich an CD36 bindet. Da aber keine Oberflächenlokalisierung von PVX_050690 vorliegt, ist nicht zu erklären, warum die pARL_PVX_050690^{HA}-iE signifikant mehr an CD36 binden als 3D7-iE. Es kann spekuliert werden, dass PVX_050690 den Transport von PfEMP1 an die Erythrozytenoberfläche positiv reguliert. Liegt mehr PfEMP1 vor, führt das zu einer vermehrten Zytoadhäsion (Lee et al. 2019, Jensen et al. 2020). Generell wird angenommen, dass die VIR-Proteine neben der Adhäsion, auch an verschiedenen Signalwegen, an der Proteinprozessierung und an Transportprozessen beteiligt sind (Cunningham et al. 2010).

Eine Möglichkeit, um weitere Informationen über die Funktion der VIR-Proteine zu erhalten, ist der Vergleich der VIR-Proteine oder deren Domänen mit Proteinen/Domänen bekannter Funktion. Eine solche Analyse wurde von Lopez und Kollegen durchgeführt. Dabei wurde ein Teil der VIR-Proteine mit der Onlinedatenbank Pfam verglichen. In dieser Datenbank sind Proteindomänen vieler bekannter Proteine enthalten und eine Analyse kann einen Hinweis über die Aufgabe des Proteins geben. Für PVX_050690 war die größte Übereinstimmung mit einer Proteindomäne, welche an der Transkription und Prozessierung von mRNA beteiligt ist (Lopez et al. 2013). Ein ähnlicher Hinweis konnte auch bei einer *blastp*-Suche gefunden werden. Dort wurde eine Übereinstimmung mit einer DEAD/DEAH-Box-Helikase gefunden. Dieses Protein ist an der Prozessierung der mRNA, beispielsweise der

Translation beteiligt (Lüking et al. 1998, Zhang et al. 2015). Diese Aktivität würde mit der Lokalisation des VIR-Proteins im Zytosol des Parasiten übereinstimmen, da mRNA nicht nur im Nukleus vorkommt, sondern auch mit anderen subzellularen Kompartimenten interagiert (Martin and Ephrussi 2009, Tuteja and Mehta 2010).

Um die genaue Funktion des VIR-Proteins PVX_050690 zu ermitteln, sind jedoch weitere Studien notwendig, im Idealfall direkt mit *P. vivax*.

4.4 Lokalisation der 12 exportieren VIR-Proteine in der Immunfluoreszenzanalyse

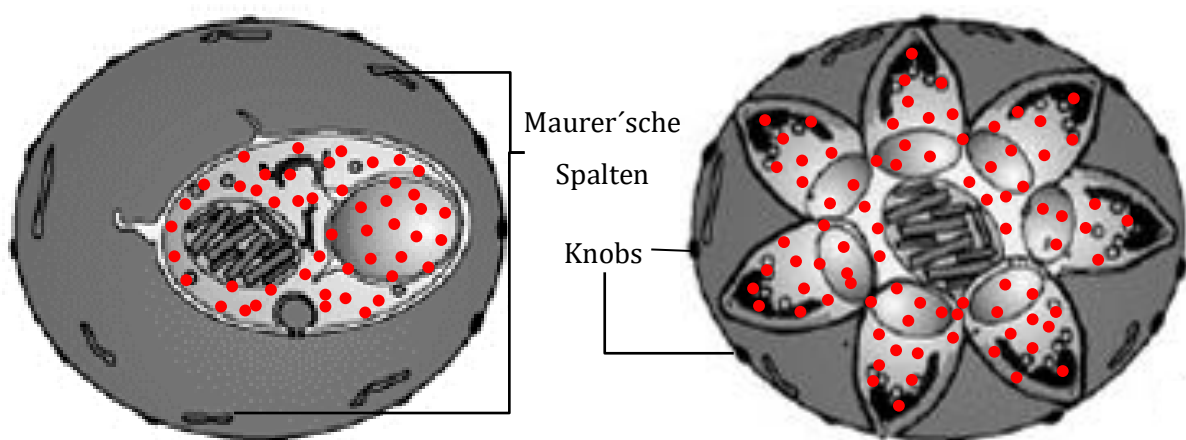


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Lokalisation des Fusionsproteins PVX_050690 im iE. Linke Teilabbildung: Trophozoitenstadium; Rechte Teilabbildung: Schizontenstadium; Rote Punkte: VIR-Protein; verändert nach (Tilley et al. 2011).

Um die Lokalisation der untersuchten VIR-Proteine zu ermitteln, wurde von allen mit den jeweiligen Transfektanten iE eine Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Wie bereits in Kapitel 4.2 diskutiert, wurden die 12 Fusionsproteine, welche mindestens eine Transmembrandomäne haben, exportiert. Neben dem Export wurde bei der Immunfluoreszenzanalyse auch die Lokalisation des Signals der Fusionsproteins ermittelt. Dafür wurden iE verwendet, welche sich sowohl im Trophozoiten- als auch im Schizontenstadium befanden. Dabei wurde bei den 12 untersuchten VIR-Proteinen ein punktiertes Muster, verteilt über den gesamten iE gesehen. Der Export der VIR-Proteine bei Parasiten im Trophozoitenstadium war noch nicht abgeschlossen, da das Signal des α -HA-Antikörpers teilweise noch im Parasiten nachgewiesen wurde. Bei Parasiten im Schizontenstadium war der Export hingegen schon fortgeschrittener, da hier das Signal der

VIR-Fusionsproteine deutlich seltener im Parasiten zu sehen war (siehe Kapitel 3.4). Eine Übersicht über die Lokalisation der VIR-Proteine ist schematisch in Abbildung 38 gezeigt.

Mit Spektrin, einem Protein aus der Erythrozytenmembran, konnte bei Parasiten im Trophozoitenstadium nur bei PVX_000020 PVX_068690 eine Kolokalisation festgestellt werden (< 7 % der untersuchten iE). Waren die Parasiten im Schizontenstadium so wurden bei 0-30 % der untersuchten iE eine Kolokalisation nachgewiesen. Ein Grund dafür könnte sein, dass die iE noch nicht das Entwicklungsstadium erreicht hatten, bei dem der Transport der VIR-Proteine an die Oberfläche erfolgen soll. Beobachtet wurde so ein zeitabhängiger Transport bereits bei PIR-Proteinen aus anderen Plasmodien-Arten (Kriek et al. 2003, Yam et al. 2016). Es konnte daher keine eindeutige Oberflächenlokalisierung für die untersuchten VIR-Proteine nachgewiesen werden.

Das Protein ETRAMP5 ist Bestandteil der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM). Eine Kolokalisation mit den Fusionsproteinen wurde hauptsächlich im Trophozoitenstadium nachgewiesen. Im Schizontenstadium wurde das Signal seltener im Parasiten detektiert. Diese Verschiebung des Signals in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium konnte auch bei PIR-Proteinen aus anderen *Plasmodium*-Arten beobachtet werden (Kriek et al. 2003, Yam et al. 2016). Dies könnte auch bei den untersuchten Fusionsproteinen der Fall sein. Somit ist es unwahrscheinlich, dass der Zielort dieser VIR-Proteine innerhalb des Parasiten lokalisiert ist. Insbesondere da sich das Lokalisationsmuster deutlich von PVX_050690 unterscheidet. Dort konnte das Signal des Fusionsproteins nur innerhalb des Parasiten nachgewiesen werden.

Für alle Fusionsproteine konnte eine Kolokalisation mit dem Maurer'schen Spaltenprotein SBP1 nachgewiesen werden. Dabei konnte es auch hier ein Unterschied zwischen den beiden Entwicklungsstadien festgestellt werden. Im Schizontenstadium war die Kolokalisationsrate höher als im Trophozoitenstadium. Dies deutet darauf hin, dass die Maurer'schen Spalten der Zielort der Fusionsproteine ist. Für *P. falciparum* sind die Maurer'schen Spalten eine der wichtigsten Zellorganelle innerhalb des Zytoplasmas der Wirtszelle und die Hauptfunktionen sind das Sortieren und der Transport von Proteinen (Mundwiler-Pachlatko and Beck 2013). Bisher wurden erst wenige *P. falciparum*-Proteine beschrieben, deren Transport nicht über die Maurer'schen Spalten erfolgt oder die nicht mit diesen interagieren. Beispiele hierfür sind HSP40 (Hitzeschockprotein 40) oder REX3 (engl. *ring exported protein 3*) (Spielmann et al. 2006, Külzer et al. 2010). Eine Proteinfamilie, deren Transport über die Maurer'schen Spalten sehr gut erforscht ist, sind die PfEMP1. Wie in

Kapitel 3.6.1 beschrieben, binden diese an Endothelzellrezeptoren und vermitteln dadurch die Zytoadhäsion (Mundwiler-Pachlatko and Beck 2013). Dass die Maurer'schen Spalten für den Transport dieser Proteine essenziell sind konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Dabei wurde die Expression der Gene von *sbp1*, *rex1* und *mahrp1* gestört, wodurch es zwar zu einem Transport der PfEMP1 in die Maurer'schen Spalten kam, der Weitertransport an die Oberfläche des Erythrozyten aber nicht stattfand (Cooke et al. 2006, Hanssen et al. 2008, Spycher et al. 2008). Auch für die untersuchten VIR-Proteine konnte kein Transport über die Maurer'schen Spalten hinaus detektiert werden. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Die erste Erklärung wäre, dass die Maurer'schen Spalten der Zielort der VIR-Proteine sind und sie dort ihre noch unbekannt Funktion ausüben. Mögliche Funktionen könnten eine Signalgebung oder die Beteiligung am Weitertransport von anderen Proteinen sein (Cunningham et al. 2010). Dies würde z.T. auch mit der postulierten Funktion der Schüffner'schen Tüpfelungen übereinstimmen. Von diesen wird ebenfalls angenommen, dass sie am Proteintransport beteiligt sind (Aikawa et al. 1975). Die andere Möglichkeit ist, dass die Maurer'schen Spalten nicht der Zielort sind, *P. falciparum* aber auf Grund der unterschiedlichen Herkunft der VIR-Proteine die Signale für den Weitertransport von diesen nicht erkennt. Dadurch kommt es zu einer Fehllokalisation in den Maurer'schen Spalten und die eigentliche Funktion der VIR-Proteine kann nicht erforscht werden. Um die jeweiligen Hypothesen zu prüfen, sind jedoch weitere Forschungen notwendig, insbesondere direkt mit *P. vivax*.

Eine Beobachtung, die bei der Kolo-kalisation zwischen SBP1 und dem jeweiligen untersuchten VIR-Protein gemacht wurde, ist, dass ein kleiner Teil der VIR-Proteine nicht mit SBP1 kolo-kalisiert. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass diese VIR-Proteine in einem Transportkomplex gebunden sind. Ein solch möglicher Transportkomplex sind beispielsweise die sog. J-Dots. Als J-Dot wird ein Chaperon bezeichnet, welches aus den beiden Hitzeschockproteinen HSP40 und HSP70 besteht. Von diesen konnte gezeigt werden, dass sie mit anderen Proteinen, z.B. PfEMP1 oder MAHRP1 interagieren und wahrscheinlich an deren Transport durch das Zytosol der Wirtszelle beteiligt sind. Jedoch konnte ausgeschlossen werden, dass die J-Dots selbst Bestandteil der Maurer'schen Spalten sind, da bei Immunfluoreszenzanalysen die Signale von SBP1 und HSP40, bzw. HSP70 nicht kolo-kalisiert (Külzer et al. 2010, Acharya et al. 2012, Külzer et al. 2012, Petersen et al. 2016).

In Abbildung 38A und B ist die Lokalisation der VIR-Proteine sowohl in den Maurer'schen Spalten als auch gebunden an J-Dots schematisch dargestellt.

Eine weitere partielle Kolokalisation konnte zwischen den 12 VIR-Proteinen und der intrazellulären ATS-Domäne der *PfEMP1*-Moleküle detektiert werden. Diese wurde im Vergleich zu der Kolokalisation mit SBP1 jedoch seltener beobachtet. Da die *PfEMP1*-Proteine nachweislich an der Oberfläche lokalisieren, wurde erwartet, dass das ATS-Signal ebenfalls nahe der Oberfläche des iE detektiert wird (Baruch et al. 1995). Dies wurde jedoch nicht gesehen, sondern ebenfalls ein punktiertes Muster wie bei der Kolokalisation mit SBP1. Bei einem Test konnte eine partielle Kolokalisation zwischen den Signalen der ATS-Domäne der *PfEMP1*-Moleküle und SBP1 nachgewiesen werden (Kapitel 3.3). Ein Signal des α -ATS-Antikörpers an der Oberfläche von iE konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch ist bekannt, dass der käuflich zu erwerbende Antikörper, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, keine *PfEMP1*-Proteine an der Oberfläche erkennt. Dieses Phänomen ist bekannt, konnte bisher aber noch von keiner Arbeitsgruppe, die diesen Antikörper verwendet hat, aufgeklärt werden.

Auf Grund der Unterschiede zwischen *P. falciparum* und *P. vivax* ist eine endgültige Aussage über die korrekte Lokalisation der VIR-Proteine nicht möglich. Daher wäre es dringend notwendig, Untersuchungen direkt mit *P. vivax* durchzuführen. Jedoch konnte bisher kein kontinuierliches Zellkultursystem für die Kultivierung von *P. vivax* etabliert werden. Hierfür gibt es zwei verschiedene Gründe: die Zugabe der „richtigen“ Retikulozyten und die Zusammensetzung des Nährmediums (Thomson-Luque et al. 2019). Die als Retikulozyten bezeichneten roten Blutkörperchen bilden eine heterogene Zellpopulation, welche sich u.a. in ihrem Alter unterscheiden (Malleret et al. 2013). Dabei deuten Forschungen darauf hin, dass *P. vivax* sehr jungen Retikulozyten für die Invasion bevorzugt. Somit ist es notwendig, dass für eine erfolgreiche Kultivierung der Parasiten die richtige Subpopulation von Retikulozyten verwendet wird. Auch ist die Zusammensetzung des Kulturmediums, inklusive pH-Wert und Osmolarität von entscheidender Bedeutung, da sich sowohl die Parasiten als auch die Retikulozyten mit der Zeit weiterentwickeln (Thomson-Luque et al. 2019). Erst wenn diese Probleme gelöst werden können, ohne dass weitere, bisher nicht vorhersehbare Probleme auftauchen, kann die Forschung an *P. vivax* intensiviert werden. Denn erst dann ist die Möglichkeit gegeben, die intrazellulären Abläufe und die Aufgaben der einzelnen Zellorganellen direkt in *P. vivax* so zu verstehen, wie es bisher nur bei *P. falciparum* möglich ist.

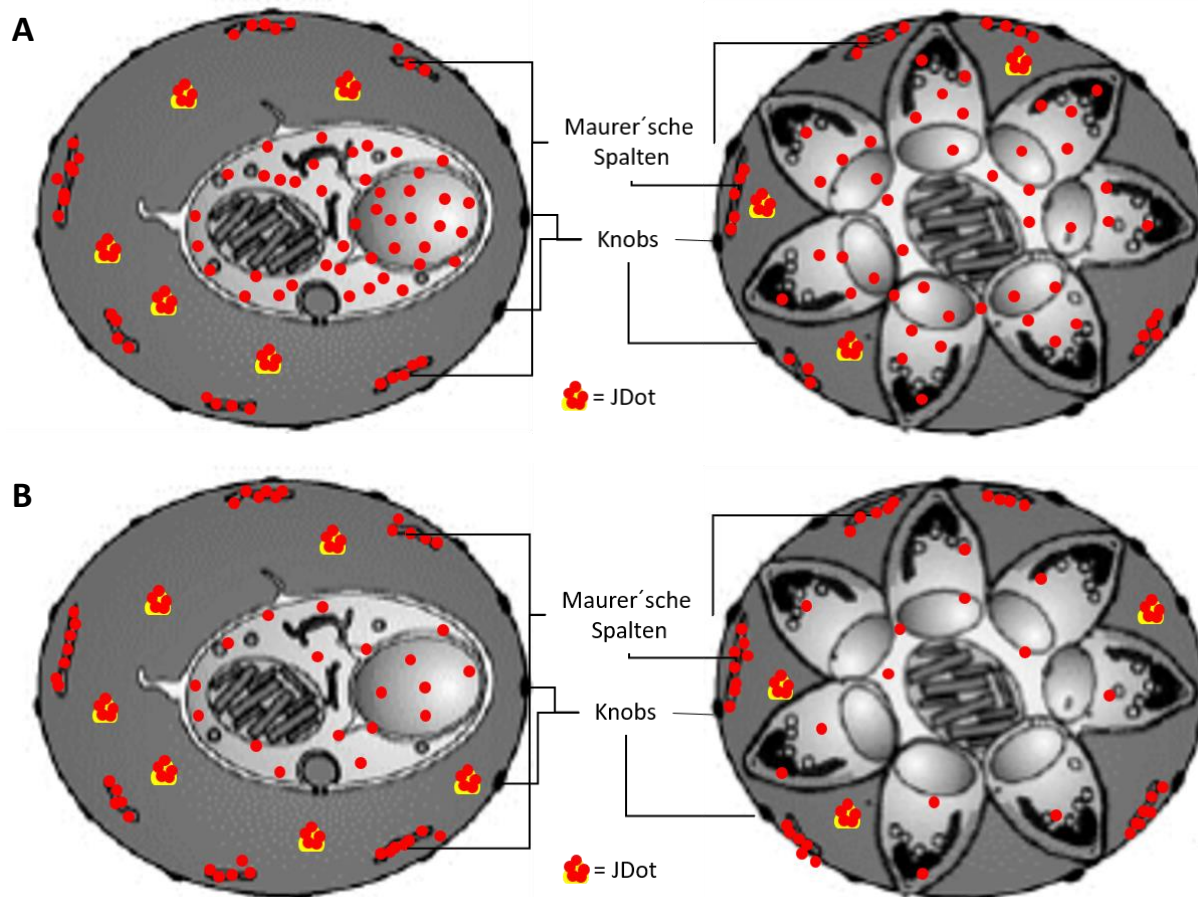


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Lokalisation der VIR-Proteine im iE. In der Abbildung ist die putative Lokalisation der VIR-Proteine auf Grundlage der IFA schematisch dargestellt. **A:** PVX_000020, PVX_077695, PVX_081850, PVX_097525 und PVX_115475; **B:** PVX_060690, PVX_068690, PVX_093715, PVX_096925, PVX_101560, PVX107235 und PVX_113230. Linke Teilabbildung: Trophozitenstadium; Rechte Teilabbildung: Schizontenstadium; Rote Punkte: VIR-Protein; verändert nach (Tilley et al. 2011).

4.5 Bindung der 12 exportierten VIR-Proteine an die Endothelzellrezeptoren CD36, ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin

Die Fähigkeit zu zytoadhären ist für das Überleben von *P. falciparum* im menschlichen Wirt von entscheidender Bedeutung (Smith et al. 2013, Lee et al. 2019, Jensen et al. 2020). Für *P. vivax* wurden erst in den letzten Jahren Hinweise gefunden, dass dieser Parasit ebenfalls zytoadhären kann (Carvalho et al. 2010, Bernabeu et al. 2012, Chotivanich et al. 2012, Lopes et al. 2014, Barber et al. 2015). Postuliert wird, dass die VIR-Proteinfamilie an der Adhäsion beteiligt ist (Bernabeu et al. 2012).

Von den 12 exportierten Proteinen wurde eine mögliche Oberflächenlokalisierung mittels enzymatischem Abbau und anschließender Western Blot-Analyse untersucht. Dabei konnte nur für ein das Fusionsprotein PVX_096925 eine putative Oberflächenlokalisierung

detektiert werden. Diese zeigte sich jedoch nicht in der Immunfluoreszenzanalyse. Des Weiteren wurde untersucht, ob und wie viele iE der transgenen Zelllinien an die vier Endothelzellrezeptoren CD36, ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin unter statischen Bedingungen binden. Dabei konnten eine sehr schwache, aber signifikante Bindung von pARL_PVX_096925^{HA}-iE an ICAM-1 nachgewiesen werden, sowie an CD36 von vier weiteren Transfektanten. Die Bindung mit den vier Transfektanten iE an CD36 wurde außerdem in Bindungsversuchen unter Flussbedingungen charakterisiert.

Um Hinweise auf eine mögliche Funktion der untersuchten VIR-Proteine zu erhalten, wurde eine *blastp*-Suche durchgeführt, bei der *Plasmodium* spp. ausgeschlossen. Die Ergebnisse werden am Ende des jeweiligen Unterkapitels diskutiert.

4.5.1 Bindungsverhalten von pARL_PVX_077695^{HA}, pARL_PVX_081850^{HA}, pARL_PVX_097525^{HA} und pARL_PVX_107235^{HA} infizierten Erythrozyten

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der vier transgenen *P. falciparum*-Zelllinien pARL_PVX_077695^{HA}, pARL_PVX_081850^{HA}, pARL_PVX_097525^{HA} und pARL_PVX_107235^{HA} diskutiert. Bei den Bindungsversuchen mit den vier Endothelzellrezeptoren CHO-CD36, CHO-ICAM-1, CHO-VCAM-1 und CHO-P-Selektin konnte keine Bindung festgestellt werden, welche sich signifikant vom Laborstamm 3D7 unterschied. Eine Analyse der Oberflächenlokalisierung war für PVX_077695, PVX_081850 und PVX_107235 aus verschiedenen Gründen nicht möglich. Nur für PVX_097525 war die Analyse erfolgreich, es konnte aber keine Oberflächenlokalisierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen aber die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse. Dort konnte für keines der vier Fusionsproteine eine eindeutige Lokalisation an der Oberfläche des iE gezeigt werden.

Somit kann auf Grundlage der Ergebnisse gesagt werden, dass diese vier untersuchten VIR-Proteine nicht direkt an der Zytoadhäsion beteiligt sind. Einen Hinweis auf die Funktion dieser VIR-Proteine könnten ähnliche Proteinfamilien aus *P. falciparum* geben. Hier sind insbesondere die Proteinfamilien RIFIN und STEVOR zu nennen (Frech and Chen 2013). Die RIFIN-Familie wird in zwei Gruppen unterteilt, A-RIFIN und B-RIFIN. Die A-RIFIN werden in die Maurer'schen Spalten transportiert und von dort an die Oberfläche des Erythrozyten. Im Gegensatz dazu lokalisieren die B-RIFIN überwiegend im Zytosol der Wirtszelle. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die *rif*-Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert

werden. So konnten einige RIFIN-Proteine nur in iE im späten Schizontenstadium, am Apex von Merozoiten und in Gametozyten nachgewiesen werden konnten, jedoch ist nichts über deren Funktion dort bekannt. RIFIN-Proteine sind bei der Sequestrierung (Anlagerung von iE aneinander) von Bedeutung. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass spezifische Antikörper gegen bestimmte RIFIN-Proteine die Rosettierung inhibieren. Jedoch konnte erst ein *rif*-Gen in diesem Zusammenhang identifiziert werden (Petter et al. 2007, Joannin et al. 2008, Bachmann et al. 2012, Mundwiler-Pachlatko and Beck 2013, Wahlgren et al. 2017). Von den STEVOR-Proteinen wird ebenfalls vermutet, dass diese mehrere Aufgaben innerhalb der Wirtszelle ausüben. So konnte gezeigt werden, dass die Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten hergestellt werden und innerhalb der Wirtszelle unterschiedliche Lokalisationen aufweisen, beispielsweise an der Oberfläche des iE, in den Maurer'schen Spalten oder in der apikalen Spitze von Merozoiten. STEVOR-Proteine vermitteln die Bindung an andere rote Blutkörperchen. Zusätzlich sind diese an der Merozoiteninvasion in uninfizierte Erythrozyten beteiligt, da diese durch STEVOR-Antikörper negativ beeinflusst wird (McRobert et al. 2004, Blythe et al. 2008, Khattab and Meri 2011, Niang et al. 2014, Bachmann et al. 2015, Wahlgren et al. 2017). Ebenfalls wurde eine Beteiligung der STEVOR-Proteine an der Versteifung der Erythrozytenmembran nachgewiesen (Sanyal et al. 2012). Auch in Gametozyten konnten einige Proteine aus der STEVOR-Familie lokalisiert werden. Jedoch ist bisher nichts über deren Funktion dort bekannt (Sutherland 2001). Da die *rif*- und *stevor*-Gene ebenso wie die *vir*-Gene zu der *pir*-Multigenfamilie (engl. Plasmodium *interspersed repeats*) gehören, ist es möglich, dass aus der Funktion der RIFIN- und STEVOR-Proteine Hinweise auf eine mögliche Funktion der VIR-Proteine gezogen werden kann (Fernandez-Becerra et al. 2009, Cunningham et al. 2010). Bei einer *blastp*-Suche, nur zwischen den VIR-Proteine und Proteinen von *P. falciparum* wurden keine Übereinstimmungen entdeckt. Jedoch konnten bei einer Analyse durch Merino und Kollegen strukturelle Ähnlichkeiten zwischen der Subfamilie A der VIR-Protein und den STEVOR-Proteinen gefunden werden. Dabei handelt es sich um eine N-terminale Region, welche eine Cystein-reiche putative globuläre Domäne beinhaltet (Merino et al. 2006). Hinweise auf strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den VIR-Proteinen und den RIFIN-Proteinen konnten nicht gefunden werden. Bei all diesen drei Proteinfamilien gibt es keine *mutually exclusive expression* wie es diese bei den PfEMP1-Proteinen gibt (Kaviratne et al. 2002, Petter et al. 2007, Fernandez-Becerra et al. 2009). Eine Funktion, welche für die RIFIN- und STEVOR-Proteine nachgewiesen werden konnte, ist die Beteiligung an der Sequestrierung

und Rosettierung. Daher ist es möglich, dass auch die VIR-Proteine an dieser beteiligt sind, insbesondere da diese bereits für *P. vivax* beschrieben wurde (Marín-Menéndez et al. 2013). Jedoch wird von *P. vivax* angenommen, dass dieser Parasit nicht sequestriert (Carmona-Fonseca et al. 2013, Russell and Cooke 2017).

Wie schon für PVX_050690 konnten auch für PVX_081850 und PVX_107235 Hinweise auf eine mögliche Funktion in der Publikation von Lopez und Kollegen gefunden werden. PVX_077695 und PVX_097525 sind nicht in der Auflistung aufgeführt (Lopez et al. 2013). Jedoch wurde für alle Proteine eine *blastp*-Suche durchgeführt.

Die *blastp*-Suche ergab für PVX_077695 eine hohe Übereinstimmung mit dem Protein Adhäsın bakteriellen Ursprungs. Mit Adhäsın ist es den Bakterien möglich, eine Interaktion mit der entsprechenden Wirtszelle einzugehen, beispielsweise die Anlagerung (Solanki et al. 2018). Somit könnte PVX_077695 an der Invasion der Merozoiten in eine neue Wirtszelle beteiligt sein.

Bei der *blastp*-Suche von PVX_097525 wurde mehrfach eine Übereinstimmung mit Adhäsın und der Kollagen α -3(VI)-Isoform festgestellt. Wie im Absatz zuvor beschrieben ist Adhäsın an der Interaktion mit der Wirtszelle beteiligt (Solanki et al. 2018). Die Kollagen α -3(VI)-Isoform kommt u.a. im Menschen vor und ist dort an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, wie dem Zellwachstum, dem Schutz vor oxidativen Schäden oder es tritt in Interaktion mit einer Vielzahl von extrazellulär Matrixproteinen (Lamandé and Bateman 2018). Auf Grund dieser Vielzahl an möglichen Funktionen ist es jedoch nicht möglich, eine Aussage über die Aufgabe von PVX_097525 innerhalb des Parasiten zu treffen.

Für PVX_081850 wurden u.a. eine Homologie mit dem C-Terminus des Merozoiten-Oberflächenprotein 1 (MSP1; engl. *merozoite surface protein 1*) detektiert, welches in *Plasmodium* spp. vorkommt. MSP1 kommt auf der Oberfläche von Merozoiten vor und hat eine molekulare Masse von 190-220 kDa (Tanabe et al. 1987, Holder et al. 1992). Das Protein ist am initialen Schritt der Invasion in einen Erythrozyten beteiligt, indem es zusammen mit MSP6 und MSP7 den ersten Kontakt zwischen den beiden Zellen herstellt (Kadekoppala and Holder 2010). Dieses Protein wurde auch in *P. vivax* nachgewiesen (Versiani et al. 2013). Daher könnte PVX_081850 auf der Oberfläche von Merozoiten situiert und an der Invasion in einen neuen Erythrozyten beteiligt sein. Es konnte jedoch keine Lokalisation auf den Merozoiten in der Immunfluoreszenzanalyse festgestellt werden.

Für PVX_107235 wurden ebenfalls homologe Domänen gefunden, jedoch sind dies Domänen mit unbekannter Funktion oder so spezifisch, dass es unwahrscheinlich ist, dass PVX_107235 diese Funktion hat. Beispiele für eine solche Funktion sind ein Virulenzfaktor im Bakterium *Yersinia* spp. oder ein Opioid-Wachstumsfaktor, welcher in neuronalen Zellen vorkommt (Lopez et al. 2013). Mit die höchste Ähnlichkeit weist PVX_107235 zu dem Protein BAT2 auf. Dieses ist ein Protein, welches zur MHC Klasse III (engl. *major histocompatibility complex*) gehört (Banerji et al. 1990). Es konnten bei einer Literaturrecherche jedoch keine Hinweise auf die Funktion von BAT2 gefunden werden. Somit kann basierend auf diesen Informationen keine Aussage über die mögliche Funktion von PVX_107235 getroffen werden. Jedoch wurde bei der *blastp*-Suche eine Übereinstimmung mit Kollagen α -3(VI)-Isoform festgestellt. Wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben, kann dieses Protein eine Vielzahl an Funktionen haben, u.a. eine Interaktion mit einer Vielzahl von extrazellulär Matrixproteine (Lamandé and Bateman 2018). Für PVX_107235 bedeutet dies, dass dieses Protein möglicherweise eine strukturgebende Funktion innerhalb des iE hat und mit anderen Proteinen interagiert.

4.5.2 Bindungsverhalten von pARL_PVX_000020^{HA}, pARL_PVX_101560^{HA}, pARL_PVX_113230^{HA} und pARL_PVX_115475^{HA} infizierten Erythrozyten

Bei den Bindungsstudien konnte für keines der vier VIR-Proteine (pARL_PVX_000020^{HA}, pARL_PVX_101560^{HA}, pARL_PVX_113230^{HA} und pARL_PVX_115475^{HA}) eine Zytoadhäsion detektiert werden, welche sich signifikant von der Stammkultur 3D7 unterschied. Die Westen Blot-Analyse von PVX_000020 war aus verschiedenen Gründen nicht erfolgreich. Für PVX_115475 wurden insgesamt vier Proteine mit einer molekularen Masse von 24 kDa bis 50 kDa detektiert. Dabei wies nur eines die kalkulierte molekulare Masse auf, die anderen drei Proteine hatten eine niedrigere molekulare Masse. Für PVX_101560 wurde nur ein Signal bei einer molekularen Masse von ca. 70 kDa detektiert (erwartete Masse: 54,1 kDa). Eine mögliche Erklärung können posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung, Glykosylierung oder Acetylierung sein, da sich dadurch die molekulare Masse ändert (Gorr and Vogel 2015, Xie et al. 2015). Auch in der Publikation von Bernabeu und Kollegen weist in der Western Blot-Analyse ein VIR-Protein eine größere molekulare Masse auf, als errechnet wurde (Bernabeu et al. 2012). Beim dritten VIR-Protein (PVX_113230) wurden mehrere Proteine detektiert, welche eine höhere

oder niedrigere molekulare Masse als die errechneten 47,4 kDa hatten. Dies deutet darauf hin, dass das Protein posttranslational modifiziert wurde (Gorr and Vogel 2015). Eine weitere Erklärung für die verkürzten Proteine könnte sein, dass *P. falciparum* nicht in der Lage ist, die Proteine vollständig zu synthetisieren. Diese Möglichkeit kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Protein über den 3xHA-Tag detektiert werden, welcher an den C-Terminus fusioniert wurde. Für keines der drei untersuchten VIR-Protein konnte ein Unterschied in der Signalintensität zwischen der Kontrolle und der mit Trypsin behandelten Probe detektiert werden. Ein im Vergleich stärkeres Signal der Kontrolle hätte auf eine Oberflächenlokalisation hingedeutet. Daher kann von diesen drei VIR-Proteine eine Oberflächenlokalisation im Trophozoitenstadium ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind kongruent mit den Ergebnissen der Bindungsstudien, wo für die vier VIR-Proteine keine signifikante Bindung an einen der vier Endothelzellrezeptoren detektiert werden konnte. Somit kann auf Grundlage der Ergebnisse ausgeschlossen werden, dass diese vier VIR-Proteine im Trophozoitenstadium an der Adhäsion beteiligt sind. Eventuell sind diese vier VIR-Proteine erst in einem späteren Entwicklungsstadium der iE aktiv. Daher sollten die Versuche mit iE im Schizontenstadium wiederholt werden.

Auch von diesen vier VIR-Proteinen wurde von Lopez und Kollegen eine Analyse hinsichtlich homologer Domänen in anderen Proteinen (Lopez et al. 2013). Bei PVX_000020 wurde eine hohe Übereinstimmung mit dem Baculovirus P47 Protein festgestellt. Dieses wird als ein Bestandteil einer RNA-Polymerase beschrieben, welches an der Aktivierung von späten Promotoren beteiligt ist (Guarino et al. 1998). Somit es ist möglich, dass PVX_000020 an der Synthese von anderen Proteinen beteiligt ist, welche erst spät im Lebenszyklus von *P. vivax* aktiv sind. Dies bedeutet aber auch, dass das Protein überwiegend im Parasiten lokalisiert, da dort die Proteinsynthese stattfindet (Jackson et al. 2011). Nach Analyse der Bilder der Immunfluoreszenzanalyse trifft dies z.T. zu. Jedoch wurde das Protein auch in die Maurer'schen Spalten festgestellt werden, insbesondere in iE im Schizontenstadium. Bei der *blastp*-Suche konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden. Somit kann keine Aussage über eine mögliche Funktion von PVX_000020 getroffen werden.

Für PVX_101560 wurde die größte Homologie zu dem *Eppstein-Barr virus nuclear antigen 3* (EBNA-3) gefunden. Dieses ist an der Manipulation des Immunsystems beteiligt, indem es B-Zellen in eine immortalisierte Zelllinie umwandelt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Proteins zu einer Herunterregulation von u.a. CD21

und CD23 führt (Kashuba et al. 2006). CD21 und CD23 sind an der B-Zell-Aktivierung beteiligt (Bonney et al. 1995, Thorarinsdottir et al. 2015). Dies könnte ein Hinweis sein, dass das VIR-Protein PVX_101560 an der Immunevasion beteiligt ist. Bei einer *blastp*-Suche konnte keine eindeutige Übereinstimmung mit einem Protein aus einem anderen Organismus als *Plasmodium* spp. gefunden werden.

Bei PVX_113230 wurde die größte Homologie mit einer Domäne unbekannter Funktion festgestellt. Diese Domäne wurde in zahlreichen Lipid-Transportproteinen nachgewiesen (Anderson et al. 1998, Thompson and Banaszak 2002). Daher könnte es sein, dass PVX_113230 an Transportprozessen beteiligt ist. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der IFA fällt auf, dass PVX_113230 insbesondere im Schizontenstadium sehr häufig in den Maurer'schen Spalten und an der Oberfläche der iE nachgewiesen wurde. Somit ist es möglich, dass die Funktion dieses Proteins der Transport von Lipiden über die Maurer'schen Spalten zur Erythrozytenmembran ist. Bei der *blastp*-Suche wurde eine Übereinstimmung mit einem uncharakterisierten Protein, sowie einem PIR-Protein aus *Hepatocystis* sp. gefunden. Jedoch ist dieses PIR-Protein mit denen aus *Plasmodium* spp. verwandt (Aunin et al. 2019). Daher können keine Rückschlüsse über eine mögliche Funktion gezogen werden.

Die höchste Homologie von PVX_115475 konnte zu einem Fucose-spezifischen Lektin aus einem Pilz gefunden werden. In einer Vielzahl von Organismen konnte gezeigt werden, dass Fucose an verschiedene Proteine angelagert wird (Fucosylierung) und die Funktion des Proteins beeinflusst. Zwar wurde eine Fucosylierung für *P. falciparum* bereits beschrieben, jedoch konnte bisher nicht geklärt werden, welchen Einfluss diese auf die Aktivität der entsprechenden Proteine hat. Eine andere Möglichkeit ist, dass Fucose in Glykokonjugaten vorkommt. Glykokonjugate bestehen hauptsächlich aus verschiedenen Zuckernukleotiden und sind z.B. an der Adhäsion beteiligt. Bisher konnte Fucose in *P. falciparum* jedoch nicht in einem Glykokonjugat nachgewiesen werden (Sanz et al. 2013, Cova et al. 2015, Holdener and Haltiwanger 2019). Studien über Fucose in anderen *Plasmodium*-Arten konnten nicht gefunden werden. Möglich ist, dass PVX_115475 glykosyliert wird und die Fucose eine aktivierende Funktion hat, wie es bereits in anderen Organismen beschrieben wurde. Dafür sind jedoch weitere Forschungen notwendig. Weitere Hinweise über die Funktion von PVX_113230 konnten bei der *blastp*-Suche nicht gefunden werden, da hier ebenfalls nur Übereinstimmungen mit dem uncharakterisierten Protein, sowie dem PIR-Protein aus *Hepatocystis* sp. gefunden wurden.

Für dieses VIR-Protein wurden bei der die gleichen Übereinstimmungen wie für PVX_113230 gefunden, wodurch keine weitere Aussage über die Funktion des VIR-Proteins gemacht werden kann.

4.5.3 Bindungsverhalten von pARL_PVX_060690^{HA}, pARL_PVX_068690^{HA}, pARL_PVX_093715^{HA} und pARL_PVX_096925^{HA} infizierten Erythrozyten

Die mit den vier *P. falciparum*-Zelllinien pARL_PVX_060690^{HA}, pARL_PVX_068690^{HA}, pARL_PVX_093715^{HA} und pARL_PVX_096925^{HA} iE, zeigten alle eine Bindung an CHO-CD36, welche sich signifikant von der Stammkultur 3D7 unterscheidet. Zusätzlich konnte für PVX_096925 noch eine geringe, aber signifikante Bindung an ICAM-1 detektiert werden. Weitere Bindung auch von den drei anderen Fusionsproteinen an einen der anderen drei Rezeptoren konnten nicht detektiert werden. Die Western Blot-Analyse war für alle transgenen Zelllinien erfolgreich, aber nur für PVX_096925 konnte ein festgestellt werden. Das Protein wurde mittels tryptischen Verdau von der Oberfläche entfernt. Dies führte in der Western Blot-Analyse zu einem schwächeren Signal im Vergleich zu der nicht-trypsinierten Kontrolle. In den IFA-Aufnahmen konnte ein punktiertes Muster detektiert werden, wobei das Signal der Proteine mit dem Signal von SBP1 und z.T. von ATS kolokalisierte.

Bei den Western Blot-Analysen von PVX_060690, PVX_068690 und PVX_093715 konnte kein Unterschied in der Signalintensität zwischen der Kontrolle und der mit Trypsin behandelte Probe detektiert werden. Des Weiteren wurden bei den Proben von PVX_060690 und PVX_068690 mehrere Signale detektiert, aber keines dieser Proteine entspricht der errechneten molekularen Masse. Die detektierten Proteine haben entweder eine größere oder eine kleinere molekulare Masse. Eine Erklärung für die größere molekulare Masse könnte sein, dass die Proteine posttranslational modifiziert wurden. Eine Erklärung für die Signale mit einer geringeren molekularen Masse könnte sein, dass die Proteine bereits proteolytisch verkürzt wurden (Gorr and Vogel 2015). Bei PVX_093715 wurde nur ein Signal detektiert, welches der errechneten molekularen Masse des VIR-Proteins entspricht. Damit kann von PVX_060690, PVX_068690 und PVX_093715 eine Lokalisation auf der Oberfläche von iE im Trophozoitenstadium ausgeschlossen werden. PVX_096925 ist das einzige in dieser Arbeit untersuchte VIR-Protein, bei dem ein Unterschied in der Signalintensität zwischen der Kontrolle und der mit Trypsin behandelte Probe nachgewiesen werden konnte. Damit ist dieses Protein das Einzige mit einer bestätigten Oberflächenlokalisierung.

Die einzige Studie, bei der ebenfalls eine transgene *P. falciparum*-Zelllinie verwendet wurde, um einzelne VIR-Proteine zu untersuchen ist die von Bernabeu und Kollegen. In deren Studie wurden vier verschiedene Rezeptoren getestet, CHO-CD36, CHO-ICAM-1, CHO-VCAM-1 und CHO-E-Selektin. Dabei konnte nur für Erythrozyten, die mit Parasiten, die *pvx-108770* exprimierten, infiziert waren, eine Bindung an alle vier Rezeptoren festgestellt werden. Insgesamt wurden in dieser Studie drei VIR-Proteine untersucht. Jedoch wurde in weitergehenden Experimenten gezeigt, dass nur die Bindung an CHO-ICAM-1 durch spezifische Antikörper inhibiert werden konnte. Bei Bindungsversuchen unter Flussbedingungen wurde ebenfalls nur eine Bindung an CHO-ICAM-1 beobachtet (Bernabeu et al. 2012). Auch bei Bindungsversuchen mit iR aus Patientenproben konnte bisher nur eine Bindung an ICAM-1 nachgewiesen werden, jedoch keine an CD36 (Carvalho et al. 2010). In einer weiteren Studie, in der das Bindungsverhalten von iE, isoliert aus 33 Patientenproben, an CD36 oder ICAM-1 getestet wurde, konnte hingegen keine Bindung an diese beiden Rezeptoren nachgewiesen werden. Allerdings wurde für alle Proben eine Bindung an Chondroitinsulfat A festgestellt (Chotivanich et al. 2012). Somit deuten die bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur darauf hin, dass der Hauptbindungspartner von *P. falciparum*, CD36, für *P. vivax* nicht von großer Bedeutung ist (Carvalho et al. 2010, Bernabeu et al. 2012, Tilly et al. 2015). Bei der quantitativen Analyse der Bindung an CHO-CD36 ist zu sehen, dass die Anzahl der gebundenen iE bei drei der vier transgenen Zelllinien (PVX_060690, PVX_068690 und PVX_096925) geringer ist als in der Literatur beschriebene Werte (Carvalho et al. 2010: ca. 29 ± 6 iE/100 CHO-ICAM-1-Zellen; Bernabeu et al. 2012: ca. 100 ± 30 iE/100 CHO-ICAM-1-Zellen). Nur bei pARL_PVX_093715^{HA}-iE konnten mehr gebundene iE festgestellt werden als bei Carvalho und Kollegen. Jedoch wird hier die Bindung von zwei verschiedenen Rezeptoren verglichen. Für die transgene Zelllinie von PVX_096925 konnte zusätzlich eine geringe Bindung an CHO-ICAM-1 festgestellt werden. Diese beträgt jedoch nur $1,5 \pm 1,2$ iE/100 CHO-ICAM-1-Zellen und ist damit deutlich unter den bisher beschriebenen Werten (Carvalho et al. 2010, Bernabeu et al. 2012). Jedoch sind weitere Versuche notwendig, um die Bindung der vier transgenen Zelllinien zu bestätigen. Ein Versuch, um die Bindung zu verifizieren, ist ein Inhibitions-Bindungsassay. Bei diesem wird einer der beiden Bindungspartner (VIR-Protein oder Endothelzellrezeptor) mit einem spezifischen Antikörper blockiert ist, wodurch keine Bindung von iE mehr festgestellt werden sollten. Erst dadurch ist eindeutig bewiesen, dass die Interaktion zwischen dem VIR-Protein und dem Endothelzellrezeptor für die

Bindung verantwortlich ist. Da eine höhere Aktivität dieser VIR-Proteine bei Parasiten im Schizontenstadium nicht ausgeschlossen werden kann, sollten die Versuche mit diesen wiederholt werden.

Des Weiteren wurde versucht, die Bindung von pARL_PVX_060690^{HA}-iE, pARL_PVX_068690^{HA}-iE, pARL_PVX_093715^{HA}-iE und pARL_PVX_096925^{HA}-iE an CHO-CD36 unter Flussbedingungen zu reproduzieren. Unter den getesteten Scherkräften konnte keine Bindung der vier Fusionsproteine an CHO-CD36 festgestellt werden. Dabei betrug die höchste Scherkraft 6 dyn/cm² und die niedrigste 0,9 dyn/cm². Ein Grund für die Nicht-Bindung könnte eine zu hoch gewählte Scherkraft sein. Mit *P. vivax* iR akkumulieren in den mikrovaskulären Gefäßen des Menschen (Anstey et al. 2009). Dabei können sich die Scherkräfte in diesen kleinen Blutgefäße auf bis zu 0,1 dyn/cm² verringern. In unserem Versuchsansatz konnte jedoch nur eine Minimalscherkraft von 0,9 dyn/cm² erreicht werden. Diese entspricht jedoch dem Blutfluss in postkapillaren Venolen (Montes et al. 2002). Somit ist es möglich, dass die gewählte Scherkraft zu hoch ist und dadurch kein iE binden konnte, bzw. der iE sofort wieder abgerissen wurde. Um auszuschließen, dass die zu hohe Scherkraft eine Bindung verhindert, sollte der Versuch mit einer Scherkraft von 0,1 dyn/cm² wiederholt werden.

Dass der Versuchsaufbau funktioniert, konnte bei einem Versuch mit 3D7-iE an CHO-CD36 nachgewiesen werden. Wie unter statischen Bedingungen auch, konnte ebenfalls eine Bindung von 3D7-iE an CHO-CD36 unter Flussbedingungen nachgewiesen werden. Da diese Stammkultur nicht mit artfremden Genen transfiziert wurde, können nur die *P. falciparum* eigenen Adhäsionsproteine, wie PfEMP1, für die Bindung verantwortlich sein. Für pARL_PVX_060690^{HA}-iE, pARL_PVX_068690^{HA}-iE, pARL_PVX_093715^{HA}-iE und pARL_PVX_096925^{HA}-iE konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Somit können die Ergebnisse aus den Bindungsversuchen unter Flussbedingung ein Hinweis sein, dass die VIR-Proteine in den transgenen Zelllinien für die Adhäsion verantwortlich sind und nicht beispielsweise die PfEMP1. Wenn die PfEMP1 auch in den transgenen Zelllinien die Bindung vermitteln, so hätte auch eine Bindung unter Flussbedingungen nachgewiesen werden müssen, da bei der Stammkultur bindende iE detektiert wurden.

Auch für die Fusionsproteine PVX_060690, PVX_068690, PVX_093715 und PVX_096925 wurde überprüft, ob in der Publikation von Lopez und Kollegen homologe Domänen gefunden wurden. Nur für die beiden VIR-Proteine PVX_068690 und PVX_093715

konnten welche gefunden werden (Lopez et al. 2013). Bei der *blastp*-Suche konnte für kein VIR-Protein eine Übereinstimmung mit einem artfremden Protein gefunden werden.

Für PVX_068690 wurde die höchste Homologie mit einem bakteriellen Protein unbekannter Funktion gefunden. Auch aus den weiteren Einträgen konnten keine Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins gezogen werden, da entweder die Funktion der Domäne noch nicht beschrieben wurde oder dies eine zu spezifische Aufgabe in anderen Organismen ist, beispielsweise die Regulation des osmotischen Drucks in Bakterien oder ein Protein, welches bei der Struktur von Pflanzenzellwänden von Bedeutung ist (Lopez et al. 2013).

Neben der Übereinstimmung mit einer Domäne aus den VIR-Proteinen hat PVX_093715 eine hohe Übereinstimmung mit der C-terminalen Domäne eines TAP-Proteins. Diese Proteine sind am Export von mRNA aus dem Zellkern beteiligt (Grant et al. 2002). Auch für *P. falciparum* wurde der Export von mRNA bereits beschrieben. Jedoch konnte noch nicht geklärt werden, wie der mRNA-Export funktioniert (Tuteja and Mehta 2010). Somit ist es möglich, dass PVX_093715 am Transport beteiligt ist. Jedoch steht diese mögliche Funktion im Widerspruch zu der Annahme, dass dieses VIR-Protein die Adhäsion an den Rezeptor CHO-CD36 vermittelt.

5 Fazit

Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die VIR-Proteine an der Zytoadhäsion von *P. vivax* infizierten Retikulozyten beteiligt sind. Es konnten für insgesamt fünf Transfektanten eine Bindung gezeigt werden, wobei vier VIR-Proteine tatsächlich in das Zytosol der Wirtszelle transportiert wurden. Somit kann vermutet werden, dass diese vier VIR-Proteine direkt an der Rezeptorbindung beteiligt sind. Jedoch sind weitere Versuche, auch im Schizontenstadium nötig, um diese Vermutung zu bestätigen. Hinweise auf eine Funktion der VIR-Proteine, bei denen keine Bindung der iE detektiert wurden, konnten nicht gefunden werden. Hierfür sind ebenfalls weitere Studien notwendig, insbesondere direkt in *P. vivax*.

Obwohl bei fünf Transfektanten eine Bindung der iE nachgewiesen wurde, konnte nur für das VIR-Protein PVX_096925 eine Oberflächenlokalisierung mittels tryptischen Verdau nachgewiesen werden. Für PVX_050690 ist keine Oberflächenlokalisierung erwartet worden, da diese nur intraparasitär lokalisiert. Wieso bei den anderen drei VIR-Proteinen keine Oberflächenlokalisierung nachgewiesen werden konnte, ist unbekannt. Eine Möglichkeit ist, dass der Transport der VIR-Proteine an die Oberfläche erst erfolgt, wenn diese eine Adhäsion vermitteln sollen. Dadurch wären diese intrazellulär lokalisiert und könnten nicht vom Trypsin verdaut werden. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse unterstützt. Bei dieser wurde für kein VIR-Protein eine eindeutige Lokalisation an der Oberfläche beobachtet. Eine andere Erklärung könnte sein, dass der tryptische Verdau aus unbekanntem Gründen nicht effektiv war, wodurch kein Unterschied in der Signalintensität zwischen der Kontrolle und der mit Trypsin behandelten Probe festgestellt werden konnte. Dann hätte jedoch bei den Immunfluoreszenzanalysen eine Oberflächenlokalisierung gesehen werden müssen.

Um die Zytoadhäsion von *P. vivax* näher zu charakterisieren, sind weitere Studien notwendig, beispielsweise mit anderen Rezeptoren. Dafür sollten sowohl die bereits untersuchten VIR-Proteine verwendet werden als auch neue VIR-Proteine, deren Funktion noch unbekannt ist. Interessant ist auch zu wissen, ob sich das Bindungsverhalten von iE im Schizontenstadium von iE im Trophozoitenstadium unterscheidet.

6 Literaturverzeichnis

Abdala-Valencia, H., T. S. Kountz, M. E. Marchese and J. M. Cook-Mills (2018). "VCAM-1 induces signals that stimulate ZO-1 serine phosphorylation and reduces ZO-1 localization at lung endothelial cell junctions." Journal of leukocyte biology **104**(1): 215-228.

Acharya, P., S. Chaubey, M. Grover and U. Tatu (2012). "An exported heat shock protein 40 associates with pathogenesis-related knobs in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes." PloS one **7**(9).

Adams, J. H. and I. Mueller (2017). "The biology of *Plasmodium vivax*." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **7**(9): a025585.

Aikawa, M., L. H. Miller and J. Rabbege (1975). "Caveola--vesicle complexes in the plasmalemma of erythrocytes infected by *Plasmodium vivax* and *P. cynomolgi*. Unique structures related to Schüffner's dots." The American journal of pathology **79**(2): 285.

Al-Mekhlafi, A. M., M. A. Mahdy, A. A. A and M. Y. Fong (2010). "Molecular epidemiology of *Plasmodium* species prevalent in Yemen based on 18 s rRNA." Parasit Vectors **3**: 110.

Anderson, T. A., D. G. Levitt and L. J. Banaszak (1998). "The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein." Structure (London, England : 1993) **6**(7): 895-909.

Anstey, N. M., T. Handojo, M. C. F. Pain, E. Kenangalem, E. Tjitra, R. N. Price and G. P. Maguire (2007). "Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation." The Journal of infectious diseases **195**(4): 589-596.

Anstey, N. M., B. Russell, T. W. Yeo and R. N. Price (2009). "The pathophysiology of vivax malaria." Trends in parasitology **25**(5): 220-227.

Armah, H., A. K. Doodoo, E. K. Wiredu, J. K. Stiles, A. A. Adjei, R. K. Gyasi and Y. Tettey (2005). "High-level cerebellar expression of cytokines and adhesion molecules in fatal, paediatric, cerebral malaria." Annals of tropical medicine and parasitology **99**(7): 629-647.

Aunin, E., U. Böhme, T. Sanderson, N. D. Simons, T. L. Goldberg, N. Ting, C. A. Chapman, C. I. Newbold, M. Berriman and A. J. Reid (2019). "Genomic and transcriptomic evidence for descent from *Plasmodium* and loss of blood schizogony in *Hepaticystis* parasites from naturally infected red colobus monkeys." BioRxiv: 871327.

Bachmann, A., M. Petter, A.-K. Tilly, L. Biller, K. A. Uliczka, M. F. Duffy, E. Tannich and I. Bruchhaus (2012). "Temporal expression and localization patterns of variant surface antigens in clinical *Plasmodium falciparum* isolates during erythrocyte schizogony." PloS one **7**(11): e49540-e49540.

Bachmann, A., J. A. M. Scholz, M. Janßen, M.-Q. Klinkert, E. Tannich, I. Bruchhaus and M. Petter (2015). "A comparative study of the localization and membrane topology of members of the RIFIN, STEVOR and *Pf* MC-2TM protein families in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." Malaria journal **14**(1): 274.

Banerji, J., J. Sands, J. L. Strominger and T. Spies (1990). "A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**(6): 2374-2378.

Barber, B. E., T. William, M. J. Grigg, U. Parameswaran, K. A. Piera, R. N. Price, T. W. Yeo and N. M. Anstey (2015). "Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria." PLoS pathogens **11**(1).

Barnwell, J. W., A. S. Asch, R. L. Nachman, M. Yamaya, M. Aikawa and P. Ingravallo (1989). "A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." The Journal of clinical investigation **84**(3): 765-772.

Baruch, D. I., B. L. Pasloske, H. B. Singh, X. Bi, X. C. Ma, M. Feldman, T. F. Taraschi and R. J. Howard (1995). "Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes." Cell **82**(1): 77-87.

Basu, S. and P. K. Sahi (2017). "Malaria: An Update." Indian journal of pediatrics **84**(7): 521-528.

Battle, K. E., M. S. Karhunen, S. Bhatt, P. W. Gething, R. E. Howes, N. Golding, T. P. Van Boeckel, J. P. Messina, G. D. Shanks, D. L. Smith, J. K. Baird and S. I. Hay (2014). "Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse." Malar J **13**: 144.

Berendt, A. R., A. McDowall, A. G. Craig, P. A. Bates, M. J. Sternberg, K. Marsh, C. I. Newbold and N. Hogg (1992). "The binding site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site." Cell **68**(1): 71-81.

Bernabeu, M., F. J. Lopez, M. Ferrer, L. Martin-Jaular, A. Razaname, G. Corradin, A. G. Maier, H. A. Del Portillo and C. Fernandez-Becerra (2012). "Functional analysis of *Plasmodium vivax* VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor." Cellular microbiology **14**(3): 386-400.

Birnbaum, J., S. Scharf, S. Schmidt, E. Jonscher, W. A. M. Hoeijmakers, S. Flemming, C. G. Toenhake, M. Schmitt, R. Sabitzki and B. Bergmann (2020). "A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites." Science **367**(6473): 51-59.

Blythe, J. E., X. Y. Yam, C. Kuss, Z. Bozdech, A. A. Holder, K. Marsh, J. Langhorne and P. R. Preiser (2008). "*Plasmodium falciparum* STEVOR proteins are highly expressed in patient isolates and located in the surface membranes of infected red blood cells and the apical tips of merozoites." Infection and immunity **76**(7): 3329-3336.

Boddey, J. A., A. N. Hodder, S. Günther, P. R. Gilson, H. Patsiouras, E. A. Kapp, J. A. Pearce, T. F. de Koning-Ward, R. J. Simpson, B. S. Crabb and A. F. Cowman (2010). "An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell." Nature **463**(7281): 627-631.

Bonnefoy, J. Y., S. Lecoanet-Henchoz, J. P. Aubry, J. F. Gauchat and P. Graber (1995). "CD23 and B-cell activation." Current opinion in immunology **7**(3): 355-359.

Bousema, T. and C. Drakeley (2011). "Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination." Clinical microbiology reviews **24**(2): 377-410.

Bozdech, Z., S. Mok, G. Hu, M. Imwong, A. Jaidee, B. Russell, H. Ginsburg, F. Nosten, N. P. Day and N. J. White (2008). "The transcriptome of *Plasmodium vivax* reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(42): 16290-16295.

Carlton, J. M., J. H. Adams, J. C. Silva, S. L. Bidwell, H. Lorenzi, E. Caler, J. Crabtree, S. V. Angiuoli, E. F. Merino, P. Amedeo, Q. Cheng, R. M. R. Coulson, B. S. Crabb, H. A. Del Portillo, K. Essien, T. V. Feldblyum, C. Fernandez-Becerra, P. R. Gilson, A. H. Gueye, X. Guo, S. Kang'a, T. W. A. Kooij, M. Korsinczky, E. V. S. Meyer, V. Nene, I. Paulsen, O. White, S. A. Ralph, Q. Ren, T. J. Sargeant, S. L. Salzberg, C. J. Stoeckert, S. A. Sullivan, M. M. Yamamoto, S. L. Hoffman, J. R. Wortman, M. J. Gardner, M. R. Galinski, J. W. Barnwell and C. M. Fraser-

Liggett (2008). "Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*." Nature **455**(7214): 757-763.

Carmona-Fonseca, J., E. Arango and A. Maestre (2013). "Placental malaria in Colombia: histopathologic findings in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* infections." The American journal of tropical medicine and hygiene **88**(6): 1093-1101.

Carvalho, B. O., S. C. P. Lopes, P. A. Nogueira, P. P. Orlandi, D. Y. Bargieri, Y. C. Blanco, R. Mamoni, J. A. Leite, M. M. Rodrigues, I. S. Soares, T. R. Oliveira, G. Wunderlich, M. V. G. Lacerda, H. A. del Portillo, M. O. G. Araújo, B. Russell, R. Suwanarusk, G. Snounou, L. Rénia and F. T. M. Costa (2010). "On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes." The Journal of infectious diseases **202**(4): 638-647.

Chen, Q., A. Barragan, V. Fernandez, A. Sundström, M. Schlichtherle, A. Sahlén, J. Carlson, S. Datta and M. Wahlgren (1998). "Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*." The Journal of experimental medicine **187**(1): 15-23.

Chen, Q., V. Fernandez, A. Sundström, M. Schlichtherle, S. Datta, P. Hagblom and M. Wahlgren (1998). "Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*." Nature **394**(6691): 392-395.

Chin, W. and G. R. Coatney (1971). "Relapse activity in sporozoite-induced infections with a West African strain of *Plasmodium ovale*." Am J Trop Med Hyg **20**(6): 825-827.

Chotivanich, K., R. Udomsangpetch, R. Suwanarusk, S. Pukrittayakamee, P. Wilairatana, J. G. Beeson, N. P. J. Day and N. J. White (2012). "*Plasmodium vivax* adherence to placental glycosaminoglycans." PloS one **7**(4): e34509-e34509.

Chotivanich, K. T., S. Pukrittayakamee, J. A. Simpson, N. J. White and R. Udomsangpetch (1998). "Characteristics of *Plasmodium vivax*-infected erythrocyte rosettes." The American journal of tropical medicine and hygiene **59**(1): 73-76.

Cooke, B. M., D. W. Buckingham, F. K. Glenister, K. M. Fernandez, L. H. Bannister, M. Marti, N. Mohandas and R. L. Coppel (2006). "A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells." The Journal of cell biology **172**(6): 899-908.

Cova, M., J. A. Rodrigues, T. K. Smith and L. Izquierdo (2015). "Sugar activation and glycosylation in *Plasmodium*." Malaria journal **14**: 427-427.

Cowman, A. F., D. Berry and J. Baum (2012). "The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell." Journal of cell Biology **198**(6): 961-971.

Cox-Singh, J., J. Hiu, S. B. Lucas, P. C. Divis, M. Zulkarnaen, P. Chandran, K. T. Wong, P. Adem, S. R. Zaki, B. Singh and S. Krishna (2010). "Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report." Malaria journal **9**: 10-10.

Crabb, B. S., B. M. Cooke, J. C. Reeder, R. F. Waller, S. R. Caruana, K. M. Davern, M. E. Wickham, G. V. Brown, R. L. Coppel and A. F. Cowman (1997). "Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress." Cell **89**(2): 287-296.

Cunha, C. B. and B. A. Cunha (2008). "Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler." J Vector Borne Dis **45**(3): 194-199.

Cunningham, D., J. Lawton, W. Jarra, P. Preiser and J. Langhorne (2010). "The pir multigene family of *Plasmodium*: antigenic variation and beyond." Molecular and biochemical parasitology **170**(2): 65-73.

Cutts, E. E., N. Laasch, D. M. Reiter, R. Trenker, L. M. Slater, P. J. Stansfeld and I. Vakonakis (2017). "Structural analysis of *P. falciparum* KAHRP and PfEMP1 complexes with

host erythrocyte spectrin suggests a model for cytoadherent knob protrusions." PLoS pathogens **13**(8): e1006552-e1006552.

David, P. H., M. Hommel, L. H. Miller, I. J. Udeinya and L. D. Oligino (1983). "Parasite sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **80**(16): 5075-5079.

Dayananda, K. K., R. N. Achur and D. C. Gowda (2018). "Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria." J Vector Borne Dis **55**(1): 1-8.

de Koning-Ward, T. F., M. W. Dixon, L. Tilley and P. R. Gilson (2016). "*Plasmodium* species: master renovators of their host cells." Nat Rev Microbiol **14**(8): 494-507.

de Koning-Ward, T. F., P. R. Gilson, J. A. Boddey, M. Rug, B. J. Smith, A. T. Papenfuss, P. R. Sanders, R. J. Lundie, A. G. Maier and A. F. Cowman (2009). "A newly discovered protein export machine in malaria parasites." Nature **459**(7249): 945-949.

del Portillo, H. A., C. Fernandez-Becerra, S. Bowman, K. Oliver, M. Preuss, C. P. Sanchez, N. K. Schneider, J. M. Villalobos, M. A. Rajandream, D. Harris, L. H. Pereira da Silva, B. Barrell and M. Lanzer (2001). "A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*." Nature **410**(6830): 839-842.

Duffy, P. E. and M. Fried (1999). "Malaria during pregnancy: parasites, antibodies and chondroitin sulphate A." Biochemical Society transactions **27**(4): 478-482.

Ebstie, Y. A., S. M. Abay, W. T. Tadesse and D. A. Ejigu (2016). "Tafenoquine and its potential in the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria: the evidence to date." Drug design, development and therapy **10**: 2387.

Elsworth, B., K. Matthews, C. Q. Nie, M. Kalanon, S. C. Charnaud, P. R. Sanders, S. A. Chisholm, N. A. Counihan, P. J. Shaw and P. Pino (2014). "PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites." Nature **511**(7511): 587-591.

Fatih, F. A., A. Siner, A. Ahmed, L. C. Woon, A. G. Craig, B. Singh, S. Krishna and J. Cox-Singh (2012). "Cytoadherence and virulence - the case of *Plasmodium knowlesi* malaria." Malaria journal **11**: 33-33.

Febbraio, M., D. P. Hajjar and R. L. Silverstein (2001). "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism." The Journal of clinical investigation **108**(6): 785-791.

Fernandez-Becerra, C., O. Pein, T. R. de Oliveira, M. M. Yamamoto, A. C. Cassola, C. Rocha, I. S. Soares, C. A. de Bragança Pereira and H. A. del Portillo (2005). "Variant proteins of *Plasmodium vivax* are not clonally expressed in natural infections." Molecular microbiology **58**(3): 648-658.

Fernandez-Becerra, C., M. M. Yamamoto, R. Z. N. Vêncio, M. Lacerda, A. Rosanas-Urgell and H. A. del Portillo (2009). "*Plasmodium vivax* and the importance of the subtelomeric multigene vir superfamily." Trends in parasitology **25**(1): 44-51.

França, C. T., W.-Q. He, J. Gruszczyk, N. T. Lim, E. Lin, B. Kiniboro, P. M. Siba, W.-H. Tham and I. Mueller (2016). "*Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins are key targets of naturally acquired immunity in young Papua New Guinean children." PLoS neglected tropical diseases **10**(9).

Frank, C., M. Faber, W. Hellenbrand, H. Wilking and K. Stark (2014). "Wichtige, durch Vektoren übertragene Infektionskrankheiten beim Menschen in Deutschland." Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz **57**(5): 557.

Frech, C. and N. Chen (2013). "Variant surface antigens of malaria parasites: functional and evolutionary insights from comparative gene family classification and analysis." BMC genomics **14**(1): 427.

Galinski, M. R., E. V. Meyer and J. W. Barnwell (2013). "*Plasmodium vivax*: modern strategies to study a persistent parasite's life cycle." Advances in parasitology, Elsevier. **81**: 1-26.

Gardner, M. J., N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M.-S. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Perte, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. A. Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. A. Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser and B. Barrell (2002). "Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Nature **419**(6906): 498-511.

Geng, J.-G. (1995). "Platelet and endothelial cell P-selectin and its leukocyte sialoglycoprotein ligand." Trends in Glycoscience and Glycotechnology **7**(36): 333-342.

Geng, J.-G., M. Chen and K.-C. Chou (2004). "P-selectin cell adhesion molecule in inflammation, thrombosis, cancer growth and metastasis." Current medicinal chemistry **11**(16): 2153-2160.

Goel, S., M. Palmkvist, K. Moll, N. Joannin, P. Lara, R. R. Akhouri, N. Moradi, K. Öjemalm, M. Westman, D. Angeletti, H. Kjellin, J. Lehtiö, O. Blixt, L. Idestrom, C. G. Gahmberg, J. R. Storry, A. K. Hult, M. L. Olsson, G. von Heijne, I. Nilsson and M. Wahlgren (2015). "RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria." Nature medicine **21**(4): 314-317.

Goldberg, D. E. and A. F. Cowman (2010). "Moving in and renovating: exporting proteins from *Plasmodium* into host erythrocytes." Nature reviews Microbiology **8**(9): 617-621.

Gonzalez-Ceron, L., M. H. Rodriguez, F. Santillan, B. Chavez, J. A. Nettel, J. E. Hernandez-Avila and K. C. Kain (2001). "*Plasmodium vivax*: ookinete destruction and oocyst development arrest are responsible for *Anopheles albimanus* resistance to circumsporozoite phenotype VK247 parasites." Experimental parasitology **98**(3): 152-161.

Gorr, T. A. and J. Vogel (2015). "Western blotting revisited: critical perusal of underappreciated technical issues." Proteomics. Clinical applications **9**(3-4): 396-405.

Grant, R. P., E. Hurt, D. Neuhaus and M. Stewart (2002). "Structure of the C-terminal FG-nucleoporin binding domain of Tap/NXF1." Nature structural biology **9**(4): 247-251.

Greenwalt, D. E., R. H. Lipsky, C. F. Ockenhouse, H. Ikeda, N. N. Tandon and G. A. Jamieson (1992). "Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine." Blood **80**(5): 1105-1115.

Grüning, C., A. Heiber, F. Kruse, S. Flemming, G. Franci, S. F. Colombo, E. Fasana, H. Schoeler, N. Borgese, H. G. Stunnenberg, J. M. Przyborski, T.-W. Gilberger and T. Spielmann (2012). "Uncovering common principles in protein export of malaria parasites." Cell host & microbe **12**(5): 717-729.

Gruszczyk, J., N. T. Lim, A. Arnott, W.-Q. He, W. Nguitraool, W. Roobsoong, Y.-F. Mok, J. M. Murphy, K. R. Smith and S. Lee (2016). "Structurally conserved erythrocyte-binding domain in *Plasmodium* provides a versatile scaffold for alternate receptor engagement." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(2): E191-E200.

Guarino, L. A., B. Xu, J. Jin and W. Dong (1998). "A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells." Journal of virology **72**(10): 7985-7991.

Gunalan, K., E. Lo, J. B. Hostetler, D. Yewhalaw, J. Mu, D. E. Neafsey, G. Yan and L. H. Miller (2016). "Role of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein 1 in invasion of Duffy-null Africans." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(22): 6271-6276.

- Gupta, E. D., G. Anand, H. Singh, K. Chaddha, P. K. Bharti, N. Singh, Y. D. Sharma and D. Gaur (2017). "Naturally acquired human antibodies against reticulocyte-binding domains of *Plasmodium vivax* proteins, PvRBP2c and PvRBP1a, exhibit binding-inhibitory activity." The Journal of infectious diseases **215**(10): 1558-1568.
- Haase, S., S. Herrmann, C. Grüring, A. Heiber, P. W. Jansen, C. Langer, M. Treeck, A. Cabrera, C. Bruns and N. S. Struck (2009). "Sequence requirements for the export of the *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts protein REX2." Molecular microbiology **71**(4): 1003-1017.
- Han, J.-H., S.-K. Lee, B. Wang, F. Muh, M. H. Nyunt, S. Na, K.-S. Ha, S.-H. Hong, W. S. Park and J. Sattabongkot (2016). "Identification of a reticulocyte-specific binding domain of *Plasmodium vivax* reticulocyte-binding protein 1 that is homologous to the PfRh4 erythrocyte-binding domain." Scientific reports **6**(1): 1-12.
- Handayani, S., D. T. Chiu, E. Tjitra, J. S. Kuo, D. Lampah, E. Kenangalem, L. Renia, G. Snounou, R. N. Price and N. M. Anstey (2009). "High deformability of *Plasmodium vivax*-infected red blood cells under microfluidic conditions." The Journal of infectious diseases **199**(3): 445-450.
- Hanssen, E., P. Hawthorne, M. W. Dixon, K. R. Trenholme, P. J. McMillan, T. Spielmann, D. L. Gardiner and L. Tilley (2008). "Targeted mutagenesis of the ring - exported protein - 1 of *Plasmodium falciparum* disrupts the architecture of Maurer's cleft organelles." Molecular microbiology **69**(4): 938-953.
- Hiller, N. L., S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estraño and K. Haldar (2004). "A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection." Science (New York, N.Y.) **306**(5703): 1934-1937.
- Hisaeda, H., K. Yasutomo and K. Himeno (2005). "Malaria: immune evasion by parasites." The international journal of biochemistry & cell biology **37**(4): 700-706.
- Ho, M., T. Schollaardt, X. Niu, S. Looareesuwan, K. D. Patel and P. Kubes (1998). "Characterization of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte and P-selectin interaction under flow conditions." Blood **91**(12): 4803-4809.
- Holdener, B. C. and R. S. Haltiwanger (2019). "Protein O-fucosylation: structure and function." Current opinion in structural biology **56**: 78-86.
- Holder, A. A., M. J. Blackman, P. A. Burghaus, J. A. Chappel, I. T. Ling, N. McCallum-Deighton and S. Shai (1992). "A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **87 Suppl 3**: 37-42.
- Horuk, R., C. E. Chitnis, W. C. Darbonne, T. J. Colby, A. Rybicki, T. J. Hadley and L. H. Miller (1993). "A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor." Science **261**(5125): 1182-1184.
- Howard, R. J., J. W. Barnwell, E. P. Rock, J. Neequaye, D. Ofori-Adjei, W. L. Maloy, J. A. Lyon and A. Saul (1988). "Two approximately 300 kilodalton *Plasmodium falciparum* proteins at the surface membrane of infected erythrocytes." Molecular and biochemical parasitology **27**(2-3): 207-223.
- Hulden, L. and L. Hulden (2011). "Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival." Malar J **10**: 90.
- Hulden, L., L. Hulden and K. Heliovaara (2008). "Natural relapses in vivax malaria induced by *Anopheles* mosquitoes." Malar J **7**: 64.
- Imwong, M., G. Snounou, S. Pukrittayakamee, N. Tanomsing, J. R. Kim, A. Nandy, J.-P. Guthmann, F. Nosten, J. Carlton, S. Looareesuwan, S. Nair, D. Sudimack, N. P. J. Day, T. J. C. Anderson and N. J. White (2007). "Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites." The Journal of infectious diseases **195**(7): 927-933.

- Jackson, K. E., S. Habib, M. Frugier, R. Hoen, S. Khan, J. S. Pham, L. Ribas de Pouplana, M. Royo, M. A. S. Santos, A. Sharma and S. A. Ralph (2011). "Protein translation in *Plasmodium* parasites." Trends in parasitology **27**(10): 467-476.
- Jackson, S. E., T. D. Craggs and J.-r. Huang (2006). "Understanding the folding of GFP using biophysical techniques." Expert review of proteomics **3**(5): 545-559.
- Janes, J. H., C. P. Wang, E. Levin-Edens, I. Vigan-Womas, M. Guillotte, M. Melcher, O. Mercereau-Puijalon and J. D. Smith (2011). "Investigating the host binding signature on the *Plasmodium falciparum* PfEMP1 protein family." PLoS pathogens **7**(5): e1002032-e1002032.
- Jensen, A. R., Y. Adams and L. Hviid (2020). "Cerebral *Plasmodium falciparum* malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it." Immunological reviews **293**(1): 230-252.
- Joannin, N., S. Abhiman, E. L. Sonnhammer and M. Wahlgren (2008). "Sub-grouping and sub-functionalization of the RIFIN multi-copy protein family." BMC genomics **9**(1): 19.
- Jonscher, E., S. Flemming, M. Schmitt, R. Sabitzki, N. Reichard, J. Birnbaum, B. Bergmann, K. Höhn and T. Spielmann (2019). "PfVPS45 is required for host cell cytosol uptake by malaria blood stage parasites." Cell host & microbe **25**(1): 166-173. e165.
- Kadekoppala, M. and A. A. Holder (2010). "Merozoite surface proteins of the malaria parasite: the MSP1 complex and the MSP7 family." International journal for parasitology **40**(10): 1155-1161.
- Kashuba, E. V., K. Gradin, M. Isaguliants, L. Szekely, L. Poellinger, G. Klein and A. Kazlauskas (2006). "Regulation of transactivation function of the aryl hydrocarbon receptor by the Epstein-Barr virus-encoded EBNA-3 protein." The Journal of biological chemistry **281**(2): 1215-1223.
- Kaviratne, M., S. Khan, W. Jarra and P. Preiser (2002). "Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells." Eukaryotic cell **1**(6): 926-935.
- Khattab, A. and S. Meri (2011). "Exposure of the *Plasmodium falciparum* clonally variant STEVOR proteins on the merozoite surface." Malaria journal **10**(1): 58.
- Kong, D.-H., Y. K. Kim, M. R. Kim, J. H. Jang and S. Lee (2018). "Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer." International journal of molecular sciences **19**(4): 1057.
- Kriek, N., L. Tilley, P. Horrocks, R. Pinches, B. C. Elford, D. J. Ferguson, K. Lingelbach and C. I. Newbold (2003). "Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence - mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite - infected erythrocytes." Molecular microbiology **50**(4): 1215-1227.
- Külzer, S., S. Charnaud, T. Dagan, J. Riedel, P. Mandal, E. R. Pesce, G. L. Blatch, B. S. Crabb, P. R. Gilson and J. M. Przyborski (2012). "*Plasmodium falciparum* - encoded exported hsp70/hsp40 chaperone/co - chaperone complexes within the host erythrocyte." Cellular microbiology **14**(11): 1784-1795.
- Külzer, S., M. Rug, K. Brinkmann, P. Cannon, A. Cowman, K. Lingelbach, G. L. Blatch, A. G. Maier and J. M. Przyborski (2010). "Parasite - encoded Hsp40 proteins define novel mobile structures in the cytosol of the *P. falciparum* - infected erythrocyte." Cellular microbiology **12**(10): 1398-1420.
- Kun, J. F., J. Klabunde, B. Lell, D. Luckner, M. Alpers, J. May, C. Meyer and P. G. Kremsner (1999). "Association of the ICAM-1 Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambaréné, Gabon." The American journal of tropical medicine and hygiene **61**(5): 776-779.

- Laloo, D. G., D. Shingadia, D. J. Bell, N. J. Beeching, C. J. M. Whitty and P. L. Chiodini (2016). "UK malaria treatment guidelines 2016." J Infect **72**(6): 635-649.
- Lamandé, S. R. and J. F. Bateman (2018). "Collagen VI disorders: insights on form and function in the extracellular matrix and beyond." Matrix Biology **71**: 348-367.
- Lanzer, M., H. Wickert, G. Krohne, L. Vincensini and C. B. Breton (2006). "Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." International journal for parasitology **36**(1): 23-36.
- Lasky, L. A. (1991). "Lectin cell adhesion molecules (LEC-CAMs): a new family of cell adhesion proteins involved with inflammation." Journal of cellular biochemistry **45**(2): 139-146.
- Lee, W.-C., B. Russell and L. Rénia (2019). "Sticking for a Cause: The Falciparum Malaria Parasites Cytoadherence Paradigm." Frontiers in immunology **10**: 1444-1444.
- Lennartz, F., Y. Adams, A. Bengtsson, R. W. Olsen, L. Turner, N. T. Ndam, G. Ecklu-Mensah, A. Moussiliou, M. F. Ofori, B. Gamain, J. P. Lusingu, J. E. V. Petersen, C. W. Wang, S. Nunes-Silva, J. S. Jespersen, C. K. Y. Lau, T. G. Theander, T. Lavstsen, L. Hviid, M. K. Higgins and A. T. R. Jensen (2017). "Structure-Guided Identification of a Family of Dual Receptor-Binding PfEMP1 that Is Associated with Cerebral Malaria." Cell host & microbe **21**(3): 403-414.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nature reviews. Immunology **7**(9): 678-689.
- Li, W., M. Febbraio, S. P. Reddy, D.-Y. Yu, M. Yamamoto and R. L. Silverstein (2010). "CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs." The Journal of clinical investigation **120**(11): 3996-4006.
- Looker, O., A. J. Blanch, B. Liu, J. Nunez-Iglesias, P. J. McMillan, L. Tilley and M. W. A. Dixon (2019). "The knob protein KAHRP assembles into a ring-shaped structure that underpins virulence complex assembly." PLoS pathogens **15**(5): e1007761-e1007761.
- Lopes, S. C., L. Albrecht, B. O. Carvalho, A. M. Siqueira, R. Thomson-Luque, P. A. Nogueira, C. Fernandez-Becerra, H. A. Del Portillo, B. M. Russell and L. Rénia (2014). "Paucity of *Plasmodium vivax* mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential." The Journal of infectious diseases **209**(9): 1403-1407.
- Lopez, F. J., M. Bernabeu, C. Fernandez-Becerra and H. A. del Portillo (2013). "A new computational approach redefines the subtelomeric vir superfamily of *Plasmodium vivax*." BMC genomics **14**: 8-8.
- Lubiana, P. (2017). "Charakterisierung der Interaktion zwischen *Plasmodium* infizierten Erythrozyten und humanen Endothelrezeptoren."
- Lüking, A., U. Stahl and U. Schmidt (1998). "The protein family of RNA helicases." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **33**(4): 259-296.
- Maguire, J. D., M. E. Fenton, A. I. Susanti and J. B. Walker (2007). "*Plasmodium vivax*-associated acute respiratory distress syndrome after extended travel in Afghanistan." Travel medicine and infectious disease **5**(5): 301-305.
- Malleret, B., F. Xu, N. Mohandas, R. Suwanarusk, C. Chu, J. A. Leite, K. Low, C. Turner, K. Sriprawat and R. Zhang (2013). "Significant biochemical, biophysical and metabolic diversity in circulating human cord blood reticulocytes." PLoS one **8**(10).
- Marapana, D. S., L. F. Dagley, J. J. Sandow, T. Nebl, T. Triglia, M. Pasternak, B. K. Dickerman, B. S. Crabb, P. R. Gilson and A. I. Webb (2018). "Plasmeprin V cleaves malaria effector proteins in a distinct endoplasmic reticulum translocation interactome for export to the erythrocyte." Nature microbiology **3**(9): 1010-1022.

- Marín-Menéndez, A., A. Bardají, F. E. Martínez-Espinosa, C. Bôtto-Menezes, M. V. Lacerda, J. Ortiz, P. Cisteró, M. Piqueras, I. Felger, I. Müller, J. Ordi, H. del Portillo, C. Menéndez, M. Wahlgren and A. Mayor (2013). "Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia." PLoS neglected tropical diseases **7**(4): e2155-e2155.
- Marti, M., R. T. Good, M. Rug, E. Knuepfer and A. F. Cowman (2004). "Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte." Science (New York, N.Y.) **306**(5703): 1930-1933.
- Martin, K. C. and A. Ephrussi (2009). "mRNA localization: gene expression in the spatial dimension." Cell **136**(4): 719-730.
- Matsumoto, Y., M. Aikawa and J. W. Barnwell (1988). "Immunoelectron microscopic localization of vivax malaria antigens to the clefts and caveola-vesicle complexes of infected erythrocytes." The American journal of tropical medicine and hygiene **39**(4): 317-322.
- Matthews, K. M., E. L. Pitman and T. F. de Koning-Ward (2019). "Illuminating how malaria parasites export proteins into host erythrocytes." Cellular microbiology **21**(4): e13009-e13009.
- McRobert, L., P. Preiser, S. Sharp, W. Jarra, M. Kaviratne, M. C. Taylor, L. Renia and C. J. Sutherland (2004). "Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the *Plasmodium falciparum* life cycle." Infection and immunity **72**(11): 6597-6602.
- Ménard, D., C. Barnadas, C. Bouchier, C. Henry-Halldin, L. R. Gray, A. Ratsimbaoa, V. Thonier, J.-F. Carod, O. Domarle and Y. Colin (2010). "*Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(13): 5967-5971.
- Merino, E. F., C. Fernandez-Becerra, A. M. Durham, J. E. Ferreira, V. F. Tumulasci, J. d'Arc-Neves, M. da Silva-Nunes, M. U. Ferreira, T. Wickramarachchi, P. Udagama-Randeniya, S. M. Handunnetti and H. A. Del Portillo (2006). "Multi-character population study of the vir subtelomeric multigene superfamily of *Plasmodium vivax*, a major human malaria parasite." Molecular and biochemical parasitology **149**(1): 10-16.
- Mesén-Ramírez, P., B. Bergmann, T. T. Tran, M. Garten, J. Stäcker, I. Naranjo-Prado, K. Höhn, J. Zimmerberg and T. Spielmann (2019). "EXP1 is critical for nutrient uptake across the parasitophorous vacuole membrane of malaria parasites." PLoS biology **17**(9): e3000473.
- Metwally, N. G., A.-K. Tilly, P. Lubiana, L. K. Roth, M. Dörpinghaus, S. Lorenzen, K. Schuldt, S. Witt, A. Bachmann, H. Tidow, T. Gutschmann, T. Burmester, T. Roeder, E. Tannich and I. Bruchhaus (2017). "Characterisation of *Plasmodium falciparum* populations selected on the human endothelial receptors P-selectin, E-selectin, CD9 and CD151." Scientific reports **7**(1): 4069-4069.
- Miller, L. H., M. F. Good and G. Milon (1994). "Malaria pathogenesis." Science (New York, N.Y.) **264**(5167): 1878-1883.
- Miller, L. H., S. J. Mason, D. F. Clyde and M. H. McGinniss (1976). "The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: the Duffy-blood-group genotype, FyFy." New England Journal of Medicine **295**(6): 302-304.
- Milner, D. A., Jr. (2018). "Malaria Pathogenesis." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **8**(1): a025569.
- Molnár, P., L. Marton, R. Izrael, H. L. Pálinkás and B. G. Vértessy (2018). "Uracil moieties in *Plasmodium falciparum* genomic DNA." FEBS open bio **8**(11): 1763-1772.
- Montes, R. A. O., J. R. Eckman, L. L. Hsu and T. M. Wick (2002). "Sickle erythrocyte adherence to endothelium at low shear: role of shear stress in propagation of vaso-occlusion." American journal of hematology **70**(3): 216-227.

Moon, R. W., J. Hall, F. Rangkuti, Y. S. Ho, N. Almond, G. H. Mitchell, A. Pain, A. A. Holder and M. J. Blackman (2013). "Adaptation of the genetically tractable malaria pathogen *Plasmodium knowlesi* to continuous culture in human erythrocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(2): 531-536.

Moore, K. L., K. D. Patel, R. E. Bruehl, F. Li, D. A. Johnson, H. S. Lichenstein, R. D. Cummings, D. F. Bainton and R. P. McEver (1995). "P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin." The Journal of cell biology **128**(4): 661-671.

Mundwiler-Pachlatko, E. and H.-P. Beck (2013). "Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(50): 19987-19994.

Nerlich, A. (2016). "Paleopathology and Paleomicrobiology of Malaria." Microbiology spectrum **4**(6): 10.1128/microbiolspec.PoH-0006-2015.

Newbold, C., A. Craig, S. Kyes, A. Rowe, D. Fernandez-Reyes and T. Fagan (1999). "Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*." International journal for parasitology **29**(6): 927-937.

Niang, M., A. K. Bei, K. G. Madnani, S. Pelly, S. Dankwa, U. Kanjee, K. Gunalan, A. Amaladoss, K. P. Yeo, N. S. Bob, B. Malleret, M. T. Duraisingh and P. R. Preiser (2014). "STEVE is a *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting." Cell host & microbe **16**(1): 81-93.

Niang, M., X. Yan Yam and P. R. Preiser (2009). "The *Plasmodium falciparum* STEVE multigene family mediates antigenic variation of the infected erythrocyte." PLoS pathogens **5**(2): e1000307-e1000307.

Nicholson, A. C. (2004). "Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling." Trends in cardiovascular medicine **14**(1): 8-12.

Ochola, L. B., B. R. Siddondo, H. Ocholla, S. Nkya, E. N. Kimani, T. N. Williams, J. O. Makale, A. Liljander, B. C. Urban, P. C. Bull, T. Szeszak, K. Marsh and A. G. Craig (2011). "Specific receptor usage in *Plasmodium falciparum* cytoadherence is associated with disease outcome." PloS one **6**(3): e14741-e14741.

Ockenhouse, C. F., M. Ho, N. N. Tandon, G. A. Van Seventer, S. Shaw, N. J. White, G. A. Jamieson, J. D. Chulay and H. K. Webster (1991). "Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1." The Journal of infectious diseases **164**(1): 163-169.

Ockenhouse, C. F., T. Tegoshi, Y. Maeno, C. Benjamin, M. Ho, K. E. Kan, Y. Thway, K. Win, M. Aikawa and R. R. Lobb (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**(4): 1183-1189.

Ohgami, N., R. Nagai, M. Ikemoto, H. Arai, A. Kuniyasu, S. Horiuchi and H. Nakayama (2001). "CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products." Annals of the New York Academy of Sciences **947**: 350-355.

Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso and R. Lobb (1989). "Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes." Cell **59**(6): 1203-1211.

Pasternak, N. D. and R. Dzikowski (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**(7): 1463-1466.

- Patel, S. N., L. Serghides, T. G. Smith, M. Febbraio, R. L. Silverstein, T. W. Kurtz, M. Pravenec and K. C. Kain (2004). "CD36 mediates the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by rodent macrophages." The Journal of infectious diseases **189**(2): 204-213.
- Penha-Gonçalves, C. (2019). "Genetics of Malaria Inflammatory Responses: A Pathogenesis Perspective." Frontiers in immunology **10**: 1771-1771.
- Pepino, M. Y., O. Kuda, D. Samovski and N. A. Abumrad (2014). "Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism." Annual review of nutrition **34**: 281-303.
- Petersen, W., S. Külzer, S. Engels, Q. Zhang, A. Ingmundson, M. Rug, A. G. Maier and J. M. Przyborski (2016). "J-dot targeting of an exported HSP40 in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." International journal for parasitology **46**(8): 519-525.
- Petter, M., M. Haeggström, A. Khattab, V. Fernandez, M.-Q. Klinkert and M. Wahlgren (2007). "Variant proteins of the *Plasmodium falciparum* RIFIN family show distinct subcellular localization and developmental expression patterns." Molecular and biochemical parasitology **156**(1): 51-61.
- Popovici, J. and D. Ménard (2015). "Challenges in antimalarial drug treatment for vivax malaria control." Trends in molecular medicine **21**(12): 776-788.
- Price, R. N., E. Tjitra, C. A. Guerra, S. Yeung, N. J. White and N. M. Anstey (2007). "Vivax malaria: neglected and not benign." The American journal of tropical medicine and hygiene **77**(6_Suppl): 79-87.
- Ramasamy, R. (2014). "Zoonotic malaria—global overview and research and policy needs." Frontiers in public health **2**: 123.
- Rask, T. S., Hansen D. A., Theander, T. G., Pedersen, A. G. and Lavtsen, T. (2010). "*Plasmodium falciparum* erythrocyte protein 1 diversity in seven genomes-divide and conquer." PLoS computational biology, **6**(9).
- Roobsoong, W., S. Roytrakul, J. Sattabongkot, J. Li, R. Udomsangpetch and L. Cui (2011). "Determination of the *Plasmodium vivax* schizont stage proteome." Journal of proteomics **74**(9): 1701-1710.
- Rowe, J. A., A. Claessens, R. A. Corrigan and M. Arman (2009). "Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications." Expert reviews in molecular medicine **11**: e16-e16.
- Russell, B. M. and B. M. Cooke (2017). "The rheopathobiology of *Plasmodium vivax* and other important primate malaria parasites." Trends in parasitology **33**(4): 321-334.
- Russo, I., S. Babbitt, V. Muralidharan, T. Butler, A. Oksman and D. E. Goldberg (2010). "Plasmepsin V licenses *Plasmodium* proteins for export into the host erythrocyte." Nature **463**(7281): 632-636.
- Saito, F., K. Hirayasu, T. Satoh, C. W. Wang, J. Lusingu, T. Arimori, K. Shida, N. M. Q. Palacpac, S. Itagaki, S. Iwanaga, E. Takashima, T. Tsuboi, M. Kohyama, T. Suenaga, M. Colonna, J. Takagi, T. Lavtsen, T. Horii and H. Arase (2017). "Immune evasion of *Plasmodium falciparum* by RIFIN via inhibitory receptors." Nature **552**(7683): 101-105.
- Sanyal, S., S. Egée, G. Bouyer, S. Perrot, I. Safeukui, E. Bischoff, P. Buffet, K. W. Deitsch, O. Mercereau-Puijalon and P. H. David (2012). "*Plasmodium falciparum* STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **119**(2): e1-e8.
- Sanz, S., G. Bandini, D. Ospina, M. Bernabeu, K. Mariño, C. Fernández-Becerra and L. Izquierdo (2013). "Biosynthesis of GDP-fucose and other sugar nucleotides in the blood stages of *Plasmodium falciparum*." The Journal of biological chemistry **288**(23): 16506-16517.

Scherf, A., R. Hernandez-Rivas, P. Buffet, E. Bottius, C. Benatar, B. Pouvelle, J. Gysin and M. Lanzer (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**(18): 5418-5426.

Seibel, N. M., J. Eljouni, M. M. Nalaskowski and W. Hampe (2007). "Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers." Analytical biochemistry **368**(1): 95-99.

Senczuk, A. M., J. C. Reeder, M. M. Kosmala and M. Ho (2001). "*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 functions as a ligand for P-selectin." Blood **98**(10): 3132-3135.

Sherling, E. S. and C. van Ooij (2016). "Host cell remodeling by pathogens: the exomembrane system in *Plasmodium*-infected erythrocytes." FEMS microbiology reviews **40**(5): 701-721.

Silverstein, R. L. and M. Febbraio (2009). "CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior." Science signaling **2**(72): re3-re3.

Smith, J. D. (2014). "The role of PfEMP1 adhesion domain classification in *Plasmodium falciparum* pathogenesis research." Molecular and biochemical parasitology **195**(2): 82-87.

Smith, J. D., J. A. Rowe, M. K. Higgins and T. Lavstsen (2013). "Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* - infected erythrocytes." Cellular microbiology **15**(12): 1976-1983.

Smith, J. D., J. A. Rowe, M. K. Higgins and T. Lavstsen (2013). "Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." Cellular microbiology **15**(12): 1976-1983.

Solanki, V., M. Tiwari and V. Tiwari (2018). "Host-bacteria interaction and adhesin study for development of therapeutics." International journal of biological macromolecules **112**: 54-64.

Spielmann, T. and T.-W. Gilberger (2010). "Protein export in malaria parasites: do multiple export motifs add up to multiple export pathways?" Trends in parasitology **26**(1): 6-10.

Spielmann, T., P. L. Hawthorne, M. W. Dixon, M. Hannemann, K. Klotz, D. J. Kemp, N. Klonis, L. Tilley, K. R. Trenholme and D. L. Gardiner (2006). "A cluster of ring stage-specific genes linked to a locus implicated in cytoadherence in *Plasmodium falciparum* codes for PEXEL-negative and PEXEL-positive proteins exported into the host cell." Molecular biology of the cell **17**(8): 3613-3624.

Spycher, C., M. Rug, E. Pachlatko, E. Hanssen, D. Ferguson, A. F. Cowman, L. Tilley and H. P. Beck (2008). "The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of *Plasmodium falciparum* - infected erythrocytes." Molecular microbiology **68**(5): 1300-1314.

Sutherland, C. J. (2001). "Stevor transcripts from *Plasmodium falciparum* gametocytes encode truncated polypeptides." Molecular and biochemical parasitology **113**(2): 331-335.

Suwanarusk, R., B. M. Cooke, A. M. Dondorp, K. Silamut, J. Sattabongkot, N. J. White and R. Udomsangpetch (2004). "The deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*." The Journal of infectious diseases **189**(2): 190-194.

Tanabe, K., M. Mackay, M. Goman and J. G. Scaife (1987). "Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Journal of molecular biology **195**(2): 273-287.

Thompson, J. R. and L. J. Banaszak (2002). "Lipid-protein interactions in lipovitellin." Biochemistry **41**(30): 9398-9409.

Thomson-Luque, R., J. H. Adams, C. H. Kocken and E. M. Pasini (2019). "From marginal to essential: the golden thread between nutrient sensing, medium composition and *Plasmodium vivax* maturation in in vitro culture." Malaria journal **18**(1): 344.

Thorarinsdottir, K., A. Camponeschi, I. Gjertsson and I. L. Mårtensson (2015). "CD21 - /low B cells: A Snapshot of a Unique B Cell Subset in Health and Disease." Scandinavian journal of immunology **82**(3): 254-261.

Tilley, L., M. W. Dixon and K. Kirk (2011). "The *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell." The international journal of biochemistry & cell biology **43**(6): 839-842.

Tilly, A.-K., J. Thiede, N. Metwally, P. Lubiana, A. Bachmann, T. Roeder, N. Rockliffe, S. Lorenzen, E. Tannich, T. Gutschmann and I. Bruchhaus (2015). "Type of in vitro cultivation influences cytoadhesion, knob structure, protein localization and transcriptome profile of *Plasmodium falciparum*." Scientific reports **5**: 16766-16766.

Trager, W. and H. Most (1963). "A long-delayed primary attack of ovale malaria." The American journal of tropical medicine and hygiene **12**(6): 837-839.

Trampuz, A., M. Jereb, I. Muzlovic and R. M. Prabhu (2003). "Clinical review: Severe malaria." Crit Care **7**(4): 315-323.

Turner, G. D., H. Morrison, M. Jones, T. M. Davis, S. Looareesuwan, I. D. Buley, K. C. Gatter, C. I. Newbold, S. Pukritayakamee, B. Nagachinta and et al. (1994). "An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration." The American journal of pathology **145**(5): 1057-1069.

Tuteja, R. and J. Mehta (2010). "A genomic glance at the components of the mRNA export machinery in *Plasmodium falciparum*." Communicative & integrative biology **3**(4): 318-326.

Udagama, P., C. Atkinson, J. Peiris, P. David, K. Mendis and M. Aikawa (1988). "Immunoelectron microscopy of Schüffner's dots in *Plasmodium vivax*-infected human erythrocytes." The American journal of pathology **131**(1): 48.

Udomsanpetch, R., K. Thanikkul, S. Pukritayakamee and N. J. White (1995). "Rosette formation by *Plasmodium vivax*." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **89**(6): 635-637.

Val, F., S. Avalos, A. A. Gomes, J. E. A. Zerpa, G. Fontecha, A. M. Siqueira, Q. Bassat, M. G. C. Alecrim, W. M. Monteiro and M. V. G. Lacerda (2017). "Are respiratory complications of *Plasmodium vivax* malaria an underestimated problem?" Malaria journal **16**(1): 495-495.

Vallejo, A. F., J. García, A. B. Amado-Garavito, M. Arévalo-Herrera and S. Herrera (2016). "*Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections." Malaria journal **15**(1): 48.

van de Stolpe, A. and P. T. van der Saag (1996). "Intercellular adhesion molecule-1." Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) **74**(1): 13-33.

Versiani, F. G., M. E. Almeida, L. A. Mariuba, P. P. Orlandi and P. A. Nogueira (2013). "N-terminal *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1, a potential subunit for malaria vivax vaccine." Clinical & developmental immunology **2013**: 965841-965841.

Vestweber, D. and J. E. Blanks (1999). "Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands." Physiological reviews **79**(1): 181-213.

Wahlgren, M., S. Goel and R. R. Akhouri (2017). "Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria." Nature Reviews Microbiology **15**(8): 479-491.

Watermeyer, J. M., V. L. Hale, F. Hackett, D. K. Clare, E. E. Cutts, I. Vakonakis, R. A. Fleck, M. J. Blackman and H. R. Saibil (2016). "A spiral scaffold underlies cytoadherent knobs in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." Blood **127**(3): 343-351.

Wei, P., F.-d. Sun, L.-M. Zuo, J. Qu, P. Chen, L.-d. Xu and S.-Z. Luo (2017). "Critical residues and motifs for homodimerization of the first transmembrane domain of the plasma membrane glycoprotein CD36." The Journal of biological chemistry **292**(21): 8683-8693.

White, N., S. Pukrittayakamee, T. Hien, M. Faiz, O. Mokuolu and A. Dondorp (2014). "Malaria." Lancet [Internet]. 2014; 383 (9918): 723–35.

WHO, W. H. O. (2000). "Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **94 Suppl 1**: S1-S90.

WHO, W. H. O. (2019). "World malaria report 2019."

Wichers, J. S., J. A. M. Scholz, J. Strauss, S. Witt, A. Lill, L.-I. Ehnold, N. Neupert, B. Liffner, R. Lühken, M. Petter, S. Lorenzen, D. W. Wilson, C. Löw, C. Lavazec, I. Bruchhaus, E. Tannich, T. W. Gilberger and A. Bachmann (2019). "Dissecting the Gene Expression, Localization, Membrane Topology, and Function of the *Plasmodium falciparum* STEVOR Protein Family." mBio **10**(4): e01500-01519.

Wittchen, E. S. (2009). "Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration." Frontiers in bioscience (Landmark edition) **14**: 2522-2545.

Xie, L.-x., Z.-x. Yu, S.-y. Guo, P. Li, A. E. Abdalla and J.-p. Xie (2015). "The roles of epigenetics and protein post-translational modifications in bacterial antibiotic resistance." Yi chuan = Hereditas **37**(8): 793-800.

Yam, X. Y., T. Brugat, A. Siau, J. Lawton, D. S. Wong, A. Farah, J. S. Twang, X. Gao, J. Langhorne and P. R. Preiser (2016). "Characterization of the *Plasmodium* Interspersed Repeats (PIR) proteins of *Plasmodium chabaudi* indicates functional diversity." Scientific reports **6**: 23449.

Yam, X. Y. and P. R. Preiser (2017). "Host immune evasion strategies of malaria blood stage parasite." Molecular bioSystems **13**(12): 2498-2508.

Zhang, Y., J. You, X. Wang and J. Weber (2015). "The DHX33 RNA helicase promotes mRNA translation initiation." Molecular and cellular biology **35**(17): 2918-2931.

Zimmerman, P. A. (2017). "*Plasmodium vivax* infection in Duffy-negative people in Africa." The American journal of tropical medicine and hygiene **97**(3): 636.

Zuchtriegel, G., B. Uhl, M. E. T. Hessenauer, A. R. M. Kurz, M. Rehberg, K. Lauber, F. Krombach and C. A. Reichel (2015). "Spatiotemporal expression dynamics of selectins govern the sequential extravasation of neutrophils and monocytes in the acute inflammatory response." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **35**(4): 899-910.

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATS	engl. <i>Acidic Terminal Segment</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CHO	engl. <i>chinese hamster ovary</i>
CIDR	engl. <i>cystein-rich interdomain region</i>
CRT	engl. <i>chloroquine resistancetransporter</i>
CSA	Chondroitinsulfat A
DBL	engl. <i>Duffy binding like</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Ditriothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Erythrozytenmembran
EPCR	engl. <i>endothelial protein C receptor</i>
<i>Et al.</i>	lat. et alii= und andere
ETRAPM	engl. <i>early transcribed membrane protein</i>
forw	engl. <i>forward</i>
x g	Erdbeschleunigung
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
g	Gramm
h	Stunde
ICAM-1	Engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
iE	infizierte Erythrozyten
IFA	Immunfluoreszenzanalyse

iR	infizierte Retikulozyten
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
M	molare Masse
MACS	engl. <i>magnet activated cell sorting</i>
MFS	engl. <i>malaria freezing solution</i>
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
MTS	engl. <i>malaria thawing solution</i>
min	Minute/n
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Maurer'sche Spalten
MSP1	engl. <i>merozoite surface protein 1</i>
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PEXEL	engl. <i>Plasmodium falciparum export element</i>
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>PfEMP1</i>	engl. <i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
<i>PfMC-2TM</i>	engl. <i>Plasmodium falciparum maurer's clefts-2 transmembrane</i>
pH	lat. <i>Potentia hydrogenii</i>
PIR	engl. <i>Plasmodium interspersed repeats</i>
PTEX	engl. <i>Plasmodium translocon of exported proteins</i>
RIFIN	engl. <i>repetitive interspersed family</i>
rev	engl. <i>reverse</i>
RT	Raumtemperatur
SBP1	engl. <i>skeleton binding protein 1</i>
SP	Signalpeptid

STEVOR	engl. <i>subtelomeric variable open reading frame</i>
TM	Transmembrandomäne
U	Reaktionseinheit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
<i>var</i>	engl. <i>variant gene</i>
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VIR	engl. <i>variant interspersed repeats</i>
VSA	engl. <i>variant surface antigens</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/v	Gewicht/Volumen
°C	Grad Celsius

Anhang

PVX_000020

Vir9_for **GAGAGGATCC** TGAAATACTTAACTACTTGT (56,2 °C) 33 bp

Vir9_rev **GAGAGAATTC** TTA TCTAAATTCTTCTAGTGCTTCACAAT (58,1 °C) 39 bp

DNA-Sequenz (Introns in rot und Oligonukleotide in blau); Länge 970 bp:

ATGCTAAATTTTTTATGTT TTTTTTCTACTATTTTTTCTCCATAGTATAATTTTGTAAGTACG
 TATTCTAAATATAAAGACATATATTATGACAGAACTACAGATGAAACTTCTATTAATGATATATGCGAAG
 ACTACATTTTATCTCATTTCGATCCTGATGTAGAGCAGGGTAGCCAAGAATGTTTTAGGAAGGTGTGTTCA
 AAAGTTAAGAACTACTTAAATTATGTAAAAGTAAATTCTGAATCCCTTGATATACCAAAATGTTGTAAT
 ACTTAACTACTTGT TATGACCAAGCAATTTATAATTTACTTTCTGGTTACACTACATTATCACTGTACA
 TTGAAC TTCAAAATTGTATGATGAGCATAATTCGATTTGTAATATGTAATGAGCATAAAGAGGACGT
 TAATTATGAACTTATAAAAACTTAATGAACTAATTACACTATACAAGGATTTTGATACATATAAAGCA
 TCAAGTGATCCAAAAGAGAATAATGAATGTAAATGTGTTTCGAAAATGTGCAAATTCATATAAACGTAC
 ATAAAGAAATGTGAAGATGGCACTCAACGAAAT ATTGTGAAGCACTAGAAGAATTTAGA AATACATAT
 AATCAACATATGCAAAATGGAACTAATTGTAACAATGTAGACATATACTTACCATCCACAAAAAAGTT
 AACATCATTGTTCTTATTACAATCCGCTATTATTATATTAACCTTTTGTTCCTTTTATTTATTCTGTATAA
 AGGTAGAAATTTTTTTATTAATAAATAATTATTATGATAAAATTTTAATTATACAGTTTCATATAAAAA
 TTATTATGTTATAATTGCTGTATTATTAATATATAATTTTTCCCTTACTATTAGTTTACTACAGTTGTGCTC
 ATGCATAAATGCTCAAAAAGGGAAGAGAA AAAATATGAAGGAAAGTTTAAA

Die transgene Zelllinie pARL_PVX_000020 wurde von Elena Baron während ihrer Bachelorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Bruchhaus hergestellt. Dafür wurde das *vir*-Gen mittels PCR direkt aus eine *P. vivax*-Probe amplifiziert. Es erfolgte keine Anpassung der *codon usage* an *P. falciparum*.

PVX_060690

```
1. M G S I T I N I Y D K D Q T L D S Q E C L
GGTACCATGGGAAGTATAACTATAATATATATGATAAAGATCAAACATTAGATAGTCAAGAAATGTTA
E R Y F E I L E N I Q G S I A E F E R K E Y A
70. GAAAGATATTTTGAATATTAGAAAATATTCAAGGATCAATAGCAGAATTTGAAAGAAAAGAATATGCA
D F N K D W E E L I K Y I N E Q K K K L K I C
139. GATTTTAAATAAAGATTGGGAAGAATTAATTAATTAATTAATGAACAAAAAAAAAAATTAATAATTTGT
Y D R N L L E I H L N S D A D I S G F Y R K C
208. TATGATAGAATTTATTAGAAATTCATTTAAATAGTGATGCAGATATATCAGGATTTTATAGAAAATGT
N A N P K C L N Y I S P Q D K K L T E L K D D
277. AATGCAAAATCCAAAATGTTTAAATTAATTTAGTCCACAAGATAAAAAATTAACAGAATTAAGAGATGAT
T E T S C E G R N C G K K V K A A K G K T G V
346. ACAGAAACAAGTTGTGAAGGTAGAAATTTGGGAAAAAAGTAAAAGCAGCAAAAAGGTAAAACAGGTGTA
K T P Q L N E K G S V M K T L E T Q K S Q G Q
415. AAAACACCACAATTAATGAAAAGGATCAGTAATGAAAACCTTAGAAAACACAAAAAAGTCAAGGACAA
G E N H V D G K E P R Q E G V I S Q D H P H V
484. GGTGAAAATCATGTAGATGGAAAAGAACCCTAGACAAGAACAAAGTTATAAGTCAAGATCATCCACATGTT
I S L R P S V E P K S D G S E P K L D H H S N
553. ATAAGTTTAAAGACCAAGGTAGAACCCTAAAAGTATGGAAGTGAACCTAAATTAGATCATCATAGTAAT
P H I P I D N P T Q R L G I A P Q P T H R A L
622. CCACATATCCAATAGATAATCCAACACAAGATTAGGAATAGCACCACAACCTACACATAGGCATTA
D S N P S D S S L Q N S S E G D S P S I G T S
691. GATTCAAATCCAAGTATAGTATTTACAAAATCAAGTGAAGGTGATAGTCCAAGTATAGGAACAAGT
Q G K T P E T V A S Q R D T R N S Q T L N D N
760. CAAGGTAAAACCCAGAACAGTAGCAAGTCAAAGAGATACAAGAAATAGTCAAACCTTAAATGATAAT
A H G K Q A V G S Q T Y E E H T S V D K D A V
829. GCACATGGAAAACAAGCAGTTGGAAGTCAAACATATGAAGAACATACTTCAGTAGATAAAGATGCAGTA
V A S A T E N R D V G T S I S G N P G H R N P
898. GTAGCTAGTGCAACAGAAAATAGAGATGTTGGTACAAGTATAAGTGGAAATCCAGGACATAGAAATCCA
P P I V T D G A V D G S I S L P S V G A T G I
967. CCACCAATAGTAACAGATGGTGCAGTAGATGGTATATCATTACCAAGTGTGGAGCAACTGGTATA
K G T T E L S G H A I Y S V E C T T G S A L P
1036. AAAGGTACTACAGAATTAAGGATGCAATATATTAGTGAATGTACAACAGGATCAGCATTACCT
G E V D T T K A A G N S P T D S K A A D E V L
1105. GGTGAAGTAGATACAACAAAAGCAGCTGGAAATAGTCCAACAGATAGTAAAGCAGCAGATGAAGTATTA
G V E A K Q G D K V P C S E N P C N N D S H Q V
1174. GGTGTAGAAGCAAAAACAAGTAAAGTACCATGTAGTGAAAATCCTTGTAAATATGATAGTCATCAAGTT
F S V G T S C S E A L S N C Q K I Q G N R D S
1243. TTTAGTGTAGGTACAAGTTGTAGTGAAGCTTTAAGTAATTGTCAAAAAATCAAGGTAATAGAGATAGT
S A S V S N S A E L Q M D N S T Q S K P H T E
1312. AGTGCAAGTGTAGTAAATAGTGCAGAATTACAAAATGGATAATAGTACACAAAAGTAAACCACATACAGAA
Q E A S D Q G N E L Q K E K T R T D R E S N Q
1381. CAAGAAGCTTCAGATCAAGGTAATGAATTACAAAAAGAAAAACAAGAACAGATAGAGAAAGTAAATCAA
E V H S G K E H R S N M Q Q S Q T Q G G H E G
1450. GAAGTACATCTGAAAAAGAACATAGAAGTAAATGCAACAATCACAAAACAAGGTGGACATGAAGGA
S T E G L H H V N H E T S E G G K O Y L Q D K
1519. TCAACTGAAGGATTACATCATGTAATCATGAAACATCAGAAGGTGGAAAAACAATATTACAAGATAAA
H P Q P T T C V P T S T I N D G E T L V S S Q
1588. CATCCTCAACCTACAACATGTGTTCCAACAAGTACTATAAATGATGGTGAACATTAGTATCTAGTCAA
S N R S G A G A T G E A V T T G S G N V L D I
1657. AGTAATAGAAGTGGTGCTGGTCAACTGGTGAAGCAGTAACAACAGGTTCTGGAATGTATTAGATATT
F N R L F S N V P Y V D K E Y I M M A L V P L
1726. TTTAATAGATTTTCAAATGTACCATATGTCGACAAAAGAATATATTATGATGGCATTAGTACCATTA
A I I L L L T F L I K F T P L G G T F F T K K K
1795. GCTATTATATTGTTAATCCTTTTAAATAAAATTTACACATTAGGAACATTTTTACAAAAA
K K E Q K K M N E K L Q R V L S E Y P A Q M N
1864. AAGAAAAGCAAAAAAATGAATGAAAATTAACAAAGAGTATTATCAGAATATCCAGCAAAATGAAT
E R N I P F S Y S P F A Y S T Q
1903. GAAAGAAATATTCCTTTTAGTTATAGTCCATTTGCTTATCAACACAACTAGG
```


PVX_050690

1. **GGTACC**TGCCAGAAAGTGTAACCTTTAAATGAAATATTTGCTAGAACAAATATTAATGAAGTAGATAAA
 K R Y D S A F S E L L R H I N H G H V F F N Y
 70. AAAAGATATGATAGTGCTTTTAGTGAATTATTAAGACATATTAATCATGGACATGATTTTTTAATTAT
 N K E G C W Y I S Y I L H K E V E E I L G Q Y
 139. AATAAAGAAAGGATGTTGGTATATTAGTTATATATTACATAAAGAAGTTGAAGAAATATTAGGACAATAT
 Y N S Y A Y D L L K Q F V F K F N E N R S I R
 208. TATAATAGTTATGCATATGATTTATTAACAATTTGTTTTAAATTTAATGAAAATAGAAGTATAAGA
 S D I C K K D Y V Y I N S D T Y K I M N G L Y
 277. TCAGATATATGTAAGAAAGATTATGTATATTAATAGTACTTATAAAATTAATGAATGGATTATAT
 N L Y D E Y T K Y K P I H D N T I P K N C C F
 346. AATTTATATGATGAATATACAAAATATAACCTATTCATGATAATACAATACAAAAAATTTGTTGTTTT
 L Y E N I K H F D T E I R K T I L K Y K I Y E
 415. TTATATGAAAATATTAACATTTTGATACAGAAATTAGAAAAACAATATTAATATAAAATATATGAA
 C R E Y P Y E V G K L N L Y T P P E P E K T I
 484. TGTAGAGAATATCCATATGAAGTTGGAAAATTAATTTATATACACCACCAGAACCAGAAAAACAATT
 A P V P V E Q Q A A P N V L Q N S H H E V T H
 553. GCACCAGTACCAGTAGAACACAACAACCAACCAATGTATTACAAAATTCATCATGAAGTAAACACAT
 H P V T A V D K V R K V E A E Q E Q G T A H D
 622. CATCCAGTAAACAGCAGTTGATAAAGTTAGAAAAGTAGAAGCTGAACAAGAACAGGTAAGTGCACATGAT
 Q E I A R D Y V N S P E H G R V F K P E G V H
 691. CAAGAAATAGCAAGAGATTATGTTAATAGTCCAGAACATGGAAGAGTTTTAAACCTGAAGGTTCAT
 N A E R S R E H G I S H G Y R S T Y N H R G E
 760. AATGCAGAAAGATCAAGAGAACATGGTATAAGTATGATGATATAGAAGTACTTATAATCATAGAGGTGAA
 E K T F R P G L S P Y P Q A F A T H D S S V K
 829. GAAAAAAGTTTAGACCAAGGATTAAGTCCATATCCACAAGCTTTGCTACACATGATAGTGTAAAA
 Q E L T D V S S F S Q K S E P Q K E D E G F M
 898. CAAGAATTAACAGATGATCAAGTTTTAGTCAAAAAAGTGAACCACAAAAAGAGATGAAGGTTTTATG
 A N M R N T I T G V L G E V D P V P V V G V S
 967. GCAAATATAGAAAATACAATTAAGTGTATAGGTGAAGTTGACCAAGTTCCAGTAGTTGGAGTTAGT
 G G M G A L F L L F R Y T P V G A F F R G G R
 1036. GGTGGAATGGGAGCATTATTTTATTTAGATATACACCTGTTGGAGCATTTTTTAGAGGTGGAAGA
 G R V H R I P R S F N G P F P G G F P G F E E
 1105. GGAAGATTTCATAGAATCCAGAAAGTTTTAATGGACATTTCTGGTGGATTTCCAGGATTTGAAGAA
 Y E S G Y I G Y G P M N P L A E
 1174. TATGAATCAGGATATATGGATATGGTCCAATGAATCCATTAGCAGAA**CCTAGG**

PVX_068690

GGTACC

ATGAGTTTTAGAAATAGATGGAGTTATAATTATTGGCAACAATATGAAGGAGCAAGTTGTTATAATAATTATAGT
 ACATATAAAAAGAGAAATGAAGAAAAATAGATAATTTATATAGAATAACAAATGGAAATTTTTATACACAATGG
 CATCAATTAATGAATATATTAAGAAATTAATGAATTAATAATTTGATAGAAAATAAAGTACATTAGAT
 TTATTAAGAGATGATAATATTAAGATTTTCAACATTAATGTAGTAATAGATTATCATGTAGAACAAAACCAAGT
 TCATTAGTTAATAATCATGATAGTTTACAACCAGGAAAAATGCAACATGTAAGGAGATTTCATGTCCACAAAAG
 AAAACAAGAACAAAAAGTCCAGTTGCAAAATTAACATCATTACCACATACAGGTAGTTCAAATGCTAAAAGTTCA
 TTAATCCAAAACAATAATCCAGTACAAGAACATCATGAAGAAAAGGAGTGAACAACCATCAATTAGTTCA
 CAAGCTCATCAAGAACAAAACATAGAGGTAGTTCAAGTCAACAGAGGTTGGAAGTCCAGAATCATTAAAAGTA
 CATAATACAGCAAAACCAAGTTAGAACAAGTTCAGCACAAAAGTCTTCAATACCAGTCCAGTTACAACAACA
 GAAGTAATAACACATCAATTAAGTCAATCACCAGGAAGTAAAGCATCAGAAGAAAGTGTAGTCAATCACCAGTT
 CAAGAAATTTGATTTAAAAGGTAGTAATCATCAATCAGGAACAAGTGCAGGTCAAACAAGTGTAGATAATTTACCA
 AATTTACAATCAATAAATGGAATTACAGATGCTAATCAAGATCCAATAATCAAATATTTAGAGTTGAAATAGAA
 TATGTTAGTGTAGAAAATCCACCAGGAACATCAACAGGTGATGTAAGTTCAAGTTCAACAGATACAGCATGTGCT
 GATACAGATAAAAACAATATACATCATGCAACAACATGTAATAAACTTATAGTGAATACCAACAATCCAGAA
 ACATCAGGTGATGAAGCTACACCAGATGAATTAGTTAGAGGAGAAGGTGCAGTTGTAGCTGATGTTAGAAGTGAA
 ACAAATGGAACAGAAGATGCAGAAAATGGTCCATCAGTTAGAGAAAAACAGATGTTATGTTATTTAGTGATAAT
 GGAGTAGATCAATAATCATTTTGTGTTAGAAGTGTGAAAATCCAACACATGAAAATGGAATACCATGTATTGCA
 GAAAAAGTACAGAAATGATGCTAATAATGAAAATTTTTAGGTACATTAAGAGAATTTTTCTATGAAATACAA
 AATAATCCACATATAATTAACAAGTATACCAATTTGTTATTTGTTAACATTATTATTTAATAATACAA
 CCATTATGGAGAATATTAATAAAAAGAAAAAGAAAGAACCAAGTTGATATGAATGAAGAATTACATTCAGTATTA
 CAAGAACCATTAAATATGGATGATGAAGATCAATACCTTTTAGTTATGGAGCATTGGAATATAGTACATTTGAT
 GAAAATACTTAT

CCTAGG

PVX_077695

GGTACC

ATGGAAAAAGCATTATTAAGTTTACAATCAAAAAGAAATGCAGTTATAGCAATAGAATATAAAAAATTAGATGAT
 TTAGATATTAAGATTATTCAGATAATTATTGTGAAAAAGATTTAGGTAGTCCAAAAGAAAAGATAAAGAATTA
 TGTAAATAAAGTATCAAAACATTTAAAAAGATTAAAGTGGTATATCAAAATAATGATGATAGAAAACATGGATGTTTT
 TATTTTCAATATTGGTTTTATGATCAAAATAAGTAAAAAATATTAGCTGATGATAAAAATTAATAATAACAAGTA
 TCAGATAAAATTGTTTTGATTAGTGTGCAACAACAATTTAAAAAGTCCAAATTTAGAACCATGTAGATGTTATGAA
 AGTGGTACACCATCAATATGGAAGAAGAAAAAGATTTACATGATTATTTAAAAATTATAAAGATATAAATGT
 ACAAATTCAGATAAAAACAACATGTGAAAAATATGTTAGATATGTAACATATATAGATAAAATGTTTCAAATAAA
 GAAGATACATGTTGTTATGATGAAGATGTAGAAAAGTTTTGTGAACATTATATAAATTGTAATAATAAATATAGA
 CCAGATGGATTATTAACAAAATTAACAACAGAAATAAAAGCATTAGATGCAAAAAGTTAAAGAAGTACCAAAGCT
 GTTGGAGGTGAAGATGCTCCAGGTGCAGTTGTAGAAAATAAAGCAGCTGGAAGTGTGGTCCAGGATCAGAAAAG
 AAAGCACCAGGTATAGCTGGAGCAGAAGAAGCTAAACAATTACCTGCAAAACAGTAGCAGCTAAACCAGTTGGT
 GAAGATCCACCAGCAGCTGAACATTAGCAGCTAAACCAGCAGCTGCAAAACAGTAGCAGCAGAAAAGTGGAGGA
 TTACCACCAGAAGTAGCTAAACCAACAGCAACAGTTAGTGGAGGTACAGAAAAGTGGAGGAACAGAAAAGTGGAGGT
 GGAAAACAGCAGAAGTAAACCAAGAAAGTTGTAACAAGAAAAGTGGACCAGCTGAACAAGAAGCACCACCA
 CCAACCAGCTCCAAGAGAAAAGTTCAACAACAACAGCACCATTAGAACCAAAAAGAAAAGTTAGATGAAGAA
 GAAGTTGCTGAAGTAAACAGAAGATGGTGTGATGAAGTAGATGAAGTTGCAGAAGAAGGTGAACCAGGACAATTA
 GAAGGAGAAGCAGCAGTTATATTAACAAGATACAGCTACATTTAGTGCACCATCATTAGAAGATTGAGGTGCAGCA
 GTTCATGCTGCACCATATTATACACCAGAATTAGCTGGTAATGGAGCACCATTAAACAAATAGTGAAGCACCATCA
 ACATTAAGAACAACACATGAAGAATTAGATAGTAATTTCTTTAGAAAATGTAATTATGGCTATAGCAGTTTTAGGA
 ACAATATGTTTCTTATTTTATTATAATAGAAGTTCAAGATTAGAACCAAAATAGTAGAAAAGAAAAGAAAAGAAA
 GGAAAATATTGCAACATAATTATATGAAGAATATGAAAAGAATTAGAAAATGTATGGAAGTGAAGAAACATTT
 ATAGATTGAAAACAGATAGATTATTTAAATTATCATCCAGATCAAGATAGTTATTAT

CCTAGG

PVX_081850

GGTACC

ATGGCACAAAAATAGTAGATCAAGCATTATCAGTATTAAGAAGGAAAATATACAGTAAGAGCAGCAACTAAA
 TTAATATTCTTTATGATATTTTTGATACAGATTTTGATAATTTTTATAAAATTAATTTGTGTAATGGATGTGAT
 AAAAATAAATATTTATTTGATAGTTTAAAGAAAACAATAAAACAATAATTTGAAGAATGGGAAAGTTTATTAGAT
 TTCTTTAGATGTGAAACAGCAGGAGATGAAAATACATGTTGTTTAAATTTTATATATTGGATTTATGGTAAAATA
 AAAGATAGTAATTTAAATGTTGATTATATAAAAGAAATTTATAATAATTTAGATGAATTTGTAACAAAATGTT
 TTTGGTTATGATGCAGAAAACAGAAAATTTTTCAAAAATATGTTAAAGCCTATGATAAGAAAAGTTTTAAAA
 AGAAAAGAAAGAAATATATGATTTTGTCAATTTTATGAAAGAGTAAAAAGTAAATTTGGATGCTGTTCAATCAAAA
 AGAAAAGTAAATGTTGATTATATTAGTTATATATTTAAATGTATGAAGAAATGAGAAGAGATTGTAGTTCAATT
 AAATCAGAATGGTATGAAGATGAAATGAAAATTTTATTGAAATGTTAAAGAAAATAATGAATTAACATTATTA
 GAAAGTAAATGTGGAGATATTACAAAAGTTTAAATTTAGATGATAATTTGAAGCATTATGTCCATCAAATAAT
 GAAAGTGCAGCTAGTAAGAAAAGGACAAATATTAAAAAGTCCACAAGAAGAAGAAAATTTAATTTATCAGCTGTT
 CCAAAAGTAAATATGCAAAAGTGTGTTTCAATCAATTACCTAGTAAGAAAATATGTGAAGAAATGGATAAAAAAT
 AATAATCCAGATTTAAATATTACAGATTTGTAATGTATTTAAAGATCAAATTTGGTAAATCATTATGTGCACATACA
 ATTAAAAATTTTAAAGAAAATAAATAAATTTGAAGATAGAGAACAACATAATGATTATTGTTTACATTTTATGTAT
 TGGTTATATGGAAAAATTTGGTGAATAATATAAAATAAAAGTTCAAATATTTAGAAAGTCCAGAAAATAAGTAAA
 TTTGTTCAATTTAATTTGATCATTAAATAATAAAGTTCAAATATTTATTGTTATTATAATAGTGAATAAATTTA
 GAAGAATGGAAGAATAAATTTGATTTAATAGATTATTTAAAAATACATAAATAATTTGATAATACAAAATCATGT
 GATGATAATGCATGTGCTAAAATTTGGAATATTTTAGTAAATATATCAAATTTATATAAAAGACATAAAAGACAA
 TGTGTACATATTTTATTTATGGAGATCATTTAATAATTTGACACATTATTTAAATGTGATGATAAATATAGT
 CCAGATTCAAATGTTAACAAGATTTAAATGTCCAGTTAATGAAAATGAAAAGATATTAATGAAGAAGATGAAGTT
 GTAGTTTTGATCAAAATGTAATATTACAAAGTTTAGATTCATTAAAAAGATTTAATCAAAGTAAAAATATATGT
 GATGGAATTTAGTGTGATACATTTAGTAAATTTGCATTTTAGCTTTTCAATTTTAGGTGTTTTAGTAAACATTT
 TTCGATTTTATAAATTTACACATTAGGAATATGGTTAAATAGAAAAGTTTAAAGAAAATAAAGCTAGATAT
 GATTATTATGAAGAATCACCACAACAATTTAGAAAATAATAGTAAACCTGTTCAAAGAAAATATGCAAAATGGA
 AGAATTAGAATAGCTTATCAATCA

CCTAGG

PVX_093715

```

1.  M S H E P D Y E I F Q N L T E Y R K N E G
   GGTACC ATGAGTCATGAACCGAGATTAGAAATTTTCAAATTTGACAGAATATAGAAAAATGAAGGT
   L I D L K E Y T A E T S F C G D P K S P L K S
70.  TTAATAGATTTAAAGAAATATACAGCAGAAACAAGTTTTTGTGGTGATCCAAAAAGTCTTTAAAAAGT
   N S G A V D I C K R F V I L F K R L N P S E G
139. AATAGTGGTGCAGTAGATATATGTAAAAGATTTGTTATATTTTAAAAAGATTAATCCAAGTGAAGGT
   T T A E R S D G H P A S S I S S A T P K H A A
208. ACAACAGCTGAAAGAAGTGATGGACATCCAGCAAGTAGTATAAGTAGTGCAACACCAAAACATGCAGCA
   F L N Y W L S T Q L R D K N I P E N L R P L L
277. TTTTGAATTATTGGTTAAGTACACAATTAAGAGATAAGAATATTCCAGAAAAATTAAGACCATTATTA
   Y L H L K T H Y D K F K G K Y K L T D Q F H P
346. TATTTACATTTAAAAACACATTATGATAAATTTAAAGGAAATATAAATTAACAGATCAATTTTCATCCA
   I E S A H L E K L D I L H E L Y R Q Y Y E L K
415. ATAGAAAGTGCACATTTAGAAAAATTTAGATATATTACATGAATTATATAGACAAATTTATGAATAAAA
   N N K L G G G E K K E G D R D E G C L N F L Q
484. AATAATAAATTAGTGGTGGTGAAGAAAAAGAGGGGATAGAGATGAAGGATGTTTAAATTTTTTACAA
   N C K D N Y N K G L E K C L P Q A D N Q F C I
553. AATTTGAAAGATAATTATAAAGGATTAGAAAAATGTTTACCACAAGCAGATAATCAATTTTGTATA
   A L N R F R N L Y E E D K A S F S A A C H N K
622. GCTTTAAATAGATTTAGAAAAATTTATATGAAGAAGATAAAGCAAGTTTTAGTGCAGCATGTCAATAAAA
   T L P S L P E I A S L R L P K A V T G G T P K
691. ACATTTACCAAGTTTACCAGAAATAGCAAGTTTAAAGATTACCAAAAGCAGTAACAGGTGGAACACCAAAA
   I G G D L V Q A E Q S S S T H Q L P K I V D D
760. ATTTGGTGGTGAATTTAGTACAAGCAGAAACAAGTTC AACACATCAATTTACCAAAATAGTAGATGAT
   V Y P N L Y K L L L L Q Y T S L F E Y D E E K
829. GTATATCCAAATTTATATAAATTTATTTATTTACAATATACAAGTTTTATTGAAATAGTAGAAGAAAA
   I K N N L M E V L H E F L K Y N L N R G N S
898. ATTAATAAATTTAATGGAAGTTTTACATGAATTTTTAAAAATTTATAATTTAAATAGAGGAATAGT
   S V D L F I K E F F Y D Y Y K N K K E E Y E K
967. TCAGTAGATTTATTTTAAAGAAATTTTCTATGATTATTATAAAAAATAAAAAAGAAATATGAAAAA
   I Y A E C S N K K P L T S Y C K L Y Y R C N D
1036. ATATATGCAAGAAATGATGATAAATAAACAATTAACAAGTTATTGTAATATATTATAGATGTAATGAT
   Q L R D D L F S I K E D V A K Y L G D K A K S
1105. CAATTAAGAGATGATTTTCTATAAAGAAGATGTAGCTAAATTTTGGGTGATAAAGCAAAAAAGT
   Y Q Q A L S G N P P T E T E M H K I G R S S L
1174. TATCAACAAGCTTTAAGTGGAAATCCACCAACAGAAACAGAAATGCATAAAATGGAAGAAGTAGTTTA
   I S L H R F A I V S T V I G V F F F L F S I Y
1243. ATATCATTACATAGATTTGCTATAGTTAGTACAGTAATTTGGAGTATTTTTTTTTTTTCAATATAT
   E F T P L G C W F R R K F N K T K R V A Y N F
1312. GAATTTACACATTAGGATGTTGGTTTTAGAAAGAAAAATTTAATAAACAAGAGTAGCTTATAATTTT
   Y M Q Q I R Y I M E M N S P F E D V R L D S R
1381. TATATGCAACAATTAGATATATTATGGAATGAATAGTCCATTTGAAGATGTTAGATTAGATAGTAGA
   E A N I G Y Q S T
1450. GAAGCAAAATTTGGATATCAAAGTACA CCTAGG

```

PVX_096925

GGTACC

```

ATGAAAATAATAGATCATTTAATAGAAAAATAAGAATAGATGCAATACCTACTTGTCTAGAAATATATTTAGT
GGAAAATGTGATCATCCAAGTTTTTATTATTTTGTATTAGCACAAAGATATTTAAGTGATTTAATAAGAAA
GAAAGTACAATAAATGTTGCACATGCTTGTAAATTTTAAATTTTGGATATATAAATTTGTATGGAATGGAGTT
ATGTATAATAAAAATAGAGTACATTTTATGAAGAATAAAAGATGGTTCAGATAATGAAGATATTTGTA AAAAT
TATATGGAAGATATAGATGAAAATACTTATGAATATATTTTAAATTTGATAGATTTATATACAAATTTAAGTAAT
TTATCAAAACACATAATGGAATAAATGTCCAACAATTTAAACATGTTTTGATAGTTATATGCAATGTAAAGAT
ACATGTAAAGGTGATGAAAATAAATAATTTTGTAAATGAAATTTTGAAGAAAGATATAATGTAGCAATG
AAAAGTGTAAATAATGTTGTTGATGAACATAAATATTTACCAAGTTTTCAAGATTCACCAATTTGTTCCAGTATCA
GTTATACCAATAATTATAACAAGTGTATTTCATTAATTTAATAATTAGTTGTAATTTACACCATTAGGAAAA
TGGATATGTCCAAGATCAAAAAGAGCTAAAATGGAACAAAGAAAAATAAATCATGAAATGAATAAATCACAACAT
ACTCCTGGTTATCAAGATATGCTTATTAGTTAGTTATCAAAGTCCAAATCCTTCT

```

CCTAGG

PVX_097525

GGTACC

ATGGCAGCAAGTACAGGAAATAGTTGGGATGAAGCATTATTACATTTACCAGCATATCAAAAATATAAAGAATTT
 GATTCAGTAGATATATCAAAAAGAAACAACAAGTCAATGTAATAATTTAGGATCAAAAAGAGAAAGTGATAAAACA
 TTATGTAAGAAAATAGCACAAAATTTAAGAAAATTATCAACATTACAGGAGATGAATTAATAAATGGTTGTTAT
 TATTTTCAACATTGGTTTTATGAACAAAATAGCTAAAACATATTATGATGGAAAAATAAAAAATAAATAATATCAT
 GTAGGTGAAACATTATTTGATATAAATGCATTATTTATTTCAACATATCCAAAATTAGAACCATGTAGATGTTAT
 GTTAGTGGAAAACCAGAATATTGGGAAGAAGAAAATATTACATGATTATTTTAAAAATTATCAAGATATAAAA
 TGTAGTAATAGTTCAAAAGATAGATGTGAAAAATATATACAATATGTAACATATATTAATAGATTATTTCCAGCT
 AAAGAAGATACATGTTGTGATGAAGGAGAATTAATTGAAGATTTTGTAAACCATATTTTAATTGTGAAAAATAA
 TTTTACCAGAAAAATTTGTAACAATTAATAAACAGAAATTACAAAGTTTAGGAACAAAAGCTGAAGCACCAGA
 GAAGGTGGAACAGTTGGAGGTGTTGTAGATGCTAAAGCAAAACCAGGTGCAGCTGAATCAGAAGGAGCAGAAAGT
 GGTATACAAAACCAGCAGCTGCAAAAACCAGCTCCAGCAAAACCAGTAGCTACATCACCAGCACCAGTGAAGA
 GCACCAGCAAAAACCAGTTGCTGCAAAAACCAGCTGCAACAAAACCAGCTACAACAAAACCAGCAAAAAGAAATCA
 GAAGGAGAAGATCCAGCTGGTGCAAAACCAGTAGCAGCTAAACCAGCTCCAGGAGAAGCTGTTCCAGCTAAACCT
 GTAGCTGCAAAAACCAGTTGCAACAGAATCAGCTGCACCAGAAAAGAGCACCAGAAGCACCAGAACCAAAAAGAAGT
 CAACCAGAAAATACCAGCTAGAGAAGTACCAGAACAAGCTGTTGTAGAAAACAGCAGAAAACATTACAACATGAAGAA
 TCATTAAGTCCACCACCAATGGAAGGTTGAGAACCAAGTGTCAAGAAGTAAGTTCATATAATTGAGAATTAGCT
 AGTAATGGAGTCCATTAACAATAGCAGATAGTCCAAATACATTAGGTACAACAATGAAGAATTAGATTCAAAT
 TTCTTTAGTAATATAATAATGGCTGTTGCAGTATTAGGAACAATATTTTCTTATTTATTATAATAGATCAGCA
 AGATTAGAAGTAGTAGTAGAAGAAAAAACAAGAAAGGAAAAATATTCGAACATAATTATTATGAAGAATAT
 GAAAAAGAATTACCAATGTATGATAGTGAAGAAACATTTGTAGATTCAGAAATGGATAGATTATTTAAATAT
 CATCCAGATCAAGATAGTTATTAT

CCTAGG

PVX_101560

1. M E E P C S E D L P S Q S F Y K S L G E Y
 GGTACCATGGAAGAACCATGTAGTGAAGATTTACCAAGTCAAAGTTTTATAAATCATTAGGTGAATAT
 M Y S L D E Y D G Y C V L G N S N Y Q H N E S
 70. ATGTATAGTATTAGATGAATATGATCAATATTGTGATTAGGAAATAGTAATATCAACATAATGAATCA
 V K S L C R H L L K N L N H N S Q I N V N E S
 139. GTAAAAAGTTTATGTAGACATTTATTAATAAATTTGAATCATAATAGTCAAATAAATGTAATGAATCT
 V P C N H Y K L L S Y W L Y N Q I E K V F T P
 208. GTACCATGTAATCATTATAAATTTAAGTTATTGGTTATATAATCAAATAGAAAAAGTTTTACACCA
 R F E E I E R K N I Y K E L T S I W K D F V S
 277. AGATTTGAAGAAATAGAAAAGAAAAAATATTTATAAAGAATTAACAAGTATATGGAAAGATTTTGTAGT
 S P F R R N L N N C Q P E P V T V F D D D D D
 346. AGTCCTTTTAGAAGAAATTAATAAATTTGTCAACCAGAACCAGTAACAGTATTTGATGATGATGAT
 N N N W K V R K E F Y E Y C E D Y N T L K K S
 415. AATAAATTTGAAAGTTAGAAAAGAATTTATGAATATTGTGAAGATTATAACTTTAAAAAAAAGT
 C T H S F S T C G K Y Y D Y L E N K S D L Y N
 484. TGTACACATAGTTTTAGTACATGTGGTAAATATTATGATTATTTAGAAAATAAGAGTGATTTATATAAT
 Q F L T L N L N K P Q D K Y S S S Y E K Y K K
 553. CAATTCCTAACTTTAAATTTAAATAAACCAAGATAAATATTCAAGTAGTTATGAAAAATATAAAAA
 F D P R T L L D N L P C T F E M S P D G K L E
 622. TTTGATCCAAGAACATTTATAGATAATTTACCATGTACATTTGAAATGAGTCCAGATGAAAAATTAGAA
 Y V K T R T T K L Y Q P R V Q P V A A S P Y R
 691. TATGTAAAAACAAGAACAACAAAATTTATCAACCTAGAGTACAACCAGTAGCAGCAAGTCCATATAGA
 V N Q E Q K I S S Q A S S H P E V S R Q K A S
 760. GTAATCAAGAACAATAAATTTCAAGTCAAGCAAGTATGATCCAGAAAGTTCAAGACAATAAAGCTTCA
 R L K A S R L K A P R L K A P R L E A P R C A
 829. AGATTTAAAGGCAAGTAGATTAAGAAGCAACAGATTTAAAGGCTCCTAGATTAGAAGCTCCAAGACAAGCA
 A Q Y Q A P P Y Q T A P Y E A A L H K A A P R
 898. GCACAATATCAAGCTCCACCATATCAACAGCACCATATGAAGCAGCATTACATAAAGCTGCACCAAGA
 K A D L H E E D P H E E N Q Y K A Y P Y Q A S
 967. AAAGCAGATTTACATGAAGAAGATCCTCATGAAGAAAATCAATATAAAGCTTATCCTTATCAAGCTTCA
 L Y R T T P H Q E A S Y G E Y L E P A G D D L
 1036. TTATAGAAACAACCCACATCAAGAAGCAAGTTATCAAGAATATTTAGAACCCTGCTGGTATGATTTA
 E T S T S P V D T E R A T I N L P L I A L S V
 1105. GAAACAAGTACAAGTCCAGTCGACACAGAAAAGCAACTATAAATTTACCTTTAATAGCATTAAAGTGA
 I L L L L T I S F T I D F T S F G S W M M R R
 1174. ATATTATTATTATAACAATATCCTTTACAATAGATTTTACAAGTTTTGGAAGTTGGATGATGAGAAGA
 A R R R K R S T P R F N E Y Y R E P S Y N Y D
 1243. GCTAGAAGAAAAAGAAGTACACCTAGATTTAATGAATATTATAGAGAACCCTAGTTATAATTATGAT
 S E Y T D S Y D L N S T R N I P Y Y P A
 1312. AGTGAATACAGATTCATATGATTTAAATAGTACAAGAAATATTCATATTATCCAGCACTAGG

PVX_107235

GGTACC

ATGGCATTAAAGTTCTGAAAAGAATTTGGGTTGAAGTATTACAAAATTTACCTAGTTATAAAGAATATGAAAAATTA
 GATAAAGTTGATATTA AAAATGAAAATAGTTCCACATTGTAATGATTTAGGAAGTACAGATGAAGGTGATAAAACA
 TTATGTAAGAAAATAGTTCAAATTTAAATCAATTAAGTGCATTAAAAGATGATGAAAATTTAGATAATTCATGT
 TATTATTTTCAACATTGGTTTTTCGATAATATAGCTAAAAAATATTATGATGGAGATGAAAGAGGTAATAATTAT
 CCAGTTGCAGAAAATTTGATAATATTGTTAGTGAATACACCAGTAAGTTCAA AAAATGGAACCATGTAAATGT
 TATGAATCAGGATATCCAGATGTATGGAAAGAAGAAAACATTTACATGATTATTTTGA AAAATCATAAAGATATA
 AAATGTAATGATAGTATAAATCAAATGTGAAAATATATACAATATGTTACATATATTAATACATTATTTCAA
 GAAAAAGTAGATAAATGTTGTGATGGAGAAGATTTAGATGAATATGGTTTTTGTGAACCATATTTTAAATGTGAA
 AATAAATATTACCACAAGATTTATTAGCACAAATTAAGAAAGAATTACAAGAATTAGGAAAGAAAGCAGAAGCT
 CCAAGAGATGGAGGTACAGGAGCAGTTGAAGCTGGTAAAGCACCAGGAAGTGGTGTGAAGAAAGAGAAAAGAAA
 ACAAAGAAGAAGTAAACAGCAGAAGCTACAGGAAAAGAATCAAAGAAAATTTGGTTGCAGGTGAAGTACCAAAA
 GAAAAAGCAGCTGATAGTTTAGCTCAATCAGCATTAGAAAAACAATCCAACACAACCCAGCTGTTCAAGGAAGT
 GTAGGTTTAAACCAGGAGAAAGTGAATCAAGAGAAGAACCAGCATCAGCTAAATGGTTGGTAAAAAACCCCA
 GAAGAAAATCCAATGACCCAGAAAGTGGAGGTGCTAAACCAGCACCATCAGAAGGAGCACCAGCTAAACCAGTT
 GCTACAAAACCACCAGCAGCTGGTCCAGTTGCAGTAGAAAAGTGAACAGTAACACCAGCAATGGCTGAATCAGGA
 AAAGCTAAATGAGAGAAAACAAACCTGCTCCAGCTAAACCAGTTGCAGCTAAACCAGTAGCTAGTAAACCAGAA
 ACAGAAAAGCAAAGAAATGTTGCTGAAAAGAAAGCAACAAAAGAAATTTAGTAGTGAAGAGAAGCAACTAAA
 GAAACTTTAGTAGAAGAAGAAGCACCAGAAGAAGTTGTAGATGAAACAACAAATACATTACAACCAGAAGAACCA
 TTAGGACCACCACCAATAGAAAGTGTGAAACAAGATGTTTATGTAATAGTTTACATAATACAGAACCAGCTTCA
 AATGCATTACCATTAAACAATTACAGATACACCAAATACATTAGGAACAGCACATGAAGGTTTAGATAGTAATTT
 TTTAGAAATATAAATATGGCAGTTGCTGTATTAGGTAAAATATTTTCTTATTTTATTATAATAGAAGTTCAAGA
 TTAGAAAGTTCAATACGTA AAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAATATTGAAACATAATTATATGAAGAATATGAA
 AAAGAATTAGAAATGTATGGTTCAGAAGAAACATTTT TAGATTGAGAAACAGATAGATTATATTTAAATTCAT
 CCAGATCAAGATAGTTATTAT

CCTAGG

PVX_113230

1. M E K D P K Y K D L P S Q I Y Y D K L N E
 GGTACCATGGAAAAGATCCTAAATATAAAGATTTACCAAGTCAAATATATTATGATAAATTAATGAA
 D I I E E E D D E H E E N E E S Q E N V Y W E
 70. GATATTATAGAAGAAGATGATGAACATGAAGAAAATGAAGAATCACAAAGAAAATGTATTTGGGAA
 A I E G S Y E Q T P W V R D V F F K L E R N L
 139. GCAATAGAAGGATCATATGAACAAACCCATGGTTAGAGATGATTTTTTAAATTAGAAAGAAATTTA
 T E I N E S R G E D S L S K K H C Y D L N Y W
 208. ACAGAAAATAAATGAATCAAGAGGTGAAGATAGTTAAGTAAAAAACATTGTTATGATTTAAATTTGG
 L Y E Q V Y E N L N N N E N D E N F F K I I D
 277. TTATATGAACAAGTATATGAAAATTTAAATAAATGAAAATGATGAAAATTTTTTAAATATAGAT
 G L Q N A W T N I N N D K F P N A D N I C H P
 346. GGATTACAAAATGCATGGACAAATATTAATAATGATAAATTTCCAAATGCAGATAATATTTGTCAATCA
 D K T L V D M K Y L K D V K H L F D F I E D F
 415. GATAAAACATTAGTAGATATGAAATATTTAAAAGATGTA AACATTATTTGATTTTATTGAAGATTTT
 S T I K T A A I K D T N N A C Q K Y I D Y L K
 484. TCAACTATAAAAACAGCAGCTATAAAGATACAAATAATGCATGCAAAAATATATTGATTTTAAAG
 L K V P L Y Y E W N D V C T M E E E N I C T K
 553. TTAAGTACCATTATATTATGAATGGAATGATGTATGTACAATGGAAGAAGAAAATATTTGACTAAA
 Y I D D Y P K Y N P K N V L E N L S V V S L A
 622. TATATTGATGATTCCTAAATATAATCCAAAAATGATTTAGAAAATTTAAGTGTAGTTAGTTTAGCA
 L A S I F N D C Y Q N I I N L F T E A E K I E
 691. TTAGCAAGTATTTTCAATGATTTGTTATCAAATATTTAATTTGTTTACAGAAGCAGAAAAAATGAA
 P R T V L K H R D I T G P S E S N V V K I G G
 760. CCTAGAACAGTTTTAAAACATAGAGATATTACAGGACCAAGTAAAAGTAAATGATGATAAATTTGGAGGT
 R A L A E A I S D T S Q S G N M L I G I N A L
 829. AGAGCATTAGCTGAAGCTATAAGTATACAAGTCAAAGTGGAAATATGTTAATAGGTATAAATGCATTA
 A T S L F V D S V V K R F N S Y V F S L V A P
 898. GCTACAAGTTTATTTGTCGACAGTGTGTAAAAAGATTTAATAGTTATGTTTTAGTTTAGTAGCACCA
 V G L S L L G L L L F L Y V L Y K F T P I G K
 967. GTAGGATTAAGTTTATTAGGATTTATTTATATGATTTATATAAATTTACCCAATAGGAAAA
 S I S R T H K R V K N K F V R N K R D D F D D
 1036. AGTAAAGTAGAACACATAAAGAGTAAAAAATAAATTTGTTAGAAATAAAAGAGATGATTTTGATGAT
 D E D D D D D S D N S S D L K S S S S M E S
 1105. GATGAAGATGATGATGATGATGATGATGATAATAGTAGTGATTTAAAAAGTAGTAGTTCAATGGAATCT
 L L S N S
 1174. TTATTAAGTAATAGT CCTAGG

PVX_115475

M E E E D L D S K Y E N V P S Q I F Y K E
1. GGTACCATGGAAGAAGAGGATTTGGACTCGAAATATGAGAACGTGCCCTCACAGATATTTTACAAAGAA
L N A E L K D R V N T Q W E K L K D L I E E Q
70. CTGAATGCTGAATTGAAGGACAGGGTTAATACACAATGGGAAAAGTTAAAAGATTTAATAGAAGAACAA
P L L K D V C D K L E K N L K S L N A N P Q S
139. CCTTTACTTAAAGATGTTTGGCGACAAACTTGAAAAAATTTAAAATCCTTAAACGCTAATCCTCAGTCA
E H L S K K H C Y D I N Y W L F D N V H N K L
208. GAGATGTTAAGTAAGAAGCATTGTTATGATATAAAATTACTGGTTATTTGATAATGTACATAACAAGCTT
N I K E E D P L F Y N I I D S V H S V W R D I
277. AATATTAAGAGGAGGACCCTCTTTTTATAACATTATCGATAGTGTCCATAGTGTATGGAGAGATATA
N E S L P D K T H I C K P D S T L M D M P V L
346. AATGAGAGTTTGCCAGATAAGACTCATATATGTAACCAGATTCAACGTTAATGGACATGCCTGTTTTG
K E F K H L F D F I E N F A F F K A E A F K D
415. AAGGAATTTAAGCATTTGTTTGATTTTTATTGAAAACCTTGGCGTTTTTTAAAGCAGAAGCTTTTAAGGAT
T P K A C T K Y F K Y L E R S V Q I Y Y A R E
484. ACTCCCAAGGCATGCACGAAATATTTTAAATACCTTGAACGTAGTGTCCAAATATATTATGCAAGGGAG
I F C T N P E S N M C N R Y I D N Y K S Y N P
553. ATCTTTTGTACTAACCAGAAAAGTAATATGTGCAATAGATATATTGATAACTACAAATCTTATAATCCA
K N V R E E L N V S K L I M G L V W Y Q C Y R
622. AAAAATGTTAGAGAAGAATTAAACGTGTCTAAACTTATTATGGGTTTGGTTTGGTATCAATGTTACAGA
D V V S L F R A V K K Q P Y R L E V K F R T V
691. GATGTTGTAAGTTTATTTAGAGCTGTAAAAAACAGCCTTACCGTTTAGAAGTAAATTCAGAAGCTGTC
Q G D V G T T V V V P D A I K E F F R A V Y S
760. CAAGGGGATGTTGGAACAACCTGTAGTGGTTCCTGATGCGATAAAAAGAGTTCTTTTCGTGCAGTTTATTCT
V L K H I Y G I V Y F L I F L P V L F I L G P
829. GTCTTGAAACATATATATGGTATTGTTGTTTTTTGATATTTCTGCCCGTTCTTTTTATTTTGGGTCCA
Y V F F L L I Y K F T P L G R Q M L R A R A L
898. TATGTCTTTTTTTTATTAATATACAAGTTTACTCCACTCGGAAGACAAATGTTACGTGCCCGAGCACTA
L K K K L K T N I S Y E D I I L L N G S S E S
967. CTAAGAAAAAATTGAAAACCAACATTAGTTATGAGGACATCATATTGCTAAATGGAAGTTCCGAATCT
I F S G S S S D S S Y I V G Y Q A S S Q S S S
1036. ATTTTTAGTGGTAGTTCATCGGATAGCTCATATATTGTAGGATACCAAGCTTCTTCCAGAGTAGTTCA
G
1105. GGACCTAGG

Vektorkarte pARL1-3xHA

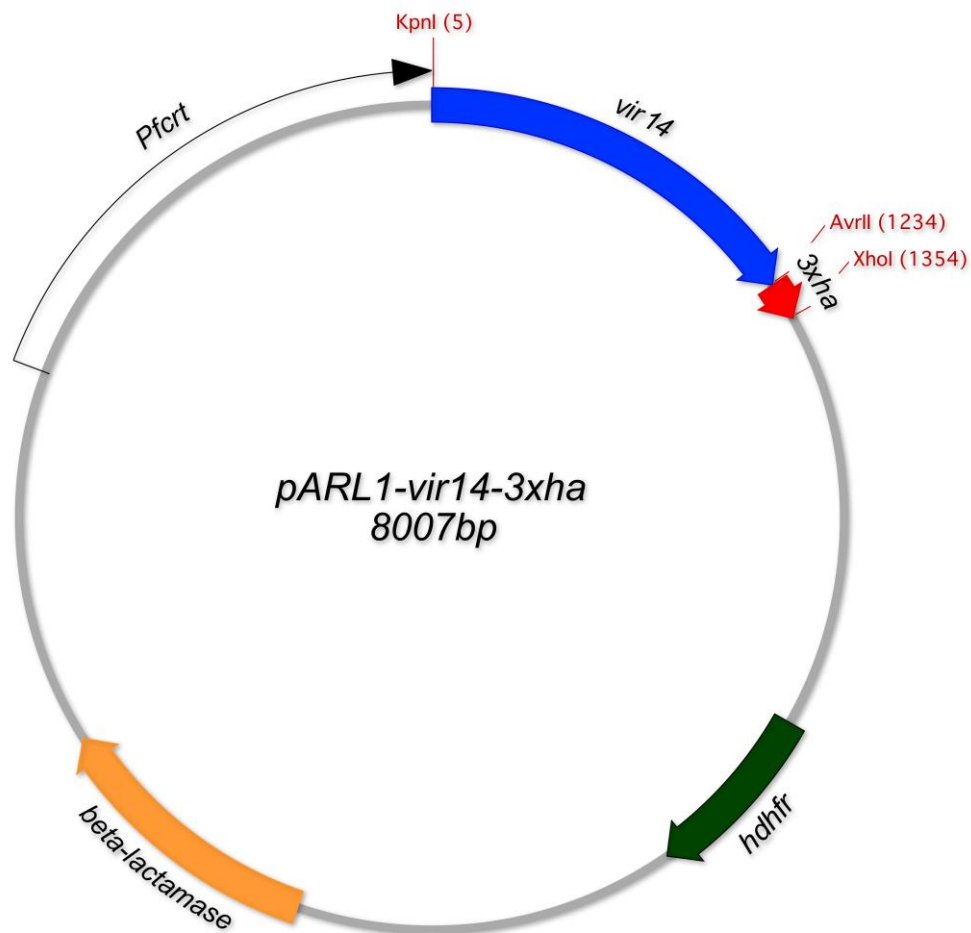


Abbildung A1: Vektorkarte des pARL1-3xHA-Vektors. Schematische Darstellung mit dem Beispielen *vir14*. Der Vektor enthält einen *Pfcrt*-Promotor, sowie die Gene für eine β -Laktamase und dem 3xHA-Tag.

Tabelle A1.1: Statische Bindungsexperimente von iE der 13 Transfektanten und 3D7-iE an CHO-GFP. iRBC/iE: infizierte Erythrozyten; nv: nicht verfügbar.

	3D7-iE	pARL_PVX_000020 ^{HA} -iE	pARL_PVX_050690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_060690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_068690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_077695 ^{HA} -iE	pARL_PVX_081850 ^{HA} -iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	nv
	0	0	0	0	0	0	nv
	1	0	0	0	0	0	nv
	0	0	0	0	0	0	nv
0	0	0	0	0	0	nv	

0	0	0	0	0	nv	0
1	0	0	0	0	nv	0
0	1	0	0	0	nv	0
0	0	0	0	0	nv	0
0	0	0	0	0	nv	0
0	0	0	0	0	nv	0
0	0	0	0	0	nv	0
0	0	1	0	0	nv	0
0	1	0	0	0	nv	0
0	0	0	0	0	nv	0
0	0	0	1	0	nv	0
0	0	0	0	0	nv	0
0	0	0	0	0	nv	0
1	0	0	0	nv	nv	0
0	0	0	0	nv	nv	0
0	1	0	0	nv	nv	0
0	0	0	0	nv	nv	0
0	0	0	0	nv	nv	0
0	2	0	0	nv	nv	0
0	0	0	2	nv	nv	0
0	0	0	0	nv	nv	0
1	0	0	0	nv	nv	0
0	nv	nv	0	nv	nv	0
0	nv	nv	0	nv	nv	0
0	nv	nv	0	nv	nv	0
0	nv	nv	0	nv	nv	0
0	nv	nv	0	nv	nv	0
0	nv	nv	0	nv	nv	0
0	nv	nv	0	nv	nv	0
0	nv	nv	0	nv	nv	0
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv

Tabelle A1.2: Statische Bindungsexperimente von iE der 13 Transfektanten und 3D7-iE an CHO-GFP. iRBC/iE: infizierte Erythrozyten; nv: nicht verfügbar.

	pARL_PVX_093715 ^{HA} -iE	pARL_PVX_096925 ^{HA} -iE	pARL_PVX_097525 ^{HA} -iE	pARL_PVX_101560 ^{HA} -iE	pARL_PVX_107235 ^{HA} -iE	pARL_PVX_113230 ^{HA} -iE	pARL_PVX_115475 ^{HA} -iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	nv	nv	0	0	0
	0	0	nv	nv	0	0	0
	0	0	nv	nv	0	0	0
	0	0	nv	nv	0	0	0
	0	0	nv	nv	0	0	0
	1	0	nv	nv	0	1	0
	0	0	nv	nv	0	2	0
	0	0	nv	nv	0	0	0
	0	0	nv	nv	0	0	0
	0	1	nv	nv	nv	nv	2
	0	2	nv	nv	nv	nv	0
	0	0	nv	nv	nv	nv	0
	0	1	nv	nv	nv	nv	0
	0	0	nv	nv	nv	nv	0
	0	6	nv	nv	nv	nv	0
	0	1	nv	nv	nv	nv	0
	0	2	nv	nv	nv	nv	0
	0	1	nv	nv	nv	nv	0
	0	nv	nv	nv	nv	nv	0
	0	nv	nv	nv	nv	nv	0
	0	nv	nv	nv	nv	nv	0
	0	nv	nv	nv	nv	nv	0
	0	nv	nv	nv	nv	nv	0
	0	nv	nv	nv	nv	nv	0
	0	nv	nv	nv	nv	nv	0
	0	nv	nv	nv	nv	nv	0
0	nv	nv	nv	nv	nv	0	
0	nv	nv	nv	nv	nv	0	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	

	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv

Tabelle A2.1: Statische Bindungsexperimente von iE der 13 Transfektanten und 3D7-iE an CHO-CD36. iRBC/iE: infizierte Erythrozyten; nv: nicht verfügbar.

	3D7-iE	pARL_PVX_000020 ^{HA} -iE	pARL_PVX_050690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_060690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_068690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_077695 ^{HA} -iE	pARL_PVX_081850 ^{HA} -iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	6	0	24	42	2	0	0
	3	0	18	38	16	0	0
	3	0	24	25	16	0	1
	2	0	45	11	43	0	3
	1	0	20	4	14	0	0
	2	0	24	11	13	0	0
	1	1	41	23	9	0	0
	0	0	49	14	13	0	1
	0	0	50	38	4	0	1
	6	1	3	1	4	nv	1
	8	0	4	1	1	nv	0
	1	0	3	15	2	nv	0
	4	2	36	21	2	nv	0
	6	4	49	44	4	nv	0
	9	4	36	36	2	nv	0
	1	10	35	2	3	nv	0
	3	5	23	14	3	nv	0
	5	9	35	5	6	nv	0
	3	nv	nv	15	nv	nv	0
	9	nv	nv	7	nv	nv	0
	1	nv	nv	19	nv	nv	0
	0	nv	nv	7	nv	nv	0
	5	nv	nv	15	nv	nv	0
	7	nv	nv	18	nv	nv	0
3	nv	nv	21	nv	nv	0	
2	nv	nv	4	nv	nv	0	
1	nv	nv	8	nv	nv	0	

4	nv	nv	nv	nv	nv	nv
1	nv	nv	nv	nv	nv	nv
6	nv	nv	nv	nv	nv	nv
4	nv	nv	nv	nv	nv	nv
9	nv	nv	nv	nv	nv	nv
8	nv	nv	nv	nv	nv	nv
4	nv	nv	nv	nv	nv	nv
5	nv	nv	nv	nv	nv	nv
3	nv	nv	nv	nv	nv	nv
4	nv	nv	nv	nv	nv	nv
1	nv	nv	nv	nv	nv	nv
6	nv	nv	nv	nv	nv	nv
4	nv	nv	nv	nv	nv	nv
9	nv	nv	nv	nv	nv	nv
8	nv	nv	nv	nv	nv	nv
4	nv	nv	nv	nv	nv	nv
5	nv	nv	nv	nv	nv	nv
3	nv	nv	nv	nv	nv	nv
2	nv	nv	nv	nv	nv	nv
5	nv	nv	nv	nv	nv	nv
3	nv	nv	nv	nv	nv	nv
7	nv	nv	nv	nv	nv	nv
3	nv	nv	nv	nv	nv	nv
4	nv	nv	nv	nv	nv	nv
8	nv	nv	nv	nv	nv	nv
4	nv	nv	nv	nv	nv	nv
3	nv	nv	nv	nv	nv	nv

Tabelle A2.2: Statische Bindungsexperimente von iE der 13 Transfektanten und 3D7-iE an CHO-CD36. iRBC/iE: infizierte Erythrozyten; nv: nicht verfügbar.

	pARL_PVX_093715 ^{HA} -iE	pARL_PVX_096925 ^{HA} -iE	pARL_PVX_097525 ^{HA} -iE	pARL_PVX_101560 ^{HA} -iE	pARL_PVX_107235 ^{HA} -iE	pARL_PVX_113230 ^{HA} -iE	pARL_PVX_115475 ^{HA} -iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	108	22	0	0	2	7	1
	45	14	0	0	5	8	0
	67	12	0	0	2	5	1
	19	2	0	1	0	5	0
	11	1	0	0	0	5	1
	18	15	0	0	1	2	1
	88	1	0	0	5	1	0
	71	3	0	0	13	1	0
	148	8	1	0	13	10	0
	43	7	nv	nv	2	4	0
	5	8	nv	nv	3	8	0
	7	8	nv	nv	1	3	2
	72	9	nv	nv	4	0	0
	38	5	nv	nv	0	5	0
	88	6	nv	nv	2	4	0
	8	11	nv	nv	0	1	0
	17	5	nv	nv	1	0	0
16	12	nv	nv	2	0	0	

1	nv	nv	nv	nv	nv	nv
1	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
1	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
1	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
1	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv

Tabelle A4.2: Statische Bindungsexperimente von iE der 13 Transfektanten und 3D7-iE an CHO-VCAM-1. iRBC/iE: infizierte Erythrozyten; nv: nicht verfügbar.

	pARL_PVX_093715 ^{HA} -iE	pARL_PVX_096925 ^{HA} -iE	pARL_PVX_097525 ^{HA} -iE	pARL_PVX_101560 ^{HA} -iE	pARL_PVX_107235 ^{HA} -iE	pARL_PVX_113230 ^{HA} -iE	pARL_PVX_115475 ^{HA} -iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	1	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	2	2	0
	0	0	0	0	0	0	0
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv

	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv

Tabelle A5.1: Statische Bindungsexperimente von iE der 13 Transfektanten und 3D7-iE an CHO-P-Selektin. iRBC/iE: infizierte Erythrozyten; nv: nicht verfügbar.

	3D7-iE	pARL_PVX_000020 ^{HA} -iE	pARL_PVX_050690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_060690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_068690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_077695 ^{HA} -iE	pARL_PVX_081850 ^{HA} -iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	1	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	0	nv	nv	nv	nv	nv	nv
1	nv	nv	nv	nv	nv	nv	
0	nv	nv	nv	nv	nv	nv	

Tabelle A5.2: Statische Bindungsexperimente von iE der 13 Transfektanten und 3D7-iE an CHO-P-Selektin. iRBC/iE: infizierte Erythrozyten; nv: nicht verfügbar.

	pARL_PVX_093715 ^{HA} -iE	pARL_PVX_096925 ^{HA} -iE	pARL_PVX_097525 ^{HA} -iE	pARL_PVX_101560 ^{HA} -iE	pARL_PVX_107235 ^{HA} -iE	pARL_PVX_113230 ^{HA} -iE	pARL_PVX_115475 ^{HA} -iE
iRBCs/100 CHO-Zellen	1	4	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	

Tabelle A6: Bindungsexperimente unter Flussbedingung von iE von 4 Transfektanten und 3D7-iE an CHO-CD36. iE: infizierte Erythrozyten; nv: nicht verfügbar. An den weiteren getesteten Scherkräften (6 Dyn/cm², 4 Dyn/cm², 3 Dyn/cm², 2 Dyn/cm²) konnten keine Bindungen festgestellt werden.

	3D7-iE		pARL_PVX_060690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_068690 ^{HA} -iE	pARL_PVX_093715 ^{HA} -iE	pARL_PVX_096925 ^{HA} -iE	Experiment-Nr.
	Scherkraft [Dyn/cm ²]	1,5	0,9	0,9	0,9	0,9	
Anzahl gebundener iE	0	5	0	0	0	0	I
	4	14	nv	nv	nv	nv	II

Tabelle A7: Lokalisationsstudien der 13 VIR-Proteine bei der Immunfluoreszenzanalyse. Lokalisierung mit: Para: Parasit; MS: Maurer'sche Spalten; OF: Oberfläche des iE.

Genname		Para	Para + MS	Para + OF	MS	MS + OF
PVX_000020	T	46	71	3	0	0
	S	23	49	5	43	0
PVX_050690	T	120	0	0	0	0
	S	120	0	0	0	0

PVX_060690	T	15	85	0	20	0
	S	0	1	0	105	14
PVX_068690	T	1	26	0	79	14
	S	0	1	0	79	41
PVX_077695	T	5	85	2	27	1
	S	0	92	3	17	9
PVX_081850	T	10	89	0	21	0
	S	0	1	0	98	21
PVX_093925	T	10	92	0	18	0
	S	0	4	0	106	10
PVX_096925	T	21	45	0	54	0
	S	0	7	0	96	17
PVX_097525	T	25	93	0	2	0
	S	4	32	0	78	6
PVX_101560	T	6	91	0	23	0
	S	0	6	0	80	34
PVX_107235	T	19	38	0	63	0
	S	0	4	0	100	16
PVX_113230	T	11	68	1	40	0
	S	0	6	4	55	55
PVX_115475	T	33	87	0	0	0
	S	0	70	0	50	0

Tabelle A8: Kolokalisationsstudien der 13 VIR-Proteine bei der Immunfluoreszenzanalyse. Kolokalisierung mit: Spektrin: Protein der Erythrozytenmembran; ETRAMP5: Protein der parasitophoren Vakuolenmembran; SBP1: Protein der Maurer'schen Spalten; ATS: ATS-Domäne der oberflächenassoziierten PfEMP1-Proteine.

Kolokalisation		Spektrin		ETRAMP5		SBP1		ATS	
		Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
PVX_000020	T	1	29	30	0	13	17	14	16
	S	0	30	20	10	21	9	16	14
PVX_050690	T	0	30	30	0	0	30	0	30
	S	0	30	30	0	0	30	0	30
PVX_060690	T	0	30	23	7	25	5	6	24
	S	0	30	0	30	30	0	9	21
PVX_068690	T	2	28	0	30	30	0	30	0
	S	9	21	0	30	30	0	31	0
PVX_077695	T	0	30	21	9	30	0	29	1
	S	3	27	22	9	30	0	28	2
PVX_081850	T	0	30	26	4	28	2	10	20
	S	4	26	1	29	30	0	24	6
PVX_093715	T	0	30	26	4	28	2	11	19
	S	2	28	0	30	30	0	16	14
PVX_096925	T	0	30	14	16	26	4	8	22
	S	6	24	4	26	30	0	13	17
PVX_097525	T	0	30	30	0	26	4	12	18
	S	0	30	12	18	29	1	15	15
PVX_101560	T	0	30	22	8	30	0	7	23
	S	5	25	2	28	30	0	15	15

PVX_107235	T	0	30	15	15	24	6	8	22
	S	3	27	2	28	30	0	14	16
PVX_113230	T	0	30	21	9	25	5	16	14
	S	7	23	4	26	30	0	16	14
PVX_115475	T	0	30	30	0	22	8	11	19
	S	0	30	17	13	30	0	13	17

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Torben Rehn, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, 26. Februar 2020

Torben Rehn

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei einigen Personen bedanken, die mir geholfen haben, dass diese Arbeit zustande gekommen ist und ich meinen Traum erfüllen konnte, einen Doktor zu machen.

Ein riesiges Dankeschön geht an Prof. Dr. Iris Bruchhaus, die mir überhaupt erst die Möglichkeit gegeben hat, einen Doktor zu machen. Du standst mir immer mit Rat zur Seite, hast mich unterstützt und aufgebaut, wenn ein Experiment mal wieder nicht so funktioniert hat, wie es sollte. Dafür vielen Dank!

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Tim Gilberger für die Übernahme des Zweitgutachters danken.

Auch ein ganz großes Dankeschön an die Jürgen-Manchot-Stiftung, die mir mein Stipendium finanziert hat, ohne das ich keine Doktorarbeit hätte anfangen können, sowie die Vereinigung der Freunde des Tropeninstituts für die zusätzliche finanzielle Unterstützung.

Susann Ofori für die vielen Gespräche über Football, insbesondere aber für den praktischen Rat und all die Hilfe während meiner Doktorarbeit. Ohne Dich wäre das alles sehr viel schwerer gewesen. Ich hoffe, Du findest bald wieder jemanden, der Dir Deine Rechnungen überprüft.

Dr. Nahla Metwally für die Hilfe, Unterstützung und die vielen sachlichen Diskussionen, sowie für die Übernahme meiner Zellkultur, wenn ich mal Urlaub hatte.

Meiner Bachelorstudentin Trang Nguyen, sowie meiner Masterstudentin Eva Pansegrau, die mich beide bei meinem Projekt unterstützt haben. Ich hoffe, ich war nicht allzu streng mit euch.

Als nächstes möchte ich mich bei allen Mitglieder der AG Bruchhaus aus Labor 4 und 5 für die unvergessliche Zeit im Institut bedanken. Besonders möchte ich Philip Bouws und Yifan Wu dafür danken, dass ihr mich am Ende bei den Flow Experimenten unterstützt habt.

Nicht vergessen will ich die AG Lotter, mit denen ich oft genug Mittag gegessen habe, wenn mich meine AG dabei im Stich gelassen hat.

Danke auch an meine beiden Co-Betreuer PD Dr. Joachim Clos und Dr. Paolo Mesén-Ramírez für die konstruktive Kritik und insbesondere Paolo für die zahlreichen Tipps bei den IFA-Versuchen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. Anna Bachmann und Stephan

Wichers danken, die mir beide ebenfalls mit Rat zu Seite standen, wann immer ich sie danach gefragt habe.

Ein ganz großes Dankeschön an Dr. Michael Dörpinghaus für die vielen unverzichtbaren Kaffeepausen, in denen Iris uns (eigentlich immer nur dich) gesucht hat und in denen wir die neusten Sportnachrichten ausgetauscht haben. Nicht zu vergessen möchte ich, dass Du mich Iris vorgeschlagen hast.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinem Bruder und seiner Familie, sowie insbesondere bei meinen Eltern bedanken. Ihr habt mich immer auf meinem Weg unterstützt, habt versucht mich wieder aufzubauen, wenn es mal nicht so lief und mir oft genug zugehört, wenn ich irgendwelches Fachchinesisch geredet habe und ihr quasi kein Wort verstanden habt. Dafür ein riesiges **Dankeschön!**