

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplombiologin Nicola Viebig  
aus Karlsruhe

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Aktivierung von Endothelzellen durch  
*Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten und  
Charakterisierung potentieller Adhäsionsrezeptoren

Gutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer  
Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg und am Hygiene-Institut, Abteilung Parasitologie, Heidelberg in der Zeit von November 2000 bis November 2003 unter der Leitung von Prof. Dr. Percy A. Knolle durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Andrews, K.T., **Viebig, N.K.**, Wissing, F., Klatt, N., Oster, N., Wickert, H., Knolle, P. and Lanzer, M. (2003) A human schwannoma cell line supports the *in vitro* adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate. *Parasitol Res*, **89**, 188-193.

Bashirova, A.A., Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Eilering, J.B., Martin, M.P., Wu, L., Martin, T.D., **Viebig, N.**, Knolle, P.A., KewalRamani, V.N., van Kooyk, Y. and Carrington, M. (2001) A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med*, **193**, 671-678.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Percy Knolle für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Unterstützung und die vielen Möglichkeiten und Freiheiten, die ich bei der Gestaltung dieser Arbeit hatte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Michael Lanzer, der gerne bereit war die Begutachtung meiner Arbeit zu übernehmen und mir ermöglicht hat viele der Experimente in seinem Labor durchzuführen und meine Arbeit in Heidelberg fertigzustellen.

Ein großes Dankeschön an Kathy Andrews, die mir geduldig beigebracht hat wie Plasmodien aussehen, wie man sie kultiviert und mit ihnen Experimente macht. Danke für Deine tolle Betreuung und für die wunderschöne Zeit, die wir zusammen im Labor hatten.

Danke an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Lanzer, die mich immer als Teil ihrer Gruppe behandelt haben. Ich musste mich nie als „Parasit“ fühlen. Danke für die Unterstützung im Laboralltag und für all die Zellkulturutensilien, Chemikalien, Antikörper und Geräte, die ich benutzen durfte. Danke vor allem an Nicole für ihre Hilfe in der Zellkultur.

Ein Dankeschön an Andreas, Beatrix, Dominik, Gerhard, Silke und Tobias für die schöne Zeit in Heidelberg und für die weitere Unterstützung nach dem Umzug nach Bonn.

Danke auch an Blanche Schwappach, Angelika Kehlenbach und die AG Schaller für ihre Hilfe bei den retroviralen Transfektionen und dem Sortieren der Transfektanten, Frau Kopp-Schneider für ihre Unterstützung bei statistischen Auswertungen, Kai Matuschewski für *P. berghei* Sporozoitien, Dr. Ulrich Wulbrand für die Durchführung der Microarray-Analysen und an alle anderen, die mich unterstützt haben.

Thanks to Alister Craig for all the interesting and helpful discussions and for the nice time I had in his lab at the Liverpool School of Tropical Medicine (gefördert durch ein Reisestipendium des Boehringer Ingelheim Fonds). I would also like to thank all the members of the ADMALI project for their help.

Am wichtigsten aber ist mir Matthias, der mich in den letzten drei Jahren mit Rat und Tat unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte. Danke.

# Abkürzungen

$\alpha$	anti, gegen
A	Adenin
aa	Aminosäure
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
b	Base
Bis-AA	N',N'-Methylen-Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
C	Cytosin, Celsius
CCL	Chemokin, CC-Motiv, Ligand
CD	Differenzierungsmuster von zellulären Oberflächenmolekülen („cluster of differentiation“)
cDNA	komplementäre DNA
CHO	„Chinese Hamster Ovary“
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CSA	Chondroitin-4-Sulfat A
CS-Protein	Circumsporozoites Oberflächenprotein
$\Delta$	Deletion, Delta
Da	Dalton
DC-SIGN	dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (=DNS)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxyribonucleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchfluscytometer („fluorescence activated cell sorter“)
FCR3	Parasitenklon FCR3
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm bzw. Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	Guanin

GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
h	Stunde
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen („human dermal microvascular endothelial cell“)
HEK	„human embryonic kidney“
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-(2-ethylsulfonsäure)
HLEC	humane Lungenendothelzelllinie („human lung endothelial cell line“)
HMS-97	„human malignant schwannoma cell line, 1997“
HPAEC	humane arterielle Endothelzellen der Lunge („human pulmonary artery endothelial cells“)
HUVEC	humane Endothelzellen aus der Nabelschnur („human umbilical vein endothelial cells“)
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFA	Indirekter Immunfluoreszenz-Assay
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	sinusoidale Endothelzelle der Leber („liver sinusoidal endothelial cell“)
L-SIGN	liver/lymph node specific ICAM-3 grabbing nonintegrin
μ	Mikro-, 10 <sup>-6</sup>
m	Meter, Milli- (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	Magnetische Zellsortierung („magnetic activated cell sorter“)
MCP	Monocyte chemotactic protein
MCS	„multiple cloning site“
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
n	Nano-
nt	Nucleotid bzw. Nucleosid
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte

---

p	Piko- ( $10^{-9}$ ), Plasmid
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	PAA-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PFA	Paraformaldehyd
PfEMP-1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
pH	„potentia hydrogenii“
PRBC	<i>P. falciparum</i> infizierter Erythrocyt
RBC	Erythrocyt („red blood cell“)
RNA	Ribonucleinsäure
RNase A	Ribonuclease A
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SP	Signalpeptid
T	Thymin
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	Triethylmethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	biochemische Einheit für die Enzymaktivität
ÜN	über Nacht
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsvolumenprozent

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Allgemeines .....	1
1.2 Lebenszyklus und Biologie von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	1
1.3 Das Krankheitsbild der Malaria.....	3
1.4 Das Phänomen der Cytoadhäsion.....	4
1.4.1 PfEMP-1 und Wirtszell-Rezeptoren.....	5
1.4.2 <i>var</i> Gene und Antigenvariation .....	6
1.5 Eigenschaften einiger Adhäsionsmoleküle .....	8
1.5.1 Glykosaminoglykane .....	8
1.5.2 Das Glykoprotein CD36 .....	9
1.5.3 Selektine .....	9
1.5.4 Integrine.....	10
1.5.5 Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie .....	10
1.6 Modulation der zellulären Signalwege durch Kontakt mit <i>P. falciparum</i> -Antigenen und infizierten Erythrocyten.....	11
1.7 Aufbau und immunologische Funktion der Leber .....	13
1.8 Die Rezeptoren L-SIGN und DC-SIGN.....	15
1.9 Ziel dieser Arbeit .....	17
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Laborausstattung.....	18
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	20
2.1.3 Chemikalien .....	21
2.1.4 Antikörper.....	23
2.1.4.1 Antikörper gegen Oberflächenmoleküle.....	23
2.1.4.2 ELISA-Cytokinantikörper .....	24
2.1.5 Cytokine und Wachstumsfaktoren .....	24
2.1.6 Enzyme .....	24
2.1.7 Nukleinsäuren.....	25
2.1.7.1 Oligonukleotide .....	25
2.1.7.2 Plasmide.....	26
2.1.7.3 Genomische DNA/cDNA .....	26
2.1.8 Größenmarker für die Elektrophorese.....	26
2.2 Methoden .....	27
2.2.1 Zellkulturmethoden .....	27

2.2.1.1 Kultivierung und Transfektion eukaryontischer Zellen.....	27
2.2.1.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen .....	27
2.2.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	28
2.2.1.1.3 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen.....	28
2.2.1.1.4 Retroviraler Gentransfer in eukaryontische Zellen.....	29
2.2.1.2 Nachweis von Mycoplasmen mittels PCR .....	29
2.2.1.3 Methoden zur Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	30
2.2.1.3.1 Kultivierung von <i>P. falciparum</i> <i>in vitro</i> .....	30
2.2.1.3.2 Mikroskopische Darstellung von <i>P. falciparum</i> mittels Giemsa-Färbung .....	32
2.2.1.3.3 Bestimmung der Parasitämie und des Hämatokrits .....	32
2.2.1.3.4 Einfrieren von Parasiten.....	32
2.2.1.3.5 Auftauen von Parasiten .....	33
2.2.1.3.6 Synchronisation von <i>P. falciparum</i> -Kulturen mit Sorbitol.....	33
2.2.1.3.7 Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch Gelatine-Sedimentation.....	33
2.2.1.3.8 Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch magnetische Separation.....	34
2.2.1.3.9 Metabolische Markierung <i>P. falciparum</i> -infizierter Erythrocyten .....	35
2.2.1.4 <i>P. falciparum</i> -Adhäsionsversuche.....	35
2.2.1.5 Aktivierungsversuche .....	37
2.2.1.6 Dextran-Aufnahme-Assays.....	39
2.2.1.7 Sporoziten-Invasionsassay.....	39
2.2.2 Immunfluorometrische Methoden .....	40
2.2.2.1 Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusscytometer .....	40
2.2.2.1.1 Färbungen von Oberflächenantigenen .....	40
2.2.2.2 Immunfluoreszenz-Analysen am Konfokalen Mikroskop (IFA) .....	41
2.2.2.2.1 Immunfluoreszenz-Färbungen .....	41
2.2.2.2.2 Prinzip der konfokalen Laser Scan Mikroskopie.....	42
2.2.2.3 Sandwich-ELISA .....	42
2.2.3 Detektion und Analyse von Proteinen.....	44
2.2.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford .....	44
2.2.3.2 Isolierung von Plasmamembranen und Membranproteinen.....	44
2.2.3.3 Herstellung von Proteinextrakten .....	44
2.2.3.4 Proteinkonzentrierung.....	45
2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
2.2.3.6 Protein-Blotting und Zell-Overlay.....	46
2.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	47
2.2.4.1 Kultur und Transformation prokaryontischer Zellen.....	47
2.2.4.1.1 Verwendete Bakterienstämme .....	47
2.2.4.1.2 Medien und Lösungen für die Kultur von <i>E. coli</i> .....	47
2.2.4.1.3 Herstellung hitzekompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	47
2.2.4.1.4 Hitzeschock-Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	48
2.2.4.1.5 Herstellung einer Glycerin-Bakterienstocklösung.....	48

2.2.4.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA .....	49
2.2.4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	49
2.2.4.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Plasmodium falciparum</i> .....	49
2.2.4.2.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA .....	50
2.2.4.2.4 DNA-Analyse mittels Gelelektrophorese .....	50
2.2.4.3 <i>In vitro</i> -Modifikation und Rekombination von DNA .....	51
2.2.4.3.1 Restriktion von DNA .....	51
2.2.4.3.2 Enzymatische DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	51
2.2.4.3.3 Ligationen .....	51
2.2.4.4 Methoden zur Analyse von RNA .....	52
2.2.4.4.1 Isolierung von RNA aus <i>P. falciparum</i> .....	52
2.2.4.4.2 DNase I-Behandlung der RNA .....	52
2.2.4.4.3 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) .....	52
2.2.4.4.4 Northern Blot-Analyse .....	54
2.2.4.4.5 Herstellung radioaktiv-markierter Sonden für die Northern Blot-Analyse .....	55
2.2.4.4.6 Microarray-Analyse .....	56
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
3.1 Aktivierung von Endothelzellen durch <i>P. falciparum</i> -infizierte Erythrocyten .....	58
3.1.1 <i>In vitro</i> -Modellsystem zur Untersuchung der Aktivierung .....	58
3.1.1.1 Charakterisierung der Veränderungen im Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle aktivierter Endothelzellen .....	59
3.1.1.2 <i>P. falciparum</i> -infizierte Erythrocyten induzieren IL-6 Sekretion .....	61
3.1.2 Aktivierung durch direkte Interaktion .....	62
3.1.3 Titration der Parasitenanzahl und der Parasitämie .....	64
3.1.4 Zeitverlauf der Endothelzell-Aktivierung .....	65
3.1.5 Induktion der Aktivierung durch kurzen Kontakt von PRBCs und Endothelzellen .....	67
3.1.6 Kein Einfluß der Gelatine-Behandlung auf die Endothelzell-Aktivierung .....	69
3.1.7 Aktivierung durch <i>P. falciparum</i> -Parasiten anderer klonaler Linien .....	70
3.1.7.1 Parasiten der klonalen Linie 3D7 .....	70
3.1.7.2 ICAM-1 bindende <i>P. falciparum</i> -Parasiten .....	72
3.1.8 Aktivierung unterschiedlicher primärer Endothelzellen .....	74
3.1.8.1 Humane arterielle Endothelzellen der Lunge (HPAEC) .....	74
3.1.8.2 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) .....	76
3.1.9 Bestimmung des Transkriptions- und Expressionsmusters PRBC-aktivierter Endothelzellen .....	78
3.1.9.1 Ergebnisse der Microarray-Analyse .....	78
3.1.9.2 Bestimmung der Expressionlevel von CD44 und CD36 auf aktivierten Endothelzellen .....	80
3.1.9.3 Sekretion verschiedener Cytokine und Chemokine .....	81
3.1.9.3.1 Interleukin 8 (IL-8) .....	81
3.1.9.3.2 Macrophage inflammatory protein 3 alpha (MIP-3 $\alpha$ ) .....	82
3.1.9.3.3 Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) .....	83
3.1.9.3.4 Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1) .....	84

3.2 Keine Interaktion des endocytotischen Rezeptors L-SIGN mit <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrocyten und <i>P. berghei</i> Sporozoiten .....	85
3.2.1 Nachweis der L-SIGN-Expression auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber .....	85
3.2.2 Klonierung von L-SIGN und Herstellung stabil exprimierender Transfektanten.....	86
3.2.3 Inhibition der L-SIGN spezifischen Bindung und Aufnahme von Dextran-FITC in CHO <sup>L-SIGN</sup> Zellen durch $\alpha$ -SIGN spezifische Antikörper und Mannan.....	89
3.2.4 Interaktion von L-SIGN mit Plasmodien .....	91
3.2.4.1 Interaktion von <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrocyten mit L-SIGN .....	91
3.2.4.2 Interaktion von <i>Plasmodium berghei</i> Sporozoiten mit L-SIGN.....	93
3.3 Charakterisierung der Interaktion von <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrocyten mit CHO-745 Zellen .....	94
3.3.1 Charakterisierung der Interaktion von FCR3 <sup>L-SIGN</sup> mit CHO-745 Zellen .....	94
3.3.2 Selektion <i>P. falciparum</i> -infizierter Erythrocyten auf CHO-745 Zellen.....	95
3.3.3 Charakterisierung der Adhäsionseigenschaften von FCR3 <sup>745</sup> - und 3D7 <sup>745</sup> -infizierten Erythrocyten ..	97
3.3.4 Zell-Overlay - eine Methode zur Charakterisierung des Adhäsionsrezeptors auf CHO-745 Zellen? ..	99
3.3.5 Charakterisierung der transkribierten <i>var</i> Gene in den Parasitenpopulationen 3D7 <sup>745</sup> und FCR3 <sup>745</sup> ..	101
3.3.5.1 RT-PCR-Analyse der transkribierten DBL1 $\alpha$ -Domänen .....	101
3.3.5.1.1 Charakterisierung der DBL1 $\alpha$ -Domänen von 3D7 <sup>745</sup> .....	102
3.3.5.1.2 Charakterisierung der DBL1 $\alpha$ -Domänen von FCR3 <sup>745</sup> .....	103
3.3.5.1.3 Bestimmung der Häufigkeiten der Klone und der Homologien der identifizierten DBL1 $\alpha$ -Domänen .....	104
3.3.5.2 Northern Blot-Analyse zur Identifizierung vollständig transkribierter <i>var</i> Gene .....	106
3.3.5.2.1 Charakterisierung der <i>var</i> Gen Transkription der Parasitenpopulation 3D7 <sup>745</sup> .....	106
3.3.5.2.2 Charakterisierung der <i>var</i> Gen Transkription der Parasitenpopulation FCR3 <sup>745</sup> .....	108
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>110</b>
4.1 Aktivierung primärer humaner Endothelzellen durch <i>Plasmodium falciparum</i> -infizierte Erythrocyten <i>in vitro</i> .....	110
4.2 L-SIGN und seine Funktion in der Pathogenese der Malaria .....	118
4.2.1 Expression verschiedener Isoformen von L-SIGN auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber.....	119
4.2.2 Der endocytotische Rezeptor L-SIGN.....	120
4.2.3 L-SIGN interagiert nicht mit <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrocyten und mit <i>P. berghei</i> Sporozoiten .....	122
4.3 Charakterisierung der Interaktion <i>P. falciparum</i> -infizierter Erythrocyten mit CHO-745 Zellen .....	125
4.3.1 Ansätze zur Charakterisierung des Adhäsionsrezeptors auf CHO-745 Zellen .....	126
4.3.2 Analyse der transkribierten <i>var</i> Gene in den Parasitenpopulationen 3D7 <sup>745</sup> und FCR3 <sup>745</sup> .....	129
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>134</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>136</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>138</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

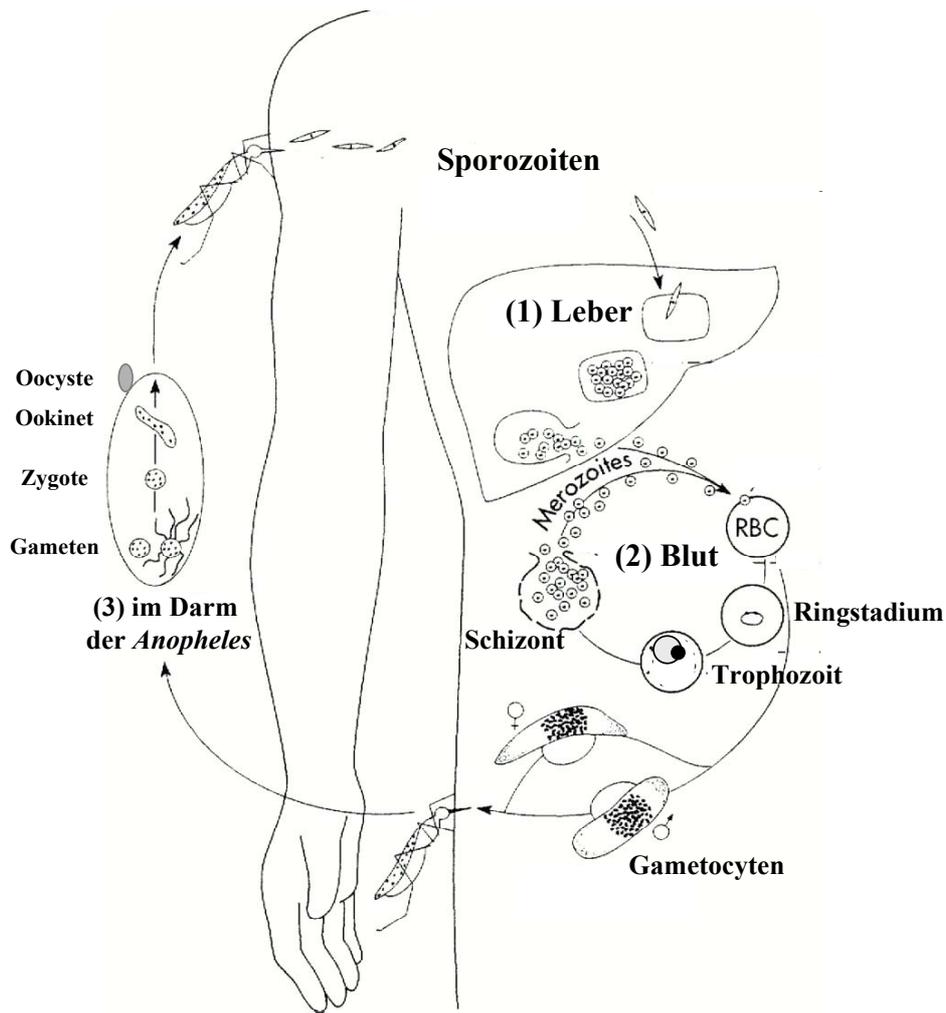
Malaria ist eine der wichtigsten Infektionskrankheiten weltweit. Sie tritt in ungefähr 100 Ländern der tropischen und subtropischen Regionen aller Kontinente, außer in Australien, endemisch auf. Etwa 40% der Weltbevölkerung lebt in Malaria-Endemiegebieten, in denen nach WHO-Schätzung 300 bis 500 Millionen Erkrankungen pro Jahr auftreten, 90% davon in Afrika. Jedes Jahr sterben weltweit 1,5 bis 2,7 Millionen Menschen an Malaria, die Hälfte davon sind Kinder unter 5 Jahren (Robert-Koch-Institut, 2000).

Es gibt vier Arten von humanpathogenen Plasmodien, *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* als Erreger der Malaria tertiana und *Plasmodium malariae*, welcher die Malaria quartana hervorruft (Warrell and Gilles, 2002). Für die meisten durch Malaria verursachten Todesfälle ist *Plasmodium falciparum* verantwortlich (Warrell and Gilles, 2002).

Eine effiziente Malaria-Vakzine ist noch nicht verfügbar, ein Schutz kann nur durch die Einnahme von Chemoprophylaktika erreicht werden. Auch eine chemotherapeutische Behandlung nach einer Infektion mit Plasmodien ist möglich. Verwendete Antimalariamittel sind z.B. Chloroquin (z.B. Resochin<sup>®</sup>), Mefloquin (Lariam<sup>®</sup>), Atovaquon/Proguanil (Malarone<sup>®</sup>). Allerdings wird die Therapie der Malaria tropica zunehmend durch die Ausbildung von Resistenzen erschwert. Während sich die Resistenz von *P. falciparum* gegenüber Chloroquin seit den 60er Jahren von Südostasien und Südamerika nach Afrika ausgebreitet hat (Darai et al., 1997; Wernsdorfer and Payne, 1991), bestehen Resistenzen gegenüber Mefloquin vor allem in Südostasien (Fontanet et al., 1993; White, 1998).

## 1.2 Lebenszyklus und Biologie von *Plasmodium falciparum*

Die Entwicklung der Plasmodien ist an einen Wirtswechsel zwischen Mensch und *Anopheles*-Mücke gebunden und umfasst drei Phasen, zwei im Menschen, (1) eine ungeschlechtliche Vermehrungen in den Hepatocyten (exoerythrocytäre Phase) und (2) eine ungeschlechtliche Vermehrungen in Erythrocyten (erythrocytäre Phase), sowie (3) eine geschlechtliche Entwicklung (Gamogonie) und Vermehrung in der Mücke.



**Abb. 1.1: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum***

Der Lebenszyklus von *P. falciparum* umfasst drei Phasen, zwei im Menschen, (1) eine ungeschlechtliche Vermehrungen in den Hepatocyten (exoerythrocytäre Phase) und (2) eine ungeschlechtliche Vermehrungen in Erythrocyten (erythrocytäre Phase), sowie (3) eine geschlechtliche Entwicklung (Gamogonie) und Vermehrung in der Mücke. (Abbildung verändert nach (Good et al., 1998))

Während des Sticks der weiblichen *Anopheles*-Mücke gelangen Sporozoiten mit dem Speichel der Mücke in die menschliche Blutbahn, von wo sie innerhalb 30 Minuten in die Leberparenchymzellen eindringen. Dort entwickeln sie sich durch 48-stündliche Teilung zu einem die Leberzelle ausfüllenden Gewebeschizonten (exoerythrocytäre Phase). Jeder Gewebeschizont enthält bis zu 30000 Merozoiten. Dieser Zyklus dauert bei *P. falciparum* zwischen fünf und sieben Tagen. Nach abgeschlossener Schizogonie kommt es zur Ruptur der Hepatocyten, und die freiwerdenden Merozoiten treten in die Blutbahn des Lebersinus und heften sich mit spezifischen Rezeptorproteinen an die Membran der Erythrocyten an und dringen in die Erythrocyten ein. In den Erythrocyten entwickeln sich die Merozoiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole über Ring- und Trophozoitenstadium zum reifen erythrocytären Schizonten, der wiederum in mehrere Merozoiten zerfällt (erythrocytäre

Phase). Während die meisten aus den Erythrocyten freigesetzten Merozoiten einen neuen Schizogoniezyklus einleiten, differenzieren einige zu weiblichen Makrogametocyten und männlichen Mikrogametocyten. Diese werden bei der Blutmahlzeit von der weiblichen *Anopheles*-Mücke mit dem Blut aufgenommen. Im Mitteldarm der Mücke erfolgt die Umwandlung der Makrogametocyten zu kugelförmigen Makrogameten, aus jedem Mikrogametocyten entwickeln sich durch Exflagellation 4-8 begeißelte Mikrogameten. Die Vereinigung beider führt zu einer beweglichen Zygote, die als Ookinet durch das Darmepithel der Mücke dringt, und zwischen Basallamina und Epithel zur Oocyste wird. In ihr entwickeln sich die Sporozoiten, die in reifem Zustand durch Platzen der Oocyste in die Hämolymphe der Mücke freigesetzt werden. Die Sporozoiten wandern in die Speicheldrüsen der Mücke, von wo sie beim Saugakt der Mücke in die menschliche Blutbahn gelangen (Darai et al., 1997; Kayser et al., 2001; Wehner and Gehring, 1995).

### 1.3 Das Krankheitsbild der Malaria

Die klinischen Erscheinungen der Malaria tropica werden durch die erythrocytären Entwicklungsstadien der Plasmodien ausgelöst und beruhen auf multifaktoriellen pathogenetischen Vorgängen, die viele Organe betreffen. Die Malaria beginnt mit unspezifischen, Grippe-ähnlichen Symptomen, u.a. mit einem uncharakteristischen Fieberverlauf ohne erkennbaren Rhythmus, Kopf- und Gliederschmerzen, Abgeschlagenheit, Schweißausbrüchen, Schüttelfrost, Schwindel und Erbrechen. Das Fieber wird durch lösliche Malariatoxine ausgelöst, die bei der Ruptur der infizierten Erythrocyten freigesetzt werden und die Sekretion proinflammatorischer Cytokine, z.B. von TNF $\alpha$  und Interleukinen durch Macrophagen induzieren (Kwiatkowski et al., 1989; Playfair et al., 1990). Ein weiterer wichtiger Faktor in der Pathogenese ist die Anämie, die durch Zerfall der Erythrocyten bei der Schizogonie, vermehrte Elimination infizierter und nicht-infizierter Erythrocyten in der Milz, Hemmung der Erythropoese durch TNF $\alpha$  und andere Faktoren verursacht wird (Kayser et al., 2001).

Setzt nicht schnell eine anti-parasitäre Therapie ein, verschlechtert sich das klinische Bild rasch, es kommt zu einer komplizierten Malaria tropica. Unbehandelt endet die Malaria tropica bei Nichtimmunen in 15-20% der Fälle tödlich (Kretschmer et al., 1996). Mögliche Komplikationen während der akuten Infektion sind vor allem die cerebrale Malaria mit Seh- und Koordinationsstörungen, sowie Bewusstseinstörungen bis zum Koma, Lungenödem und Ateminsuffizienz, Anämie, Nierenversagen, Hämoglobinurie („Schwarzwasserfieber),

Hypoglykämie, Acidose (Kayser et al., 2001). Obwohl Erwachsene in Malaria-Endemiegebieten eine schützende Immunität entwickeln, besteht für Frauen während der ersten Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko einer lebensbedrohlichen Malaria. Die Schwangerschafts-assoziierte Malaria kann zu einem vermindertem Geburtsgewicht, Früh- oder Totgeburten, Aborten, schwerer Anämie der Mutter und Tod von Mutter und Neugeborenem führen (Menendez, 1995).

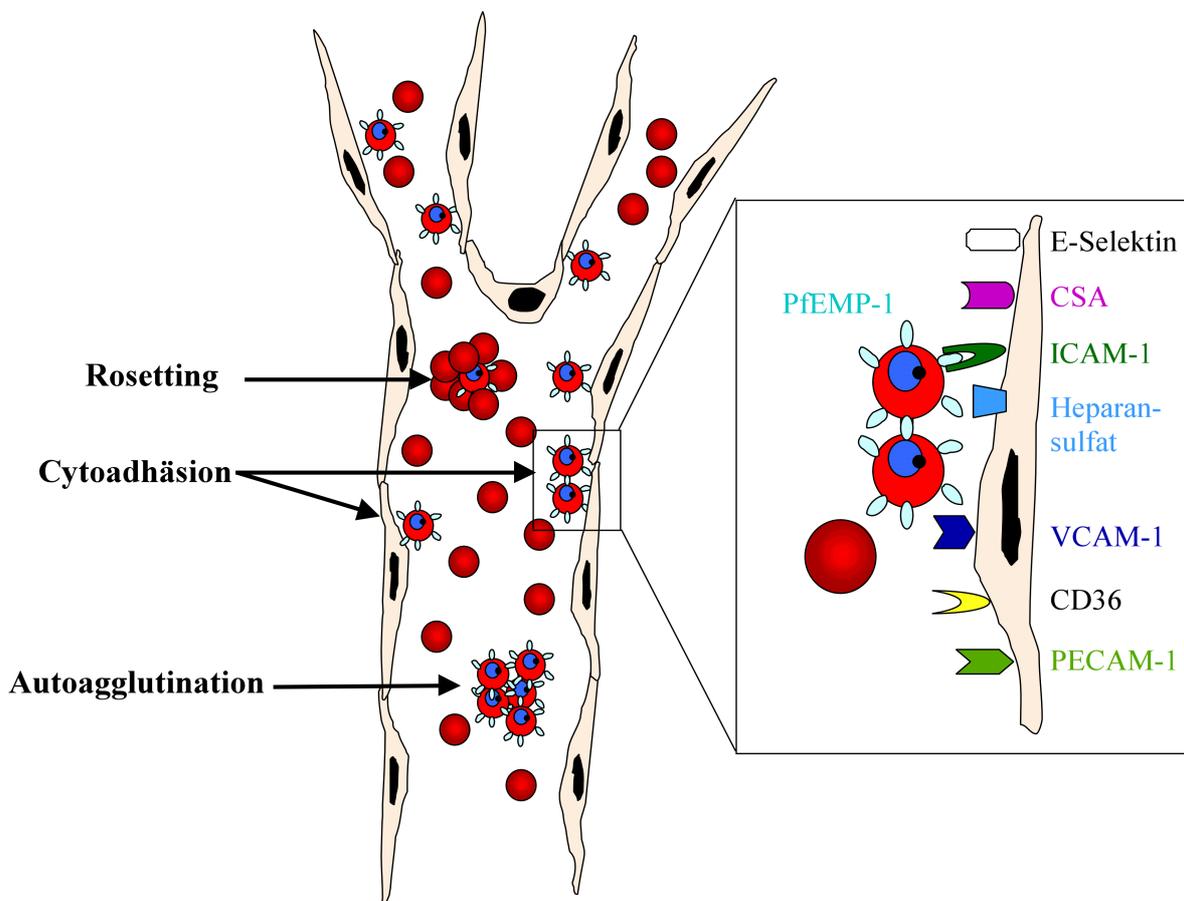
### 1.4 Das Phänomen der Cytoadhäsion

Die Pathogenität von *Plasmodium falciparum* ergibt sich zum einen aus der Möglichkeit der Parasiten sich bis zu einer hohen Parasitämie zu vermehren und zum anderen aus der einzigartigen Fähigkeit der Parasiten, während der zweiten Hälfte des 48 h-Lebenszyklus an das Endothel der Kapillaren zu adhären (Berendt et al., 1994; Rowe et al., 1995), ein Prozeß, der als Cytoadhäsion bezeichnet wird (Abb. 1.2).

Die Sequestrierung der infizierten Erythrocyten führt zu einer veränderten Mikrozirkulation des Blutes, Stoffwechsel-Fehlfunktionen und als Konsequenz zu der Ausbildung einer komplizierten Malaria (Ho and White, 1999). Die Cytoadhäsion verleiht den Parasiten mindestens zwei Überlebensvorteile: die Parasiten können sich zum einen in der mikroaerophilen venösen Umgebung besser entwickeln und zum anderen verhindert die Adhäsion an das Endothel eine Elimination der Parasiten in der Milz, die infizierte Erythrocyten an der geringeren Verformbarkeit (Cranston et al., 1984) sowie an gebundenen Antikörpern (Ho et al., 1990) oder Komponenten des Komplementsystems erkennt (Looareesuwan et al., 1987). Als Folge der Cytoadhäsion, findet man in Patienten, die in der akuten Phase der Malaria sterben, viele sequestrierte, infizierte Erythrocyten in der Mikrovaskulatur lebensnotwendiger Organe, z.B. in Herz, Lunge, Gehirn, Leber, Niere sowie in subkutanem Gewebe und in der Plazenta (Miller et al., 2002). Die Bindung infizierter Erythrocyten an nicht-infizierte Erythrocyten wird als Rosetting bezeichnet (Carlson et al., 1990) (Abb. 1.2). Das Ausmaß der Sequestrierung in den unterschiedlichen Organen variiert und reflektiert die unterschiedlichen klinischen Eigenschaften der Krankheit, wie z.B. der cerebralen Malaria mit vorwiegender Sequestrierung der infizierten Erythrocyten im Gehirn (Aikawa et al., 1990), der maternalen Malaria mit Sequestrierung in der Plazenta (Menendez, 1995) oder Multiorganversagen.

### 1.4.1 PfEMP-1 und Wirtszell-Rezeptoren

Cytoadhäsion ist ein Rezeptor-vermittelter Prozeß, der mit einer Familie immunovarianter Adhäsine in Verbindung gebracht wird. Das sogenannte *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP-1) ist an der Oberfläche der infizierten Erythrocyten in elektronen-dichten Strukturen, den sogenannten „Knobs“ lokalisiert und wird von Mitgliedern der *var* Multigenfamilie codiert (Baruch et al., 1995; Smith et al., 1995; Su et al., 1995).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Blutgefäßes mit den Interaktionen *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten und einiger an der Cytoadhäsion beteiligter Wirtszellrezeptoren**

*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP-1) ist an der Oberfläche der infizierten Erythrocyten lokalisiert und vermittelt die Interaktionen mit verschiedenen Wirtszell-Rezeptoren, die auf Endothelzellen exprimiert sind, u.a. ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, CSA, Heparansulfat, CD36, PECAM-1. Die Bindung der infizierten Erythrocyten an das Endothel wird als Cytoadhäsion bezeichnet. Rosetting ist die Bindung infizierter Erythrocyten an nicht-infizierte Erythrocyten, Autoagglutination die Interaktion mehrerer infizierter Erythrocyten.

Aufgrund seiner Variabilität ermöglicht PfEMP-1 die Cytoadhärenz von parasitierten Erythrocyten an unterschiedliche zelluläre Oberflächenrezeptoren, u.a. Thrombospondin (Roberts et al., 1985), CD36 (Ockenhouse et al., 1989), Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (Berendt et al., 1989), E-Selektin (Ockenhouse et al., 1992), Vascular cell adhesion

molecule-1 (VCAM-1) (Ockenhouse et al., 1992), Chondroitin-4-sulfat A (CSA) (Robert et al., 1995; Rogerson et al., 1995), PECAM-1 (Treutiger et al., 1997), P-Selektin (Senczuk et al., 2001),  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Siano et al., 1998), neonatale Fc-Rezeptoren (Flick et al., 2001) (Abb. 1.2). Rezeptoren auf Erythrocyten sind Heparansulfat (Carlson et al., 1992; Chen et al., 1998), die Blutgruppenantigene A und B (Carlson and Wahlgren, 1992), der Complement-Rezeptor 1 (CR1) (Rowe et al., 1997), die Serumproteine IgG/IgM und Fibrinogen (Scholander et al., 1996).

Die cerebrale Malaria wird mit einer Sequestrierung von parasitierten Erythrocyten im Gehirn in Verbindung gebracht, die durch Cytoadhäsion der infizierten Erythrocyten an ICAM-1 ausgelöst wird (Miller et al., 2002). Bei der maternalen Malaria sequestrieren *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten in der Plazenta, die Bindung wird hauptsächlich durch CSA vermittelt (Andrews and Lanzer, 2002; Fried and Duffy, 1996). Welche Rolle die Sequestrierung bei der Entstehung der anderen schweren Komplikationen der Malaria spielt, ist nicht geklärt (Miller et al., 2002).

### 1.4.2 *var* Gene und Antigenvariation

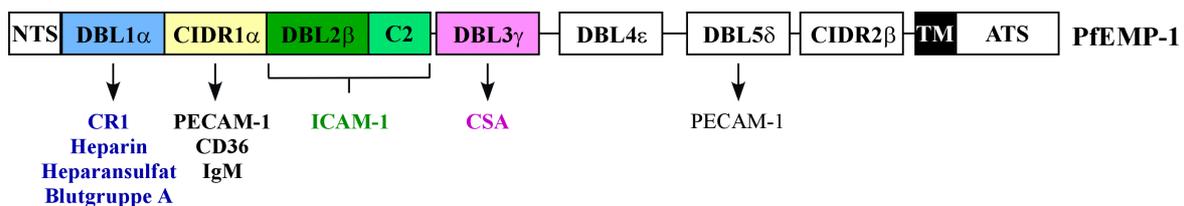
Jedes haploide Parasitengenom enthält ungefähr 60 verschiedene *var* Gene (Gardner et al., 2002), die sehr unterschiedliche Sequenzen besitzen, wenn man die Gene innerhalb eines einzigen Genoms und zwischen verschiedenen Parasiten-Isolaten vergleicht (Freitas-Junior et al., 2000) (Taylor et al., 2000) (Fowler et al., 2002). *Var* Gene sind auf allen 14 Chromosomen zu finden und sind hauptsächlich im Bereich der Chromosomenenden lokalisiert (Fischer et al., 1997; Hernandez-Rivas et al., 1997; Rubio et al., 1996; Thompson et al., 1997). Nur einige *var* Gene sind in der Chromosomenmitte zu finden (Thompson et al., 1997). Die subtelomerische Lokalisation der *var* Gene erleichtert eine „ektopische“ Rekombination zwischen heterologen Chromosomenenden in der Meiose und somit die Entstehung von *var* Gen-Varianten mit neuen Antigen-Phänotypen (Freitas-Junior et al., 2000).

Die *var* Gen-Expression ist streng reguliert. Im Ringstadium erfolgt eine Phase lockerer Transkription, in der die meisten, wenn nicht alle *var* Gene transkribiert, obgleich nicht exprimiert werden. Bei der Reifung vom Ringstadium zum Trophozoiten werden die meisten *var* Gene abgeschaltet (Chen et al., 1998; Duffy et al., 2002; Scherf et al., 1998), so daß jeder Parasit zu einem bestimmten Zeitpunkt nur eine begrenzte Anzahl von *var* Gen-Varianten aus seinem genomischen Repertoire exprimiert. Die *var* Gen-Expression findet *in situ*,

unabhängig von der chromosomalen Lokalisation statt und wird auf Transkriptionsebene reguliert (Scherf et al., 1998). Der Mechanismus des „*var* Gen-Switchings“ ist noch unbekannt, aber es gibt Hinweise, daß epigenetische Faktoren daran beteiligt sind (Deitsch et al., 1999). Die Switching-Rate beträgt *in vitro* etwa 2% pro Wachstumszyklus der Parasiten (Roberts et al., 1992).

Alle *var* Gene besitzen eine ähnliche Struktur mit einem sehr variablen Exon I, gefolgt von einem konservierten Intron und einem konservierten Exon II (Su et al., 1995). Innerhalb des konservierten Introns befinden sich *cis*-aktive Bereiche, die für das Abschalten („Silencing“) der *var* Gen-Promotoren zuständig sind (Deitsch et al., 2001).

Exon I codiert die hochvariable, extrazelluläre Domäne von PfEMP-1, die aus einem N-terminalem Segment (NTS), zwei bis sieben Cystein-reichen Duffy binding-like (DBL) Domänen, einer oder mehr „Cysteine-rich inter-domain regions“ (CIDR), C2 Domänen und einer hydrophoben Transmembrandomäne (TM) besteht (Abb. 1.3) (Smith et al., 2000b; Su et al., 1995). DBL-Domänen bestehen aus hypervariablen Blöcken, die von homologen Bereichen flankiert sind. Sie werden in fünf Typen eingeteilt ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ), CIDR-Domänen in drei Typen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) (Smith et al., 2001). Exon II codiert für ein hochkonserviertes cytoplasmatisches oder „acidic“ terminales Segment (ATS) (Su et al., 1995).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Struktur von PfEMP-1**

Dargestellt ist der strukturelle Aufbau von PfEMP-1 und die unterschiedlichen Domänen, die die Cytoadhäsion an bestimmte Wirtsrezeptoren vermitteln. NTS: N-terminales Segment, DBL: Duffy binding-like Domänen, CIDR: „Cysteine-rich inter-domain regions“, TM: hydrophoben Transmembrandomäne, ATS: „acidic“ terminales Segment, CR1: Complement-Rezeptor 1, CSA: Chondroitin-4-sulfat A. (Abbildung verändert nach (Andrews and Lanzer, 2002))

Die unterschiedlichen extrazellulären Domänen von PfEMP-1 sind für die adhäsiven Eigenschaften des Proteins verantwortlich. Bindung an CD36 wird z.B. durch CIDR1 $\alpha$  vermittelt (Baruch et al., 1997), Adhäsion an ICAM-1 durch eine spezielle DBL $\beta$  Domäne (Smith et al., 2000a) und Bindung an PECAM-1 durch CIDR1 $\alpha$  und eine DBL $\delta$ -Domäne (Chen et al., 2000). Die Fähigkeit *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an CSA zu adhären, wird mit einer definierten DBL $\gamma$ -Domäne innerhalb einzelner PfEMP-1 Varianten

in Verbindung gebracht (Buffet et al., 1999; Reeder et al., 2000). Neuere Ergebnisse zeigen, daß auch andere Domänen die Adhäsion an CSA vermitteln können (Andrews et al., 2003a; Salanti et al., 2003). Die Expression mehrerer funktioneller Bindungsdomänen innerhalb eines PfEMP-1 kann zu synergistischen Interaktion führen, z.B. ist die Fähigkeit an CD36 und ICAM-1 zu adhären eine gemeinsame Eigenschaft vieler Feldisolate und konnte *in vitro* gezeigt werden (McCormick et al., 1997). Im Gegensatz können parasitierte Erythrocyten, die an CSA adhären nicht an CD36 oder ICAM-1 binden (Beeson et al., 2000; Fried and Duffy, 1996).

## 1.5 Eigenschaften einiger Adhäsionsmoleküle

Durch die Expression der parasitären Antigene auf der Oberfläche der Erythrocyten sind Plasmodien in der Lage mit den Wirtszellen zu interagieren und zu kommunizieren. Eine Form der Interaktion ist wie bereits beschrieben die Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an die unterschiedlichsten Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen. Die Strukturen und Eigenschaften einiger dieser Adhäsionsmoleküle werden im folgenden Kapitel beschrieben.

### 1.5.1 Glykosaminoglykane

**Glykosaminoglykane** sind unverzweigte Polysaccharidketten, die aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten zusammengesetzt sind. Einer der beiden Zuckerreste in dem Disaccharid-Baustein ist stets ein Aminozucker (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin), der meistens mit einer Sulfatgruppe verbunden ist. Der zweite Zucker ist meist eine Uronsäure (Glucuronsäure oder Iduronsäure). Diese starke negativ geladenen Glykosaminoglykane lassen sich in vier Hauptgruppen einteilen: 1. Hyaluronsäure, 2. Chondroitinsulfat und Dermatan-sulfat, 3. Heparansulfat und Heparin und 4. Keratansulfat. Alle Glykosaminoglykane, mit Ausnahme von Hyaluronsäure, liegen in kovalenter Verbindung mit Proteinen in Form von **Proteoglykanen** vor. Sie bilden poröse, hydratisierte Gele, die den extrazellulären Raum ausfüllen (Alberts et al., 1995). Die Adhäsionsrezeptoren für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten **Chondroitin-4-sulfat A (CSA)**, **Heparin** und **Heparansulfat** werden in mehreren Geweben exprimiert (Andrews and Lanzer, 2002; Vogt et al., 2003). Die Modifikationen der Glykosaminoglykane mit Sulfatgruppen unterscheiden sich gewebespezifisch in ihrem Ausmaß. Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten in

der Plazenta erfolgt nur an geringfügig sulfatiertes CSA, das CSA in anderen Organen ist stärker sulfatiert (Achur et al., 2000; Andrews and Lanzer, 2002).

### 1.5.2 Das Glykoprotein CD36

Das Glycoprotein **CD36** wird auf vielen unterschiedlichen Zellen exprimiert u.a. auf Blutplättchen, Leukocyten, mikrovaskulären Endothelzellen und jungen Erythrocyten (Greenwalt et al., 1992). Es ist ein integrales Membranprotein mit zwei Transmembranregionen, N- und C-terminalen cytoplasmatischen Domänen sowie einem extrazellulären Proteinschleufe (Greenwalt et al., 1992). Der multifunktionelle Scavenger-Rezeptor CD36 bindet langkettige Fettsäuren, Collagen, Thrombospondin-1 (TSP-1), native und oxidierte Low- (LDL) und High-Density-Lipoproteine (HDL) sowie apoptotische Neutrophile (Febbraio et al., 2001). CD36 ist nicht nur Oberflächenrezeptor, es spielt auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und ist mit Kinasen der *src* Genfamilie assoziiert (Huang et al., 1991).

### 1.5.3 Selektine

Selektine sind eine Familie  $Ca^{2+}$ -abhängiger Kohlenhydrat-bindender Proteine, die die initiale Anheftung der Leukocyten an die Blutgefäßwände im Bereich der Entzündungsstelle vermitteln. Sie erkennen hauptsächlich Strukturen, die sulfatisiertes Sialyl-Lewis<sup>x</sup> enthalten (Janeway et al., 2001). Diese Selektin-Kohlenhydrat-Interaktion ist labil und erlaubt den Leukocyten eine rollende Adhäsion entlang des vaskulären Endotheliums in Richtung des Blutflusses. Selektine bestehen aus einer N-terminalen C-Typ Lektindomäne, gefolgt von einem EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)-ähnlichen Motiv, einer variablen Anzahl CRP („complement-regulatory protein“-) Domänen sowie einer Transmembranregion und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (Rosen and Bertozzi, 1994). Es gibt drei nah verwandte Mitglieder in der Selektinfamilie: L(Leukocyten)-, P(Blutplättchen)- und E(endotheliales)-Selektin.

**E-Selektin (CD62E, ELAM-1)** besitzt ein Molekulargewicht von 95-115 kDa und kommt in unterschiedlichen glykosylierten Formen vor. Es wird auf Cytokin-aktivierten Endothelzellen in entzündlichen Bereichen exprimiert (Bevilacqua et al., 1987) und vermittelt dort die Interaktion von Neutrophilen und Monocyten mit dem vaskulären Endothel (Tedder et al., 1995). Die Induktion mit Cytokinen wie  $TNF\alpha$  oder IL-1 erfordert die Neusynthese von mRNA und Proteinen (Bevilacqua and Nelson, 1993). Nach 4-6 h Stimulation mit Cytokinen erreicht die Expression von E-Selektin ihren Höhepunkt, um innerhalb von 24 h wieder auf

das Ausgangsniveau abzusinken (Bevilacqua et al., 1987). **P-Selektin (CD62P)** wird konstitutiv exprimiert und in Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen bzw. in Granula der Blutplättchen gespeichert (McEver et al., 1989). Als Antwort auf inflammatorische Stimuli wird es rasch an die Zelloberfläche transportiert (Geng et al., 1990). Die Expression von P-Selektin an der Zelloberfläche ist transient und geht innerhalb von Minuten wesentlich zurück (Geng et al., 1990).

### 1.5.4 Integrine

Integrine sind eine Superfamilie von Transmembranglykoproteinen, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln (Haas and Plow, 1994). Alle Integrine sind Heterodimere, die aus nicht-kovalent verbundenen  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten zusammengesetzt sind (Albelda and Buck, 1990). Obwohl sie konstitutiv auf allen getesteten Zelltypen exprimiert werden, binden Integrine ihre Liganden nur im aktivierten Zustand (Mackay and Imhof, 1993). Sie spielen u.a. eine Rolle in Entzündungsreaktionen, Zellwachstum und Differenzierung (Albelda and Buck, 1990).

### 1.5.5 Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie

Die Immunglobulinsuperfamilie stellt die größte Familie zellulärer Oberflächenmoleküle dar. Ihre Struktur ist durch eine variable Anzahl Immunglobulin-ähnlicher Domänen charakterisiert. Diese bestehen aus 70 bis 100 Aminosäuren, die in zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern organisiert sind und meistens durch Disulfidbrücken stabilisiert werden.

**Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54)** ist ein 80–114 kDa Glykoprotein mit fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembranregion und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (Staunton et al., 1988). Es interagiert mit Leukocyte Function Antigen-1 (LFA-1), Fibrinogen und Hyaluronan (van de Stolpe and van der Saag, 1996). Leukocyten, Epithelien und ruhende Endothelzellen exprimieren kein oder geringe Mengen ICAM-1, eine Aktivierung mit inflammatorischen Cytokinen wie  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  führt zu einer gesteigerten Expression von ICAM-1 (Dustin and Springer, 1991). In Entzündungsreaktionen stellt ICAM-1 das wichtigste Adhäsionsmoleküle für Zell-Zell-Interaktionen dar.

**Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD106)** ist ein 90-110 kDa Glykoprotein mit sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen, das auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen, sowie auf einer Vielzahl anderer Zellen exprimiert ist, u.a. auf Dendritischen Zellen, Makrophagen und Fibroblasten (Bevilacqua and Nelson, 1993). Auf ruhenden

Endothelzellen ist VCAM-1 nicht zu finden, seine Expression wird durch inflammatorische Mediatoren wie z.B. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  induziert (Shimizu et al., 1992). Es interagiert mit den Integrinen  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4, Very Late Antigen-4) und  $\alpha_4\beta_7$  der Leukocyten und unterstützt den Austritt der Leukocyten aus den Blutgefäßen an Stellen der Entzündung (Bevilacqua and Nelson, 1993).

Das 120-130 kDa Glykoprotein **Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31)** besitzt sechs Immunglobulin-ähnlichen Domänen und wird hauptsächlich auf Endothelzellen im Bereich der interzellulären Verbindungen exprimiert, sowie in geringeren Mengen auf Blutplättchen, Monocyten und Granulocyten (DeLisser et al., 1994). PECAM-1 interagiert mit  $\alpha_V\beta_3$  Integrinen der Leukocyten (Buckley et al., 1996) und spielt eine wichtige Rolle in der transendothelialen Wanderung der Leukocyten durch die Verbindungsstellen vaskulärer Endothelzellen (Muller et al., 1993).

## **1.6 Modulation der zellulären Signalwege durch Kontakt mit *P. falciparum*-Antigenen und infizierten Erythrocyten**

In den letzten Jahren hat die Erforschung der Interaktionen *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrocyten mit den unterschiedlichsten Wirtszellen wachsende Bedeutung erfahren. Parasitierte Erythrocyten sind nicht nur in der Lage an Endothelzellen zu cytoadhäreren, sie können darüber hinaus auch die zellulären Signalwege verschiedenster Zelltypen modulieren (Urban et al., 1999; Yipp et al., 2003).

Durch Adhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an Dendritische Zellen wird die Reifung der Dendritischen Zellen inhibiert und dadurch ihre Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen reduziert (Urban et al., 1999). Die Prozessierung der Antigene in den DCs ist fehlerhaft und sowohl primäre als auch sekundäre Antigen-spezifische T-Zell-Antworten werden verhindert (Urban et al., 1999). Dadurch ist der Parasit in der Lage das Immunsystem des Wirtes zu regulieren, indem er die Immunantwort soweit unterdrückt um das eigene Überleben im Wirt zu sichern, aber ausreichende Kontrolle zuläßt um unkontrolliertes Wachstum zu verhindern (Good, 1999).

Auch die Cytoadhäsion parasitierter Erythrocyten an Endothelzellen scheint ein dynamischer Prozeß zu sein, der nicht ohne Einfluß auf die intrazellulären Signalwege der Endothelzellen erfolgt. Yipp et al. (Yipp et al., 2003) konnten zeigen, daß ein rekombinantes PfEMP-1 Peptid, das die minimale CD36-bindende Domäne von PfEMP-1 repräsentiert, in der Lage ist

durch Adhäsion an CD36, intrazelluläre Signalwege in humanen dermalen microvaskulären Endothelzellen (HDMEC) zu aktivieren. Die Aktivierung erfolgt dabei über Kinasen der Src-Familie und resultiert in einer Dephosphorylierung von CD36 durch eine Ecto-Alkalische Phosphatase und somit einer erhöhten Bindungsaffinität und Cytoadhäsion der parasitierten Erythrocyten (Yipp et al., 2003). Andere Studien zeigen, daß die Cokultivierung mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten zu einer TNF $\alpha$ - und LPS-unabhängigen Hochregulierung der ICAM-1 Expression in Humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) führt (Esslinger et al., 1994). Außerdem verstärkt die Interaktion der parasitierten Erythrocyten die Fähigkeiten humaner Endothelzellen die Cytoadhäsion zu vermitteln (Udeinya and Akogyeram, 1993).

Ein weiteres Phänomen ist die Induktion von Caspase-Aktivitäten und von Apoptose in Lungenendothelzellen durch Kontakt mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten *in vitro* (Pino et al., 2003). Erhöhte Apoptose-Raten konnten auch für Lymphocyten in *P. falciparum*- und *P. vivax*-infizierten Patienten *ex vivo* beobachtet werden. Es ist jedoch möglich, daß die Malaria-assoziierte Apoptose der Lymphocyten eher eine normale Antwort des Immunsystems auf eine Infektion ist als ein pathologisches Phänomen, das spezifisch durch die Krankheit ausgelöst wird (Riccio et al., 2003).

Nicht nur die Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten kann zu Veränderungen der zellulären Signalwege führen. Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker der Plasmodien, die bei der Ruptur der Schizonten freigesetzt werden, verstärken die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin auf vaskulären Endothelien (HUVEC) (Schofield et al., 1996) und induzieren die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide)-Synthase (iNOS) (Tachado et al., 1996). In Makrophagen induzieren GPI-Anker der Plasmodien die Expression von TNF $\alpha$  und Interleukin 1 (IL-1) (Schofield and Hackett, 1993). Die Aktivierung der Zellen durch GPI erfolgt über Proteintyrosinkinase- und Proteinkinase C-vermittelte Signaltransduktionswege (Tachado et al., 1996) und erfordert eine Beteiligung der NF $\kappa$ B/*c-rel* Familie der Transkriptionsfaktoren. In Endothelzellen werden Tyrosinkinasen der Src-Familie durch GPI aktiviert (Schofield et al., 1996).

Im Patienten stellt sich die Situation viel komplexer dar, da viele unterschiedliche Zelltypen durch direkte Interaktionen oder lösliche Mediatoren miteinander kommunizieren. Lösliche Mediatoren wie Cytokine, Chemokine, Stickstoffmonoxid (NO) können die Expression der Adhäsionsmoleküle regulieren und die Cytoadhäsion parasitierter Erythrocyten verändern. Eine gesteigerte Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an TNF $\alpha$ - und INF $\gamma$ -aktivierte Endothelzellen ist *in vitro* zu beobachten (McCormick et al., 1997; Treutiger et al.,

1997). Proinflammatorische Cytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{INF}\gamma$ , IL-12 und IL-18 und antiinflammatorische Cytokine wie IL-10 und Transforming growth factor (TGF)  $\beta$  sind Schlüsselmoleküle, die mit anderen Immunzellen interagieren und die Immunantwort aktivieren. Zusammen mit T-Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen tragen die Cytokine entweder zur Verbesserung oder zur Verschlechterung der Krankheit bei (Winkler et al., 1998). Bei einer Infektion mit *P. falciparum* werden hauptsächlich NK-Zellen und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen aktiviert (Lertmemongkolchai et al., 2001). Gesteigerte Konzentrationen von  $\text{INF}\gamma$ , IL-12 und IL-18 während der akuten Phase der Krankheit sind vermutlich Hinweise auf eine frühe und effektive Immunantwort, die durch Th1-Cytokine reguliert wird. In der komplizierten *P. falciparum*-Malaria ist eine gesteigerte und andauernde Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  zu beobachten, sowie eine verringerte Produktion von IL-10 und TGF $\beta$ . Dadurch wird die Produktion von  $\text{INF}\gamma$ , IL-12 und IL-18 reduziert, es kommt zu einer Verschlechterung der Krankheit (Torre et al., 2002).

NO werden sowohl krankheitsfördernde (Clark and Cowden, 1999) als auch schützende Rollen in der Malaria tropica zugeordnet. Der schützende Effekt von NO gegen *P. falciparum* erfolgt durch Inhibition des Wachstums der Parasiten (Rockett et al., 1991) und durch Abtötung intrazellulärer Parasiten durch reaktive Stickstoffmetabolite (Balmer et al., 2000). Zusätzlich zeigt NO einen anti-adhäsiven Effekt auf die Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an Endothelzellen (Serirom et al., 2003).

## 1.7 Aufbau und immunologische Funktion der Leber

Die Leber ist das größte Organ des Körpers und sie besitzt vielfältige Funktionen. Sie ist metabolisierendes, detoxifizierendes und exkretorisches Stoffwechselorgan, Blutspeicher, Harnstoffproduzent und exokrine Drüse (Storch and Welsch, 1994). Zusätzlich besitzt sie immunologische Aufgaben und ist an der Eliminierung gealterter Erythrocyten beteiligt.

Um diese Funktionen zu gewährleisten, ist ein ständiger Blutaustausch in der Leber erforderlich. Die Leberzellen fügen sich meist zu einreihigen Leberplatten zusammen, die radiär um eine Zentralvene angeordnet sind. Dadurch entsteht eine schwammartige Struktur, deren Hohlräume von einem verzweigten Kapillarnetz durchzogen sind, den sogenannten Sinusoiden. Hier findet der Stoffaustausch zwischen Blut und den Hepatocyten statt. Die enorme Auffächerung des Blutstromes bedingt eine ungewöhnlich niedrige Durchflußgeschwindigkeit von 25-250  $\mu\text{m/s}$  innerhalb des Sinusoids, im Vergleich zu

anderen Kapillaren mit 300  $\mu\text{m/s}$  (MacPhee et al., 1992; MacPhee et al., 1995). Aufgrund dieser geringen Stromgeschwindigkeit und dem geringen Durchmesser des Sinusoids kann der Blutfluß durch eine Zellblockade kurzfristig sogar vollständig zum Erliegen kommen. Dies ermöglicht einen engen Kontakt zwischen den Zellen innerhalb eines Sinusoids.

Die Sinusoide werden von den sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC = „liver sinusoidal endothelial cells“) umschlossen. Im Gegensatz zu anderen Endothelien, besitzt das sinusoidale Leberendothel keine Basalmembran und ist von dynamischen Poren in der Zellmembran, den sogenannten Fenestrae durchbrochen. Zwischen den LSEC und den Hepatocyten liegt ein 0,5-2  $\mu\text{m}$  breiter Spaltraum, der Dissé-Raum genannt wird. Er enthält Collagen-Fibrillen und andere extrazelluläre Matrixproteine. Ein direkter Zell-Zellkontakt zwischen den Zellen im Blutstrom und Hepatocyten scheint nicht zu bestehen (Limmer et al., 1998).

Die LSEC tragen zu den metabolischen Aufgaben der Leber bei, indem sie mittels spezifischer Rezeptoren, wie z.B. Mannose-, Scavenger- und Fc-Rezeptoren (Knolle and Limmer, 2001), Antigene aus dem Blut aufnehmen und durch Transcytose an die Hepatocyten weiterreichen. Wie eng metabolische und immunologische Funktionen der LSEC miteinander verbunden sind, wird deutlich, wenn man berücksichtigt, daß die endocytotisch aufgenommenen Proteine von den LSEC auch prozessiert und Fragmente davon effizient auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Dabei erfolgt die Präsentation nicht nur auf dem konventionellen endocytotischen Weg auf MHC-II-Molekülen für  $\text{CD4}^+$  T-Zellen, sondern auch auf MHC-I-Molekülen für  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, ein Vorgang der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird (Limmer et al., 2000). LSEC besitzen alle Oberflächenmoleküle, die sowohl für die Rezeptor-vermittelte Endocytose der Antigene als auch für die Interaktion mit Leukocyten und der effizienten Präsentation von Antigenen für T-Zellen notwendig sind. Zusätzlich produzieren sie eine Reihe immunmodulatorischer Cytokine, z.B.  $\text{TGF}\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, NO und Prostaglandine (Knolle and Limmer, 2001). Die Präsentation der Antigene durch LSEC kann naive T-Zellen, sowohl  $\text{CD4}^+$  als auch  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, antigenspezifisch tolerisieren (Knolle et al., 1999; Limmer et al., 2000), d.h. daß diese T-Zellen nicht mehr gegen Antigen reagieren können. Konsequenz der Antigenpräsentation durch LSEC *in vivo* ist die Induktion einer systemischen, antigenspezifischen Immuntoleranz der T-Zellen durch klonale Deletion und Anergie (Limmer et al., 2000).

Aufgrund der Fähigkeit der sinusoidalen Leberendothelzellen Immuntoleranz zu induzieren, stellt die Leber eine Nische dar, in der das Überleben einiger Pathogene im Wirt erleichtert wird. Hepatotrope Viren wie z.B. das Hepatitis B Virus oder das Hepatitis C Virus setzen

Proteine frei, die durch Präsentation der viralen Proteine auf LSEC das Entkommen des Virus vor der Immunantwort erleichtern könnten, indem die spezifische anti-virale Immunantwort verhindert wird (Knolle and Limmer, 2001). Ähnliche Mechanismen werden auch für andere hepatotrope Pathogene diskutiert.

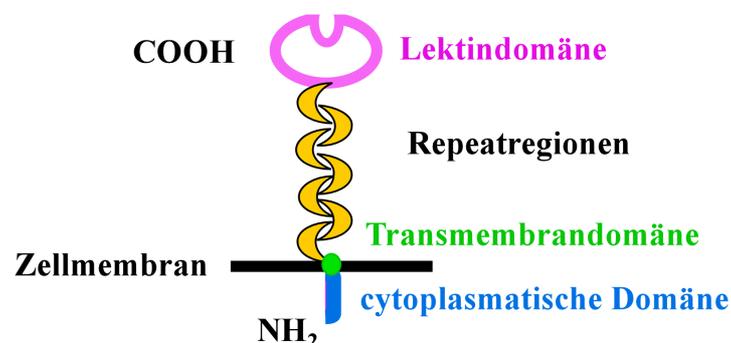
## 1.8 Die Rezeptoren L-SIGN und DC-SIGN

Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209) ist ein C-Typ-Lektin, das Interaktionen zwischen Dendritischen Zellen (DC) und T-Zellen vermittelt, indem es mit hoher Affinität an ICAM-3 (Geijtenbeek et al., 2000c) bindet. Die Interaktion der Dendritischen Zellen mit Endothelzellen erfolgt über DC-SIGN und ICAM-2 (Geijtenbeek et al., 2000a). Bindung des Glycoproteins gp120 des Humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) an DC-SIGN ermöglicht die verstärkte Infektion der T-Zellen mit HIV-1 in *trans* (Geijtenbeek et al., 2000b).

Ein weiteres Mitglied der Familie ist L-SIGN (Liver/lymph node specific ICAM-3 grabbing nonintegrin), das vor allem in der Leber und in Lymphknoten exprimiert wird (Bashirova et al., 2001), in geringeren Mengen auch in der Plazenta (Soilleux et al., 2000). Die Typ II-Membranproteine L-SIGN und DC-SIGN weisen 77% Aminosäuresequenz-Homologie auf. Sie besitzen eine N-terminale cytoplasmatische Domäne, die Internalisierungssignale und potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen enthält (Soilleux et al., 2000), sowie eine Transmembranregion. Die extrazellulären Domänen von L-SIGN und DC-SIGN bestehen aus mehreren 23 Aminosäuren langen „Repeatregionen“ und einer C-terminalen Lektindomäne (Abb. 1.4) (Bashirova et al., 2001). Homologe zu DC-SIGN konnten auch in anderen Primaten (Bashirova et al., 2003) sowie in der Maus identifiziert werden (Baribaud et al., 2001; Park et al., 2001).

Die Population der exprimierten L-SIGN und DC-SIGN Proteine ist polymorph. Zum einen konnten in der kaukasischen Bevölkerung sieben verschiedene Allele für L-SIGN gefunden werden, die sich in der Anzahl der Repeatregionen unterscheiden. Es wurden Allele mit drei bis neun Repeats identifiziert, wobei das häufigste Allel sieben Repeats enthielt (Bashirova et al., 2001). Zum anderen setzen sich die Gene für L-SIGN sowie für DC-SIGN aus sieben Exons und sechs Introns zusammen (Bashirova et al., 2001). Alternatives Splicing erzeugt eine große Vielfalt von membranständigen und löslichen Isoformen beider Proteine (Mummidi et al., 2001), die Homo- und Heterotetramere bilden können (Mitchell et al., 2001). Die Oligomerisierung erfolgt über die Repeatregionen.

Liganden für L-SIGN und DC-SIGN sind Mannose-reiche Oligosaccharide und verwandte Saccharide, die Bindung erfolgt Calcium-abhängig (Feinberg et al., 2001). DC-SIGN wird nach Bindung der Liganden in die endosomalen Kompartimente der Dendritischen Zellen internalisiert. Die Liganden werden prozessiert und auf MHC-Molekülen den T-Zellen präsentiert. Da gezeigt werden konnte, daß sowohl DC-SIGN als auch L-SIGN mit vielen unterschiedlichen Pathogenen interagieren können, u.a. mit Viren, Bakterien und Protozoen, kann vermutet werden, daß diese Rezeptoren eine Rolle in der Initiation der Pathogen-spezifischen Immunantwort und in der Ausbreitung der Infektion spielen. L-SIGN und DC-SIGN interagieren z.B. mit HIV-1 (Geijtenbeek et al., 2000b), HIV-2 (Pohlmann et al., 2001), dem humanen Cytomegalovirus (Halary et al., 2002), dem Ebolavirus (Alvarez et al., 2002; Simmons et al., 2003), dem Hepatitis C Virus (Gardner et al., 2003; Lozach et al., 2003), dem Denguevirus (Navarro-Sanchez et al., 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Geijtenbeek et al., 2003; Tailleux et al., 2003), *Leishmania pifanoi* (Colmenares et al., 2002), *Leishmania mexicana*, *Helicobacter pylori*, *Schistosoma mansoni* (Appelmelk et al., 2003) sowie mit anderen Pathogenen. Eine Interaktion von DC-SIGN mit dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus*, sowie mit den Gram-negativen Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* konnte nicht nachgewiesen werden (Appelmelk et al., 2003). Die Bindung der Pathogene an L-SIGN und DC-SIGN erfolgt hauptsächlich über Mannose-reiche Oligosaccharide an der Zelloberfläche der Pathogene (Appelmelk et al., 2003). Obwohl die meisten Oligosaccharide auf HIV-1 gp120 Mannose-reiche Strukturen sind (Mizuochi et al., 1990), scheint die Glykosylierung jedoch bei dieser Interaktion mit DC-SIGN nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Geijtenbeek et al., 2002).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Struktur von L-SIGN7**

L-SIGN7 besteht aus einer Lektindomäne, sieben sich wiederholenden Einheiten von 23 Aminosäuren Länge (Repeatregionen), einer Transmembrandomäne und einer N-terminalen cytoplasmatischen Domäne, die Internalisierungs- und Sortierungssignale enthält.

## 1.9 Ziel dieser Arbeit

Cytoadhäsion *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrocyten ist ein wichtiger Prozeß in der Pathogenese der Malaria tropica. Allerdings werden nicht alle der beschriebenen Adhäsionsrezeptoren konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert. Die Expression einiger Zelloberflächenmoleküle u.a. von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin erfolgt nur in einer entzündlichen Umgebung und erfordert eine Aktivierung der Endothelzellen. Eine Interaktion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten mit Endothelzellen resultiert in einem proadhäsiven Phänotyp der Endothelzellen, der eine gesteigerte Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten ermöglicht. Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden z.B. durch die Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten könnte zu Veränderungen in der Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Endothelzellen oder in der Sekretion immunregulatorischer Moleküle z.B. Cytokinen führen.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Veränderungen des Aktivierungszustandes primärer Endothelzellen durch Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten zu charakterisieren. Untersucht wurden die Expression einiger Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche, die Mengen verschiedener sezernierter Cytokine sowie die Änderungen im Transkriptionsstatus der durch *P. falciparum* aktivierten Endothelzellen.

Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten wird von PfEMP-1 vermittelt, das von Mitgliedern der *var* Genfamilie codiert wird und aufgrund seiner Variabilität die organspezifische Cytoadhäsion parasitierter Erythrocyten an unterschiedliche Oberflächenrezeptoren ermöglicht. Obwohl *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten in der Leber cytoadhärieren können, ist ein spezifischer Cytoadhäsionsrezeptor auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber noch nicht charakterisiert. Durch Adhäsion der parasitierten Erythrocyten in der Leber könnte die anti-parasitäre Immunantwort so verändert werden daß die Plasmodien einen Überlebensvorteil im Wirt erhalten, z.B. durch Entstehung von Immuntoleranz. Ein Molekül, das spezifisch in der Leber exprimiert ist und die Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten vermitteln könnte, ist das C-Typ Lektin L-SIGN. Im Verlauf dieser Arbeit sollte die zelluläre Lokalisation von L-SIGN in der Leber und die Funktion von L-SIGN in der Antigenaufnahme sowie in der Pathogenese der Malaria untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung und Charakterisierung neuer Adhäsionsrezeptoren für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborausstattung

Analytische Waage	Sartorius GmbH, Göttingen
Autoklav	Systemec, Wettenberg
Blotapparatur Mini Trans Blot	Biorad, München
Brutschränke:	
B5060 EC/CO <sub>2</sub>	Heraeus Instruments, Hanau
Cell Star Inkubator, cytoperm2	Heraeus Instruments, Hanau
Hera cell	Heraeus Instruments, Hanau
Computer-Hardware:	
Macintosh G4 9.1	Apple Computer inc., USA
Computer-Software	
BD CellQuest™ Pro	BD Biosciences, Heidelberg
Adobe Photoshop®5.0	Adobe Systems Inc, USA
Canvas™7.0	Deneba Software Inc., Miami, USA
EndNote 6.0	ISI Research Soft, CA, USA
MS Word 98	Microsoft Corporation, CA, USA
Netscape Navigator	Netscape Communications Corp., USA
Drucker: Phaser 750	Lexmark, Dietzenbach
Durchfluscytometer: FACSscan	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine AF 30	Scotsman
Elektrophoreseapparaturen (Agarose-Gele)	ZMBH, Abt. Feinmechanik, Heidelberg
Elektrophoreseapparaturen Sub-Cell GT	Biorad, München
Elektrophoreseapparaturen Mini-Protean® 3	Biorad, München
ELISA-Lesegerät: Spektra MAX 250	Molecular Devices, MWG BIOTECH, Ebersberg
Dynatech MR 5000	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Expositionskassette	Sigma, Taufkirchen
Filmentwicklungsmaschine Hyperprocessor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Feinwaage SBC 32	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100M	Zeiss, Jena

Gasbrenner gasprofi 1 micro	WLD-TEC
Gefrierschränke	Liebherr
Gefrierschrank –80°C, UF85-300S	Heraeus GmbH, Hanau
Gel-Fotoausdruck digit store duo	INTAS
GS Gene Linker™ UV Chamber	Biorad, München
Heizblock neoblock 1	neoLab, Heidelberg
Hybridisierungsöfen Hybrisierer HB-1D	Techne, Cambridge, UK
Hybridisierungsröhren	Techne, Cambridge, UK
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifugen Sorvall RC 5B, RC 5C	DuPont, Bad Homburg
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Lichtmikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
MACS-Gerät	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	Bachofer, Reutlingen
Mikrowellenherd Micromat	AEG
Netzgerät Power Supply Power Pac 300	Biorad, München
PCR-Maschinen: Robocycler Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
T gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter pH 537	WTW, Weilheim
Pipetman Gilson P10, P20, P200, P1000	Abimed, Langenfeld
Pipetten:8-Kanal-Pipette Multimate ME200	Abimed, Langenfeld
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Pipettierhilfe pipetus® standard	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Quarzküvetten	Hellma, Müllheim
Rotoren SS-34, GS-3, GSA, SM24	DuPont Instruments, Bad Homburg
Schüttelinkubator (37°C)	New Brunswick Scientific Co.Inc.
Schüttelinkubator Pilot Shake (37°C)	System Kühner
Schüttler GFL 3017	System Kühner
Sonifier® B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Speed Vac Concentrator	Bachofer, Degerschacht
Spectrophotometer Ultrospect III	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sterile Werkbank: Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
SterilGARD ClassII TypeA/B 3	The Baker Company, USA
Stickstofftank BT40	L'air Liquide
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus GmbH, Hanau

Tischzentrifuge MicroCen 13	HeroLab
Ultrazentrifuge RCM11206X	Sorvall
UZ-Rotor Ti 100	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA
Videosystem CS1	Cybertech, Berlin
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad Julabo 7A	Julabo
Zählkammern: Neubauer „improved“ Thoma	Labotec, Labor-Technik, Göttingen neoLab, Heidelberg
Zentrifuge J2-MC	Beckman
Zentrifuge RC5BPlus	Sorvall
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Rotanta/RR	Hettich, Tuttlingen

## 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Chamber Slides	Nunc, Wiesbaden
Cryogefäße	NALGENE®
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Dispensertips	Labotec, Labor-Technik, Göttingen
Einmalröhrchen, Polystyren- 6,0/38 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmalröhrchen, Polypropylen- 12/75 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Frischhaltefolie Saran	Roth, Karlsruhe
Glaswolle	VWR International
Handschuhe Unigloves	Unigloves GmbH, Troisdorf
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Immuno-Blot™ PVDF Membrane (0,2 µm)	Biorad, München
MACS-Säulen CS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatten MaxiSorp	Nunc, Wiesbaden
Nucleobondsäulen	Machery-Nagel
Nylonmembran (positiv geladen)	Boehringer, Mannheim
Nitrocellulosemembran	Sartorius
Objektträger	Marienfeld
Parafilm	American International Can™, Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen

Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen /Steinbrenner, Heidelberg
Pipettenspitzen, gestopft	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt
Safe lock (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10 und 25 ml)	Corning incorporation, Bodenheim
Sterilfilter (0,2 µm, 0,4 µm)	Schleicher&Schuell, Einbeck
Sterilfiltrationseinheiten	Corning incorporation, Bodenheim
Whatman™ 3MM paper	Firma Whatman Paper Company
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> (TPP)	Renner, Dannstadt-Schauernheim
Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-, 96-Loch	Nunc, Wiesbaden und Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Renner, Dannstadt-Schauernheim, Corning incorporation, Bodenheim

### 2.1.3 Chemikalien

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Sigma, Serva, J.T. Baker und AppliChem über die Chemikalienausgabe des Theoretikums der medizinischen Fakultät Heidelberg bezogen.

Acrylamid/Bis-Lösung	Serva, Heidelberg
Agarose	Gibco BRL, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Biorad, München
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto-Pepton	Difco Laboratories, Augsburg
Bradford-Reagenz	Biorad, München
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chondroitin-4-sulfat	Sigma, Taufkirchen/ Fluka, Neu-Ulm
Collagen R	Serva, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM-Medium	GibcoBRL, Karlsruhe
DMEM/F12-Medium	GibcoBRL, Karlsruhe

DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP-Kit	Peqlab, Erlangen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
FCS	PAA, Cölbe/ PAN Biotech, Aidenbach
Formalin	Merck, Darmstadt
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Gentamicin (50 mg/ml)	Gibco BRL, Karlsruhe
Giemsa (0,4%, w/v)	Sigma, Taufkirchen
D-(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin (wasserfrei)	Gerbu, Gaiberg
Guanidinthiocyanat	Sigma, Taufkirchen
HBSS	Gibco BRL, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
Heparin	Braun
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Hypoxanthin	ccPro, Neustadt
IPTG	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma, Taufkirchen
Natriumacid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10000µg/ml)	GibcoBRL, Karlsruhe
Polybrene	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640-Medium	GibcoBRL, Karlsruhe
D-Sorbitol	AppliChem, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
TMB Peroxidase Substrate	KPL Europe, Guildford, UK

Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trizol	GibcoBRL, Karlsruhe
Tween20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol FF	Sigma, Taufkirchen

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Antikörper gegen Oberflächenmoleküle

Antigen	Isotyp	Klon	Verdünnung	Quelle
anti-human ICAM-1 biotin	IgG <sub>1,κ</sub> , Maus	HA58	1:5-1:20	BD Pharmingen, Hamburg
anti-human VCAM-1 biotin	IgG <sub>1,κ</sub> , Maus	51-10C9	5-10 µg/ml	BD Pharmingen, Hamburg
anti-human E-Selektin biotin	IgG <sub>1,κ</sub> , Maus	68-5H11	5-10 µg/ml	BD Pharmingen, Hamburg
anti-human PECAM-1 PE	IgG <sub>1,κ</sub> , Maus		1:10	BD Pharmingen, Hamburg
anti-human CD44 biotin	IgG, Maus		1:10-1:20	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach (Biodesign)
anti-human CD36	IgG <sub>1</sub> , Maus	FA6-152	10 µg/ml	Immunotech, Marseille, F über Beckman Coulter
anti-L-SIGN	polyclonal	4B-3 oder 5A-2	1:50	Mary Carrington, Frederick, USA
anti-L-SIGN		604	10 µg/ml	Mary Carrington, USA
anti-DC-SIGN		501	10 µg/ml	Mary Carrington, USA
anti-SIGN		612	10 µg/ml	Mary Carrington, USA
anti-SIGN		AZN-D2	10 µg/ml	Y. van Kooyk, Amsterdam, NL
anti-SIGN		AZN-D3	10 µg/ml	Y. van Kooyk, Amsterdam, NL
anti-human α <sub>v</sub> β <sub>3</sub> -Integrin		LM609	10 µg/ml	Peter Altevogt, DKFZ, Heidelberg
anti-human α <sub>v</sub> β <sub>5</sub> -Integrin		PIF6.20 EMD 122752	10 µg/ml	P. Altevogt, DKFZ, Heidelberg
anti-CS ( <i>P. berghei</i> )		3D11	1:50	(Yoshida et al., 1980)
Streptavidin-PE			1:300	BD Pharmingen, Hamburg
Ziege-anti-Maus Ig-FITC	polyclonal		1:100	BD Pharmingen, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-IgG FITC	polyclonal		1:50	BD Pharmingen, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-488			1:300	Molecular Probes, NL
Ziege-anti-Maus-Alexa-546			1:300	Molecular Probes, NL

### 2.1.4.2 ELISA-Cytokinantikörper

Antigen	Isotyp	Klon	Verdünnung	Quelle
anti-Human IL-6	IgG <sub>1</sub> , Ratte	MQ2-13A5	2 µg/ml	BD Pharmingen, Hamburg
anti-Human IL-6 Biotin	IgG <sub>2a</sub> , Ratte	MQ2-29C3	2 µg/ml	BD Pharmingen, Hamburg
ImmunoPure Horseradish Peroxidase			1:1000	Pierce

#### *Verwendete ELISA-Kits:*

Quantikine® human IL-8	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® human IL-10	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® human MCP-1	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® human MIP-3α	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® human pro-MMP-1	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

### 2.1.5 Cytokine und Wachstumsfaktoren

Recombinantes humanes IL-6 (10000 U/ml)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Recombinantes humanes INFγ	BD Pharmingen, Hamburg
Recombinantes humanes TNFα	BD Pharmingen, Hamburg
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Becton Dickinson, Heidelberg

### 2.1.6 Enzyme

Chondroitinase ABC	Fluka, Neu-Ulm
DNA-Polymerase Pfx	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Stratagene, Heidelberg
Neuraminidase	Fluka, Neu-Ulm
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Schwalbach
RNase A	Roche, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot,
Taq DNA-Polymerase Biotaq RED	Bioline
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs, Schwalbach

## 2.1.7 Nukleinsäuren

Sequenzier-Oligonukleotide („Primer“) und „Primer“ für die PCR wurden bezogen über MWG Biotech AG, Ebersberg, Invitrogen, Karlsruhe und Sigma-Ark, Darmstadt.

DNA-Sequenzierungen wurden am ZMBH, Heidelberg und von der Firma Geneart, Regensburg durchgeführt: Single-Read-Sequenzierung mit Standardprimern oder Kundenprimern.

### 2.1.7.1 Oligonukleotide

Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen soweit vorhanden sind in Klammern angegeben.

L-SIGN-1	GGCGGCACAGGCGTTCAAATG
L-SIGN-2 ( <i>Bam</i> H I)	CGGGATCCGGACAGCGGGAAAACATG
L-SIGN-3 ( <i>Sal</i> I)	ACGCGTCGACTATTCGTCTCTGAAGCAGGC
$\alpha$ AF	GCACG(A/C)AGTTTTGC
$\alpha$ BR	GCCCATTC(G/C)TCGAACCA
3D7-745 TagA 1F	TCTATATAGAGGTAATAAG
3D7-745 TagA 1R	ACACCGGCAGTTATCCTTAGC
3D7-745 TagB 1F	TACAGTGGTAATAAGGTG
3D7-745 TagB 1R	TATCACTGCATGTTACACG
3D7-745 TagC 1F	GCTCCTAATAAAGAG
3D7-745 TagC 1R	ATGTCCACACCTATCACTAG
3D7-745 TagD 1F	ATGTTTAAGAACATTACGC
3D7-745 TagD 1R	CACTTGTCATGGGACACCTGC
3D7-745 TagA 2F	CCTAAAACCAGAGGAAGTCG
3D7-745 TagA 2R	TTGGCGACAGGCATCTTC
3D7-745 TagD 2F	GCGGAAAGCAAACAGGTGGC
3D7-745 TagD 2R	GATAGGCCGTTCGCACCTAC
MSP-1 N1	GCAGTATTGACAGGTTATGG
MSP-1 N2	GATTGAAAGGTATTTGAC
ExonII vas-C1	AAAAAACAAAATCATCAGTAGGAAATTTATTYC
ExonII 2 vas-C2	TATCCCATAAATCTGCWATWGGRTA
FCR3 S1.2 var11-F	TAATGACGTGACGTCTAGCG
FCR3 S1.2 var11-R	TAGTGATTAGCTTGGGCTCC
varCSA-708-5‘	TGATGGAATGGAAGATGAAG
varCSA-879-3‘	TGGTGTATTACTTTCTGATTGC
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
Myc-A	GGCGAATGGGTGAGTAACACG
Myc-B	CGGATAACGCTTGCACCTATG

### 2.1.7.2 Plasmide

pBabe-Puro	Morgenstern und Land (Morgenstern and Land, 1990)
pBabe-DC-SIGN	Mary Carrington, Frederick, USA
pGEM-T	Promega, Mannheim
pCR2.1	Invitrogen, Karlsruhe
pV <sub>pack</sub> GP	Clontech, Heidelberg
VSV-G	Frank Kräuss, Heidelberg über AG Schaller

### 2.1.7.3 Genomische DNA/cDNA

cDNA aus humaner Leber	Clontech, Heidelberg
genomische <i>P. falciparum</i> -DNA	Kathy Andrews, Parasitologie, Heidelberg

### 2.1.8 Größenmarker für die Elektrophorese

RNA-Leiter	New England Biolabs, Schwalbach
1 kb DNA-Leiter	New England Biolabs, Schwalbach
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Schwalbach
2-log DNA-Leiter	New England Biolabs, Schwalbach
Roti® Mark Prestained	Roth, Karlsruhe
Prestained Marker, broad range	GibcoBRL, Karlsruhe

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturmethoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Transfektion eukaryontischer Zellen

##### 2.2.1.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Zellen, die adhären in Monolayerkulturen in Petrischalen oder Flaschen wachsen, benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung regelmäßigen Wechsel des Mediums. Sie sollten vor Erreichen der vollständigen Konfluenz subkultiviert werden (Lindl, 2000).

<b>Zelllinien</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Kulturmedien</b>
CHO-K1	DSMZ GmbH, Braunschweig	RPMI 1640 10% FCS 2 mM Glutamin Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml)
CHO-745	Artur Scherf, Institut Pasteur, Paris, F	wie CHO-K1
HEK 293T	Blanche Schwappach, ZMBH	DMEM 10% FCS 2 mM Glutamin Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml)
HLEC	Jürg Gysin, Marseille, F (Muanza et al., 1996)	DMEM/F12 10% FCS 2 mM Glutamin Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml) ECGS (15 µg/ml)
HMS-97	(John et al., 2001)	wie CHO-K1
Sc1707	Jürg Gysin, Marseille, F	wie HLEC
<i>Primäre humane Endothelzellen:</i>		
HUVEC	PromoCell, Heidelberg	Endothelial Cell Growth Medium, PromoCell
HPAEC	PromoCell, Heidelberg	Endothelial Cell Growth Medium, PromoCell
HDMEC	PromoCell, Heidelberg	Endothelial Cell Growth Medium MV, PromoCell

Um adhären wachsende Zellen passagieren zu können, müssen sie durch eine Trypsin-Behandlung vom Boden der Kulturflaschen und von den Nachbarzellen gelöst werden. Um

das im Kulturmedium enthaltene FCS zu entfernen, werden die Zellen mit 10 ml HBSS (Gibco) gewaschen. Anschließend gibt man so viel Trypsin/EDTA (Gibco) auf die Zellen, daß sie gerade bedeckt sind. Sobald sich die Zellen abgelöst haben, können die freien Zellen in Medium resuspendiert und in neue Kulturschalen oder Flaschen überführt werden.

Die primären humanen Endothelzellen wurden nach Angaben des Herstellers kultiviert. Es wurden die von PromoCell empfohlenen Lösungen (DetachKit: HepesBSS, Trypsin/EDTA, TNS) und Medien verwendet.

Die Zellen werden im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das FCS wurde vor der Verwendung hitzeinaktiviert (56°C, 30 min).

#### 2.2.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Für viele Versuche ist es erforderlich definierte Zellzahlen auszuplattieren. Zu dünn ausgesäte Zellen wachsen nur sehr langsam, zu dicht ausgesäte Zellen können ihren Phänotyp verändern. In einer Neubauer-Zählkammer können Zellsuspensionen in geeigneter Verdünnung ausgezählt werden (Lindl, 2000).

$(\text{Anzahl Zellen in 4 Quadranten}/4) * 10^4 * \text{Verdünnung} = \text{Anzahl Zellen/ml}$

#### 2.2.1.1.3 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Soll eine Zelllinie nicht permanent in Kultur gehalten werden, so kann man die Zellen einfrieren. Zellen werden mittels Trypsinbehandlung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in dem entsprechenden Einfriermedium resuspendiert, in Cryoröhrchen überführt und in einer Einfrierbox (Qualifreeze, Nunc, Wiesbaden) langsam bei -80°C eingefroren. Die Einfrierbox enthält Isopropanol, das pro Minute um 1°C abkühlt. Eingefrorene Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden.

##### Einfrierlösungen:

Zelllinien:	10% DMSO	
	90% FCS	
Primäre humane Endothelzellen:	Cryo-SFM	PromoCell, Heidelberg

Zum Auftauen werden Cryoröhrchen mit den Zellen aus dem Stickstofftank genommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die primären Endothelzellen werden sofort nach dem Auftauen in eine Zellkulturflasche mit dem entsprechenden vorgewärmten Medium überführt. Zellen der verschiedenen Zelllinien werden zuerst in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und es werden 15-20 ml des entsprechenden Mediums tropfenweise zugegeben. Anschließend wird zentrifugiert (1000 rpm, 5 min), das Zellpellet in Medium resuspendiert und in die Zellkulturflaschen überführt. Am nächsten Tag wird bei allen aufgetauten Zellen das Medium gewechselt.

### 2.2.1.1.4 Retroviraler Gentransfer in eukaryontische Zellen

Es gibt viele Methoden zur stabilen Transfektion eukaryontischer Zellen. Retrovirale Vektoren sind infektiöse Viren, die verwendet werden, um ein nicht-virales Gen in mitotische Zellen zu transferieren. Ein Vorteil ist, daß sie ihr virales Genom in die Wirtschromosomen integrieren und so den stabilen Gentransfer in eukaryontische Zellen erleichtern.

HEK 293T-Zellen werden 4 h vor der Transfektion in CollagenR-beschichtete 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausplattiert. Die Beschichtung der Zellkulturflaschen erfolgt mit 0,2 mg/ml CollagenR (Serva) für 60 min bei 37°C, anschließend wird zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und die Zellkulturflasche getrocknet. Für die Herstellung des Transfektionsmixes werden 30 µl Fugene™ 6 Transfection Reagent (Roche, Mannheim) zu 300 µl Optimem-Medium (GibcoBRL) pipettiert und gemischt. Anschließend gibt man 25-30 µl DNA-Lösung, die je 4 µg der folgenden Plasmide: pV<sub>pack</sub>GP, VSV-G und pBabe-L-SIGN7 enthält, dazu und mischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wird der Transfektionsmix zu den HEK 293T Zellen pipettiert und gut gemischt. Nach 8 h wird das Medium durch 9 ml frisches DMEM-Medium ersetzt. 36 h nach der Transfektion wird der virushaltige Überstand geerntet und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, um die Viren von zellulären Bestandteilen zu befreien. Es wird Polybrene (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert) zu einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugegeben. Mitotische Zellen werden bei einer Konfluenz von ungefähr 70% mit 4 ml Virusüberstand infiziert. Die Zellen wurden 24 h vor der Infektion in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausplattiert. 12 h nach der Infektion werden 4 ml des für die Zellen geeigneten Mediums (8 µg/ml Polybrene) zu den Zellen gegeben, nach weiteren 12 h wird das Medium durch 20 ml des entsprechenden Mediums ersetzt. Die Analyse der Zellen erfolgt nach weiteren 24 h.

### 2.2.1.2 Nachweis von Mycoplasmen mittels PCR

Mycoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten. Sie sind in ihrer Form variabel, ihre Größe schwankt zwischen 0,22 und 0,2 µm, d.h. sie können die üblichen Sterilfilter mit Porengrößen um 0,2 µm passieren. Kontaminationen von Zellkulturen mit Mycoplasmen sind häufig, lang andauernd und meist schwierig zu behandeln, jedoch mittels PCR leicht zu identifizieren (Lindl, 2000).

Getestet werden Medienüberstände konfluenten Zellen bzw. von Parasitenkulturen mit höherer Parasitämie. Dabei werden 100 µl Zellkulturüberstand 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend 5 s bei 13000 rpm abzentrifugiert.

<u>Bedingungen für 1 Ansatz:</u>	<u>PCR-Programm</u>
5 µl 10x Taq-Reaktionspuffer	1) 94°C, 5 min
10 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub>	2) 94°C, 1 min
1 µl 10 mM dNTPs	3) 60°C, 1 min
2,5 µl Primer Myco-A (20 µM)	4) 72°C, 1 min 30 sec
2,5 µl Primer Myco-B (20 µM)	2)-4) 30 Zyklen
0,5 µl Taq (1 U/µl)	5) 72°C, 7 min
<u>26,9 µl H<sub>2</sub>O</u>	6) 4°C
48 µl Σ	

Für die PCR werden pro Ansatz 2 µl des erhitzten Zellkulturüberstand bzw. der Positivkontrolle oder H<sub>2</sub>O zugegeben. Anschließend werden 5 µl PCR-Ansatz auf einem 1,5%-Agarosegel analysiert. Bei einer Mycoplasmen-Kontamination erscheint nach der PCR eine 500 bp-Bande.

Zum Mycoplasmen-Nachweis wurden außerdem folgende Kits nach Angaben der Hersteller verwendet: Mycoplasma Plus™ PCR Primer Set (Stratagene, Heidelberg) und VenorGeM® (Minerva Biolabs, Berlin).

### 2.2.1.3 Methoden zur Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

#### 2.2.1.3.1 Kultivierung von *P. falciparum* *in vitro*

Die erythrocytären Parasitenstadien von *P. falciparum* können kontinuierlich in Kultur gehalten werden (Trager and Jensen, 1976).

Erythrocytäre Stadien von *P. falciparum* werden in Petri-Schalen für Gewebekultur mit 10 cm Durchmesser kultiviert. Pro Schale verwendet man 14 ml Parasitenmedium und 0,5 ml A<sup>+</sup> Erythrocyten, so daß der Hämatokrit ~5% beträgt. Werden größere Mengen Parasiten benötigt, können Parasiten in Petri-Schalen mit 25 cm Durchmesser kultiviert werden (30 ml Parasitenmedium, 1,5 ml Erythrocyten). Die Kulturen werden im Inkubator bei 37°C, 3% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> kultiviert.

Alle zwei bis drei Tage wird die Parasitämie mittels Blutausstrich kontrolliert und die Kulturen verdünnt bzw. das Medium gewechselt. Beim Mediumwechsel wird das überstehende Medium über den sedimentierten infizierten Erythrocyten abgenommen und durch 14 ml neues Medium ersetzt. Dabei werden die Erythrocyten resuspendiert. Die

Parasitämie der Kulturen sollte 5-10% nicht übersteigen, da toxische Abbauprodukte von den Parasiten in das Medium abgegeben werden und zum Absterben der Parasiten führen können. Zur Verdünnung und weiteren Erhaltung der Kultur beimpft man eine neue Petri-Schale mit frischem Medium und Erythrocyten mit der gewünschten Menge infizierter Erythrocyten der Ausgangsplatte. Benötigt man Parasitenkulturen mit Parasitämien über 10%, so erreicht man diese durch Erniedrigung des Hämatokrits, d.h. für eine 10 cm Petri-Schale verwendet man nur z.B. 0,1 ml Erythrocyten und 15 ml Parasitenmedium (Schlichtherle et al., 2000).

### Verwendete *Plasmodium falciparum*-Stämme:

FCR3	Gambia, (Scherf et al., 1998)
3D7	Niederlande, (Rosario, 1981)
ITO4-A4	(Roberts et al., 1992)
ItG-ICAM	(Ockenhouse et al., 1992)

### Aufbereitung des humanen Serums:

Humanes Serum (A<sup>+</sup>) wird aus Blutplasma gewonnen, indem die Gerinnungsfaktoren entzogen werden. Um Qualitätsunterschiede auszugleichen wird das Plasma verschiedener Spender unter sterilen Bedingungen gemischt und anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert. Pro 50 ml Plasma werden 800 µl 1M CaCl<sub>2</sub> (sterilfiltriert) zugegeben. Das Plasma wird 30 min bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wird das geronnene Fibrin abzentrifugiert (4000 rpm, 30 min), das Serum für 30 min bei 56°C inaktiviert und ohne den Überstand abzunehmen bei -20°C gelagert.

### Aufbereitung der humanen Erythrocyten:

Das Erythrocytenkonzentrat stammt von einem Spender der Blutgruppe A, Rhesus<sup>+</sup>. Erythrocyten werden in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert, mit 10 ml RPMI 1640 überschichtet und bei 2300 rpm für 4 min zentrifugiert. Dabei muß bei 300 rpm die Bremse ausgeschaltet werden. Die Erythrocyten können zwei bis drei Wochen verwendet werden.

Humanes Blutplasma und Erythrocytenkonzentrat (leukocytenarm) wurden vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes Heidelberg bezogen.

### Medium zur Kultivierung von *P. falciparum* (Parasitenmedium):

RPMI 1640 mit 25 mM HEPES, L-Glutamin, NaHCO<sub>3</sub>  
10% humanes Serum (A<sup>+</sup>)  
10 mM Hypoxanthin  
4 µg/ml Gentamicin

### 2.2.1.3.2 Mikroskopische Darstellung von *P. falciparum* mittels Giemsa-Färbung

Zur Unterscheidung der einzelnen Parasitenstadien und zur Bestimmung der Parasitämie einer Kultur wird ein Blutausstrich gemacht, der anschließend mit Giemsa gefärbt wird.

Sedimentierte Erythrocyten werden mit einer Pipette vom Boden der Petri-Schale abgenommen, auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Der Ausstrich wird luftgetrocknet, in Methanol fixiert und anschließend in frisch angesetzter Giemsa-Färbelösung (1:10 in VE-Wasser) für 5-20 min gefärbt. Die gefärbten Ausstriche werden mit VE-Wasser abgespült, getrocknet und bei 100-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv am Lichtmikroskop angeschaut.

### 2.2.1.3.3 Bestimmung der Parasitämie und des Hämatokrits

Die Parasitämie gibt die prozentuale Anzahl *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an. Zur Bestimmung der Parasitämie wird ein Bereich des Objektträgers mit einlagiger Schicht Erythrocyten ausgewählt. In zehn nebeneinanderliegenden Sichtfeldern wird die Anzahl der Erythrocyten und der Parasiten ausgezählt. Mehrfachinfektionen werden einfach gezählt.

Die Parasitämie berechnet sich wie folgt:

$$(\text{Anzahl Parasiten}/\text{Anzahl Erythrocyten}) * 100 = \text{Parasitämie in \%}$$

Für viele Experimente ist es von großer Bedeutung die Anzahl der Parasiten in einem definierten Volumen zu bestimmen. In einer Thoma-Zählkammer können Parasitensuspensionen in geeigneter Verdünnung ausgezählt werden.

Der Hämatokrit berechnet sich wie folgt:

$$((\text{Anzahl Erythrocyten}/16)/16)*4000*\text{Verdünnung}*1000 = \text{Anzahl Erythrocyten/ml}$$

### 2.2.1.3.4 Einfrieren von Parasiten

Das Einfrieren der Parasiten ist nur im Ringstadium möglich und die Parasitämie der Ringstadien sollte nicht unter 3% liegen, so daß die Parasiten nach dem Auftauen schnell anwachsen. Infizierte Erythrocyten einer 10 cm-Schale werden für 2 min bei 1900 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Volumen der sedimentierten Erythrocyten bestimmt. Es wird das gleiche Volumen einer steril filtrierten Einfrierlösung (28% Glycerol, 3% Sorbitol, 0,65% NaCl) dazu gegeben, gemischt und die Suspension in ein Cryoröhrchen überführt. Parasiten werden in einem Gemisch aus 99% Ethanol und Trockeneis für 15 min eingefroren. Die Parasiten werden mindestens einen Tag bei -80°C gelagert, bevor sie in einem Flüssigstickstofftank bei -196°C deponiert werden.

### 2.2.1.3.5 Auftauen von Parasiten

Cryoröhrchen mit den Parasiten werden aus dem Stickstofftank genommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Das Blut wird sofort in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Pro 1 ml Blut werden 0,2 ml 12% NaCl tropfenweise unter ständigem Mischen zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT, werden 5 ml 1,6 % NaCl-Lösung langsam und unter ständigem Schütteln zugegeben. Es wird für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 5 ml 0,9% NaCl/0,2% Glucose tropfenweise unter ständigem Mischen zugegeben und nach 5-minütiger Inkubation bei RT kann die Parasitensuspension abzentrifugiert werden (1900 rpm, 2 min, RT). Das Parasitenpellet wird mit 25 ml RPMI 1640 gewaschen, anschließend in 13 ml Parasitenmedium resuspendiert, in eine Petri-Schale überführt und es werden 0,5 ml Erythrocyten zugegeben.

Alle benötigten Salzlösungen werden sterilfiltriert oder autoklaviert und können bei 4°C gelagert werden. Vor Gebrauch werden sie bei 37°C aufgewärmt.

### 2.2.1.3.6 Synchronisation von *P. falciparum*-Kulturen mit Sorbitol

Kontinuierliche Kultur von *P. falciparum* führt zu einem asynchronen Wachstum der Parasiten. Für einige Versuche ist es deshalb notwendig die Parasiten zu synchronisieren.

Eine asynchrone Parasitenkultur wird abzentrifugiert (1900 rpm, 2 min, RT) und das Pellet in 9 Volumen sterilem 5% D-Sorbitol (z.B. 4,5 ml pro 0,5 ml Erythrocyten) resuspendiert. Bei der Synchronisation, dringt das Sorbitol in das tubulär-vesikuläre System der Parasiten ein, das bei Ringstadien noch nicht so stark ausgeprägt ist. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT wird erneut zentrifugiert (1900 rpm, 2 min, RT) und das Pellet in Parasitenmedium resuspendiert. Dabei platzen alle späten Parasitenstadien aufgrund eines osmotischen Schocks beim Wechsel von Sorbitol zu RPMI 1640 (Lambros and Vanderberg, 1979). Kulturen sollten deshalb nur synchronisiert werden, wenn überwiegend Ringstadien vorhanden sind. Um hoch synchrone Kulturen von *P. falciparum* zu erhalten, sollte die Prozedur nach einem Zyklus (~48 h) wiederholt werden. Um Parasiten vollständig zu synchronisieren kann die Synchronisation nach 4-6 h wiederholt werden, da dann zuvor reifere Ringstadien, die nun schon Trophozoiten sind, ebenfalls erfasst werden.

### 2.2.1.3.7 Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch Gelatine-Sedimentation

Für einige Versuche werden Trophozoiten und Schizonten in höheren Parasitämien benötigt als durch normale Kulturbedingungen erreicht werden. Durch Gelatine-Sedimentation kann

man spätere Parasitenstadien anreichern, ohne daß die Parasiten geschädigt werden (Jensen, 1978).

Eine Parasitenkultur, die vor allem spätere Parasitenstadien enthält, wird abzentrifugiert (1900 rpm, 2 min, RT) und das Pellet (0,5 ml) in 4,5 ml 0,5% Gelatine resuspendiert. Nach 30-60 min haben sich die Phasen getrennt. Der Überstand enthält die Trophozoiten und Schizonten, das Pellet uninfizierte Erythrocyten, Ringstadien, „knobless“ spätere Stadien und Rosetten.

Der Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (1900 rpm, 2 min, RT). Die PRBCs werden einmal mit 10 ml RPMI 1640 gewaschen und können anschließend zurück in Kultur gegeben oder in Bindungsexperimenten analysiert werden.

### Herstellung der 0,5% Gelatine-Lösung:

2,5 g Gelatine werden in 500 ml RPMI 1640 für 30 min bei 56°C gelöst. Ist die Lösung auf 37°C abgekühlt, kann sie steril filtriert und bei 4°C gelagert werden.

### **2.2.1.3.8 Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch magnetische Separation**

Malariaparasiten verstoffwechseln das Hämoglobin der Erythrocyten, wobei unlösliche, oxidierte Häm-Produkte entstehen, die als Hämozoin polymerisieren. Aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften des Hämozoin, lassen sich Trophozoiten und Schizonten mittels magnetischer Separation von nicht-infizierten Erythrocyten und Parasiten im Ringstadium trennen (Uhlemann et al., 2000). Mit dieser Methode erhält man Parasitämien bis zu 95-99%.

Die magnetischen Säulen (MACS Separation Columns CS) werden nach Angaben des Herstellers in den Magneten (Vario MACS, Miltenyi Biotec) eingespannt und mit MACS-Puffer äquilibriert. Die Parasiten können anschließend direkt in Kulturmedium auf die Säule gegeben werden, wobei die Parasiten die Säule langsam durchlaufen sollten, damit Trophozoiten und Schizonten gut binden können. Die Säule wird so lange mit MACS-Puffer gewaschen (ungefähr 5-6 Säulenvolumen), bis der Durchfluss klar ist und keine Erythrocyten mehr enthält. Anschließend wird die Säule aus dem Magneten entfernt und die gebundenen infizierten Erythrocyten können mit ausreichenden Mengen MACS-Puffer eluiert werden. Das Eluat wird zentrifugiert (1900 rpm, 2 min, RT) und das Parasitenpellet in dem gewünschten Puffer resuspendiert.

### MACS-Puffer:

1x PBS/0,5% BSA%/2 mM EDTA

### 2.2.1.3.9 Metabolische Markierung *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten

Da infizierte Erythrocyten im Vergleich zu nicht-infizierten Erythrocyten einen deutlich höheren Stoffwechsel besitzen, ist es möglich die Parasitenproteine infizierter Erythrocyten selektiv durch den Einbau von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin und L-[<sup>35</sup>S]-Cystein zu markieren.

Für die Markierung werden Parasiten im Ringstadium und einer Parasitämie von ungefähr 5% verwendet. Das Parasitenmedium einer 25 cm-Kulturschale wird durch 20 ml frisches Parasitenmedium ersetzt und es werden 100 µCi PRO-MIX™ (L-[<sup>35</sup>S] *in vitro* Cell Labelling Mix, Amersham Pharmacia Biotech) zugegeben. Die Parasiten werden für 20 h im Inkubator kultiviert und können anschließend für Experimente verwendet werden. Um Kontaminationen durch Aerosole zu vermeiden wird die Kulturschale in einem zweiten Gefäß, das Aktivkohle enthält, in den Inkubator gestellt.

### 2.2.1.4 *P. falciparum*-Adhäsionsversuche

*P. falciparum*-infizierte Erythrocyten besitzen die Fähigkeit mit Wirtszell-Rezeptoren zu interagieren und zu adhären. Da Parasiten einer Population verschiedene PfEMP-1 Moleküle exprimieren und somit unterschiedliche Bindungsphänotypen besitzen, werden die Parasiten für Bindungsexperimente auf einen speziellen Phänotyp selektioniert.

Für die Adhäsionsversuche (Pouvelle et al., 1997) werden Trophozoiten und Schizonten mittels Gelatine-Sedimentation angereichert und die Parasiten in Bindungspuffer in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  PRBCs/ml resuspendiert. Die Zellen werden zwei bis drei Tage vor dem Experiment ausplattiert und sie sollten eine Konfluenz von 80-90% besitzen. Die Zellen werden einmal mit Bindungspuffer gewaschen, bevor die Parasiten-Suspension zugegeben wird.

Eventuell ist es notwendig die Zellen vor dem Adhäsionsversuch mit Enzymen zu behandeln, um einzelne Komponenten z.B. Oligosaccharide von der Zelloberfläche zu entfernen. Chondroitinase ABC wird in einer Konzentration von 0,5 U/ml in serumfreiem Medium eingesetzt und für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Zellen werden mit Neuraminidase (13,5 U/ml) in serumfreiem Medium für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach allen Enzymbehandlungen werden die Zellen dreimal mit der entsprechenden Menge an Puffer gewaschen, bevor die Parasiten zugegeben werden.

Blockierende Antikörper, die gegen zelluläre Antigene gerichtet sind, werden in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt. Die Zellen werden mit den Antikörpern für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal gewaschen.

Lösliche Inhibitoren sind CSA (10 mg/ml in PBS, Fluka) und Heparin (10 mg/ml in PBS, Braun), die in einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt werden. PRBCs werden 30 min mit diesen Inhibitoren inkubiert, bevor sie zu den Zellen gegeben werden.

Die Bindung der Parasiten an die Zellen erfolgt für 1 h bei RT, dabei werden die Parasiten alle 15 min durch Schütteln der Zellkulturflasche oder der Platte resuspendiert. Anschließend werden die Zellen vorsichtig gewaschen, bis unter dem Mikroskop keine frei schwimmenden Parasiten mehr zu beobachten sind. Der Strahl der Pipette sollte immer an den Rand der Flasche oder Platte gerichtet sein, niemals auf die Zellen, da gebundene Parasiten sonst abgespült werden. Sollen die Parasiten zurück in Kultur genommen werden, so werden die Parasiten mit 2 x 10 ml Parasitenmedium abgespült, indem der Pipettenstrahl direkt auf die Zellen gerichtet wird. Die Parasiten werden nach Zugabe von 1 ml Erythrocyten in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen kultiviert, so daß sich eventuell abgelöste CHO-Zellen an den Flaschenboden heften können. Am nächsten Tag können die Parasiten, die sich jetzt im Ringstadium befinden, problemlos aus der Flasche in normale Zellkultur-Petrischalen überführt werden.

Soll die Anzahl der gebundenen infizierten Erythrocyten bestimmt werden, ohne daß die Parasiten zurück in Kultur genommen werden sollen, so werden die gewaschenen Zellen mit 2% Glutaraldehyd in Bindungspuffer für 30 min bei RT fixiert. Die fixierten Zellen werden mit Giemsa (1:10 in H<sub>2</sub>O) für 15-20 min gefärbt, mit H<sub>2</sub>O gespült und getrocknet. Anschließend wird die Anzahl der Zellen und der gebundenen PRBCs für jeden Ansatz in vier verschiedenen Gesichtsfeldern bestimmt. Jeder Adhäsionsversuch sollte dreimal durchgeführt werden. Es wird die Anzahl der gebundenen PRBCs pro 100 Zellen (± Standardfehler des Mittelwerts (SEM)) angegeben. Für die statistische Auswertung der Inhibitionsexperimente wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Experimente und der Inhibitoren im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle durchgeführt.

### Verwendete Puffervolumen:

Adhäsionsversuche in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen: Bindung: 10 ml                      Waschen: 10 ml

Adhäsionsversuche in 24-Loch-Platten: Bindung: 300 µl                      Waschen: 0,5 ml

### Waschpuffer:

Ein Behälter mit RPMI 1640-Pulver (mit HEPES, ohne Natriumhydrogencarbonat) wird in 950 ml H<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 6,8 eingestellt. Das Volumen wird auf 1 l aufgefüllt, Gentamicin zu einer Endkonzentration von 4 µg/ml zugegeben und der Puffer anschließend steril filtriert.

### Bindungspuffer:

Zu 500 ml RPMI 1640, pH 6,8 gibt man 50 ml humanes Serum (10% Endkonzentration), 4 µg/ml Gentamicin

### Bindungspuffer und Waschpuffer L-SIGN:

500 ml RPMI 1640, pH 6,8/ 10% FCS, 4 µg/ml Gentamicin

### **2.2.1.5 Aktivierungsversuche**

Endothelzellen lassen sich durch verschiedene Stimuli aktivieren, z.B. TNF $\alpha$ , bakterielle Endotoxine (LPS), GPI-verankerte Proteine verschiedener Pathogene (Bevilacqua, 1993). Auch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten sind in der Lage Endothelzellen zu aktivieren (Esslinger et al., 1994).

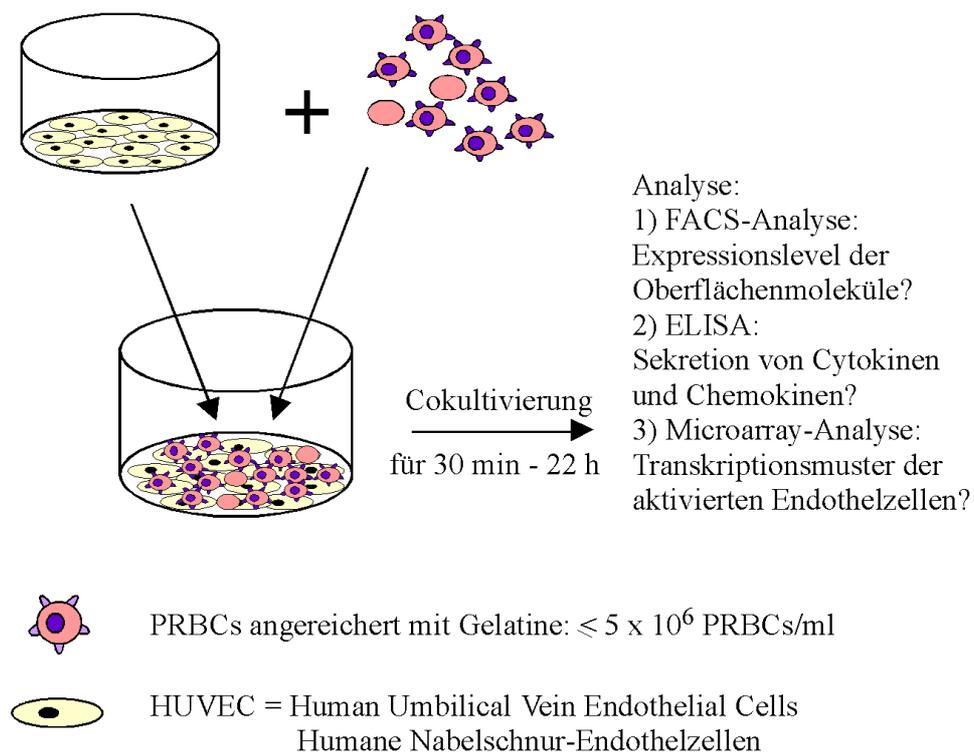
Humane primäre Endothelzellen werden zwei bis drei Tage vor dem Experiment in 6-, 12- oder 24-Lochplatten ausgesät. Am Tag des Experiments sollten sie eine Konfluenz von 80-90% besitzen. Um zu untersuchen, ob *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten (PRBCs) Endothelzellen aktivieren können, werden Endothelzellen und PRBCs für einen bestimmten Zeitraum kokultiviert. Die *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten werden durch Gelatine-Sedimentation angereichert, so daß für die Aktivierungsstudien hauptsächlich Trophozoiten und Schizonten mit einer Parasitämie von 40-80% verwendet werden. Aufgrund der höheren Parasitendichte wird dadurch die Wahrscheinlichkeit der Interaktion der PRBCs mit Endothelzellen erhöht. Die durch Gelatine-Sedimentation angereicherten Trophozoiten und Schizonten werden, einmal mit RPMI 1640, 5% FCS, Gentamicin gewaschen und in Endothelzellmedium resuspendiert. Für die Experimente werden  $5 \times 10^6$  PRBCs/ml in Endothelzellmedium eingesetzt. Als Negativkontrollen dienen eine Mediumkontrolle und eine Erythrocyten-Kontrolle. Die Erythrocyten werden mindestens einen Tag in Parasitenmedium kultiviert und ebenfalls mit Gelatine behandelt, um eventuelle Einflüsse der Kulturbedingungen oder der Gelatine-Sedimentation auf die Aktivierung ausschließen zu können. Die Anzahl der eingesetzten Erythrocyten wurde an die Gesamtzellzahl in der Parasitenprobe angepasst. Als Positivkontrolle für die Aktivierbarkeit der Endothelzellen wird TNF $\alpha$  (10 ng/ml) verwendet. Die Versuche werden in Endothelzellmedium ohne Hydrocortison und Amphotericin durchgeführt.

Die Kokultivierung erfolgt für 30 min bis 22 h, die Analyse der Endothelzellen bzw. der Zellkulturüberstände werden in der Regel 18-22 h nach Beginn des Experiments durchgeführt. Wird die Coinkubation nach kurzer Zeit gestoppt, die Zellen jedoch ÜN

weiterkultiviert, so erfolgen eventuelle Waschschrte mit Endothelzellmedium. Die Experimente werden nach verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und die Zellen und Überstände analysiert.

Für die Analyse sezernierter, löslicher Proteine werden die Zellkultur-Überstände abgenommen, in ein 1,5 oder 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bis zur Analyse mittels ELISA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Für die Bestimmung der Expressionslevel der Oberflächenmoleküle im Durchflusscytometer werden die Zellen zweimal mit Medium und einmal mit PBS gewaschen, mittels Trypsin-Behandlung abgelöst und in FACS-Puffer (siehe 2.2.2.1.1) aufgenommen. Die Zellen werden 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, um das Trypsin von den Zellen zu entfernen. Die Zellen werden anschließend in FACS-Puffer resuspendiert und können für die Analyse im Durchfluscytometer vorbereitet werden (siehe 2.2.2.1).



**Abb. 2.1: In vitro-Modellsystem zur Untersuchung der Aktivierung**

HUVEC-Zellen werden zwei bis drei Tage vor den Experimenten in 6-, 12- oder 24-Lochplatten ausgesät. Maximal  $5 \times 10^6$  PRBCs/ml, werden für höchstens 22 h mit den primären Endothelzellen kokultiviert. Für die Analyse der exprimierten Oberflächenmoleküle, werden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und im Durchfluscytometer analysiert. Sezernierte Moleküle werden mittels ELISA im Zellkulturüberstand gemessen. Microarray-Analysen geben Aufschluß über das Transkriptionsmuster PRBC-aktivierter Endothelzellen.

Für die Microarray-Analyse werden die Zellen zweimal mit Endothelzellmedium und einmal mit sterilem HBSS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in Endothelzellmedium resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1500 rpm, 5 min, 8°C) werden die Zellpellets in 1 ml HBSS resuspendiert, in ein Cryoröhrchen überführt und erneut zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 8°C). Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Pellet wird bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

### 2.2.1.6 Dextran-Aufnahme-Assays

Die phagocytotischen Eigenschaften einer Zelllinie kann man untersuchen, indem man Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Substrat inkubiert und anschließend die Fluoreszenz der Zellen untersucht.

Am Tag vor dem Experiment werden  $7 \times 10^5$  CHO-Zellen bzw. CHO<sup>L-SIGN2</sup>-Zellen pro Loch einer 24-Lochplatte ausplattiert. Die Zellen werden mit 100 µg/ml Dextran-FITC (MW 500 kDa, Sigma) für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend analysiert. Um die L-SIGN spezifische Internalisierung des Substrats zu untersuchen, werden die Zellen mit α-SIGN „612“ (20 µg/ml) für 1 h bei 37°C vorinkubiert, bevor das Substrat zugegeben wird. Der Inhibitor Mannan (Sigma) wird in unterschiedlichen Konzentrationen (0-100 µg/ml) zusammen mit dem Substrat Dextran-FITC direkt zu den Zellen gegeben.

Für die Analyse im Durchflusscytometer werden die Zellen viermal mit PBS gewaschen, durch Trypsin-Behandlung abgelöst und die Intensität der Fluoreszenz bestimmt. Je stärker die detektierte Fluoreszenz ist, um so mehr Substrat binden bzw. internalisieren die Zellen. Um die Lokalisation des gebundenen und aufgenommenen Substrats in der Zelle zu bestimmen, werden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 4% Formalin in PBS fixiert und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

### 2.2.1.7 Sporozoiten-Invasionsassay

*Plasmodium*-Sporozoiten besitzen eine Maschinerie, die ihnen das schnelle Eindringen in Hepatocyten ermöglicht. Mittels Invasionsassays können Faktoren bestimmt werden, die sowohl auf der Seite des Parasiten als auch auf Seite der Wirtszellen für die Invasion von Bedeutung sind.

Zellen werden zwei bis drei Tage vor dem Experiment in Chamber Slides (Nunc, Wiesbaden) ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert. Sporozoiten werden aus *Anopheles*-Mücken

isoliert, in CHO-Medium resuspendiert und auf eine Parasitenanzahl von  $1-2 \times 10^5$  eingestellt. Pro Loch gibt man  $1-2 \times 10^4$  Sporozoiten in 100  $\mu\text{l}$  zu den Zellen und inkubiert für 90 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator. Anschließend wird der Überstand abgenommen, die Zellen zweimal mit 400  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium gewaschen und mit 400  $\mu\text{l}$  4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4 für 10 min bei RT fixiert. Zur Detektion und zur Unterscheidung der extra- und intrazellulären Sporozoiten werden die Parasiten mit anti-CS Antikörpern (3D11) sichtbar gemacht. Das Verhältnis der intrazellulären Sporozoiten wird für 4 x 100 Sporozoiten pro Ansatz unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Angegeben werden die intrazellulären Sporozoiten im Vergleich zu der Gesamtzahl der Sporozoiten in % ( $\pm$  Standardabweichung).

## 2.2.2 Immunfluorometrische Methoden

### 2.2.2.1 Immunfluoreszenzmessungen am Durchfluscytometer

Die Durchfluscytometrie erlaubt die Untersuchung der Zellgröße, Granularität und der Immunfluoreszenzmarkierung einzelner Zellen in Suspension. Mittels spezieller Fließparameter werden die Zellen einzeln an einer monochromatischen Lichtquelle (Argon-Laser  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) vorbeigeführt. Die Streuung unter einem Winkel von  $2-10^\circ$  des geradewegs durch die Zelle gehenden Strahles, dem sogenannten 'forward scatter' (FS), gibt Hinweis auf die Zellgröße. Die Streuung des Lichtstrahles unter einem Winkel von  $90^\circ$ , dem sogenannten 'sideward scatter' (SS), ermöglicht Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle. Fluorochrome, die zur Immunfluoreszenzmarkierung von Zellantigenen verwendet werden, können durch das Laserlicht kurzfristig in einen angeregten Zustand überführt werden. Beim Übergang des Fluorochroms zurück in den Grundzustand wird die Energie in Form eines Photons mit einer charakteristischen Wellenlänge frei. Diese Photonen werden von hochempfindlichen Photozellen (Photomultiplier) detektiert. Diese Messung von Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität ermöglicht eine Charakterisierung der Zellen.

#### 2.2.2.1.1 Färbungen von Oberflächenantigenen

Für die Färbung der Oberflächenantigene werden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Zellkulturplatten abgelöst, in FACS-Puffer (PBS, 2% FCS, 0,1% Natriumazid) aufgenommen und abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min). Die Zellen werden in FACS-Puffer resuspendiert, auf 96-Loch Mikrotiterplatten mit spitzem Boden verteilt und für 3 min bei 2000 rpm abzentrifugiert. Es werden  $2-10 \times 10^5$  Zellen pro Färbung eingesetzt. Für alle Färbungen und

Waschsschritte wird FACS-Puffer verwendet. Zellpellets werden in 50-100 µl der ersten Antikörperlösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Zellen werden einmal mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen, dann in 100 µl der zweiten Antikörperlösung für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen. Die gefärbten Zellen werden in 100 µl PBS resuspendiert und in ein 6,0/38 mm Einmalröhrchen überführt, in die 100 µl 4% Formalin in PBS vorgelegt werden. Als Ständer für die Einmalröhrchen werden 96-Loch Mikrotiterplatten mit flachem Boden verwendet. Eine etwaige Lagerung der gefärbten Zellen erfolgt bei 4°C im Dunkeln.

Die Messungen erfolgte nach Entfernen der Übernadel (*'outer sleeve'*). Zur Einstellung des Durchfluscytometers wurden ungefärbte Zellen und Einzelfärbungen verwendet. Die Bedienung der Durchfluscytometer erfolgte nach Herstellerangaben und die Daten wurden mit den mitgelieferten Programmen *'CellQuest'* und *'CellQuest Pro'* ausgewertet.

### **2.2.2.2 Immunfluoreszenz-Analysen am Konfokalen Mikroskop (IFA)**

Durch Immunfluoreszenz-Analysen kann die Expression und die zelluläre Lokalisierung eines Proteins in fixierten Zellen oder Geweben unmittelbar durch Betrachtung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Nach der Vorbehandlung der Zellen (Fixieren/Permeabilisieren) werden sie mit einem, für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper behandelt. In einem zweiten Schritt wird an diesen ein zweiter Antikörper gebunden, an den ein Fluoreszenz-Farbstoff (z.B. Alexa-488 oder Alexa-546) gekoppelt ist. Durch Betrachtung unter UV-Licht mit einem Filter der entsprechenden Wellenlänge kann man die fluoreszierenden Immunkomplexe in den Zellen erkennen.

#### **2.2.2.2.1 Immunfluoreszenz-Färbungen**

Mit dieser Methode lassen sich extra- und intrazellulär lokalisierte Antigene unterscheiden, da intrazelluläre Proteine nur eine grüne Fluoreszenz hervorrufen, extrazelluläre Antigene hingegen mit beiden sekundären Antikörpern detektiert werden und eine rote und grüne Fluoreszenz erzeugen (Renia et al., 1988).

Für die Immunfluoreszenz-Analyse werden Zellen in Chamber Slides (Nunc, Wiesbaden) ausplattiert und zwei bis drei Tage kultiviert. Anschließend wird der Überstand abgenommen, die Zellen mit 400 µl 4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4 für 10 min bei RT fixiert, zweimal mit 400 µl PBS gewaschen und ÜN mit PBS/ 10% FCS blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (100 µl/ Loch) erfolgt für 45 min. Alle Inkubationsschritte werden bei 37°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach viermaligem Waschen mit je 400 µl PBS,

erfolgt die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (anti-Maus Alexa-546) für 45 min bei 37°C. Es wird viermal mit 400 µl PBS gewaschen, bevor die Zellen mit kaltem Methanol für 15 min bei RT permeabilisiert werden. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluß werden unspezifische Protein-Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation mit PBS/ 10% FCS abgesättigt. Der Blockierung folgt eine Inkubation mit einem unmarkierten Antikörper (z.B. dem ersten Antikörper) für 45 min bei 37°C. Dem schließen sich vier Waschschrte mit PBS an, bevor mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper (anti-Maus Alexa-488) für 45 min inkubiert wird. Nach viermaligem Waschen mit PBS werden die Präparate mit 50% Glycerol in PBS eingebettet. Das Präparat ist mehrere Wochen bei 4°C in Dunkelheit haltbar.

### 2.2.2.2 Prinzip der konfokalen Laser Scan Mikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, bei der das gesamte Objektfeld gleichmäßig beleuchtet wird, wird bei der konfokalen Mikroskopie nur ein kleiner Teil der Probe mit dem Licht eines fokussierten Laserstrahls, der sich über die Probe bewegt, angeregt. Signale der einzelnen Punkte werden von einer Videokamera registriert und als Bild zusammengesetzt. Das Streulicht aus benachbarten und nicht in der Fokusebene liegenden Bereichen wird so unterdrückt.

Durch eine Linse wird das Laserlicht in die Beleuchtungsblende gelenkt. Danach wird es über einen dichromatischen Spiegel (Hauptfarbteiler) und über mehrere bewegliche Spiegel (Scanoptik) durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Dort trifft es auf Fluorochrome, die angeregt werden und Licht emittieren. Das abgestrahlte Fluoreszenzlicht größerer Wellenlänge wird durch die Objektivlinse wieder gebündelt, passiert den dichromatischen Spiegel und kann durch nachgeschaltete Filter in verschiedene Wellenlängen unterteilt werden. Durch eine kleine regulierbare Lochblende (Pinhole) fällt das emittierte Licht auf einen Lichtdetektor (Photomultiplier), der das Lichtsignal in ein analoges elektrisches Signal umwandelt. Durch die Lochblende wird Licht, das außerhalb der Fokusebene emittiert wird, abgeschirmt. Betrachtet wird so immer nur ein Punkt und durch das Abrastern (Scannen) der Probe wird das Bild zusammengesetzt.

### 2.2.2.3 Sandwich-ELISA

Der Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein immunologisches Verfahren, welches die quantitative Detektion löslicher Proteine bis in den Pikogrammereich erlaubt (Engvall and Perlman, 1971; Mosmann and Fong, 1989). Das Protein wird hierbei

mittels Antikörper an die feste Phase gebunden und mit Hilfe eines weiteren Antikörpers, der ein nicht-kompetitives zweites Epitop des Proteins erkennt, detektiert. Durch Zugabe einer Detektionslösung setzt das an den Antikörper konjugierte Enzym Peroxidase ein Substrat in ein farbiges Produkt um. In allen verwendeten Lösungen wurde auf Natriumazid verzichtet, da dies die Peroxidase irreversibel blockiert.

Die 96-Loch Mikrotiterplatten ('MaxiSorp', Nunc) wurden zunächst mindestens vier Stunden mit 100 µl primärem IL-6 Antikörper (2 µg/ml) in Coating-Puffer pro Loch bei 4°C beschichtet. Nach der Inkubation wurde die primäre Antikörperlösung verworfen, die Platte dreimal mit 400 µl Waschpuffer pro Loch gewaschen und verbliebene freie Proteinbindungsstellen mit 200 µl Blockierungspuffer pro Loch für mindestens 30 min bei RT abgesättigt. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl/Loch der Zellkulturüberstände und der Standardlösungen aufgebracht und ÜN inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen oder verworfen, die Platte dreimal gewaschen und 100 µl/Loch des biotinylierten sekundären IL-6 Antikörpers (2 µg/ml) in Blockierungspuffer hinzugegeben. Die Platte wurde nach Inkubation für mindestens 4 h dreimal gewaschen und 100 µl/Loch Streptavidin-Peroxidase in PBS (1:1000) hinzupipettiert. Nach 30-45 min und dreimaligem Waschen der Platte wurden 100 µl/Loch der TMB-Detektionslösung zugegeben und die Messung vorgenommen. Die zunächst blaue Farbreaktion wurde wiederholt bei 650 bzw. 630 nm gemessen, anschließend mit 100 µl Stopplösung beendet und die Absorption der nun gelben Lösung bei 450 nm erneut aufgenommen.

Die exakten Proteinkonzentrationen wurden vom Programm 'SPF 2.6' (Molecular Devices) an Hand der mitgeführten Verdünnungsreihe des jeweiligen Proteins in Medium errechnet. Die Standardkurve wurde hierbei mit der Einstellung '4-Parameter' erstellt. Alternativ wurde eine Standardkurve in Sigma Plot unter Verwendung der Funktion „sigmoidal, 4 Parameter“ erstellt und die Proteinkonzentrationen mit Hilfe von Excel (Microsoft) errechnet.

Coating-Puffer: 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,5 (eingestellt mit 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Waschpuffer: PBS, 0,05% Tween 20

Blockierungspuffer: PBS, 1% BSA

Stopplösung: 0,18 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Die Durchführung der Quantikine<sup>®</sup>-ELISAs (R&D Systems) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Standardkurve in Sigma Plot wurde unter Verwendung der Funktion „logistic,

4 Parameter“ erstellt und die Proteinkonzentrationen mit Hilfe von Excel (Microsoft) errechnet.

Für die Auswertung und graphische Darstellung wurden die Mittelwerte der Meßwerte berechnet, sowie die Standardabweichung (SD) und die Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Signifikanzberechnungen erfolgten mit Hilfe von Excel mittels zweiseitigem, homoskedastischem t-Test.

## 2.2.3 Detektion und Analyse von Proteinen

### 2.2.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Bei der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung (Bradford, 1976).

### 2.2.3.2 Isolierung von Plasmamembranen und Membranproteinen

Für die Isolierung von Plasmamembranen werden zwei 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 90% konfluenten Zellen verwendet. Diese Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber vom Boden der Flaschen abgelöst. Nach einer Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min bei 4°C werden die Zellen in 2 ml Lysepuffer I resuspendiert und 3 x 30 s sonifiziert. Es wird bei 1420 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wird in der Ultrazentrifuge bei 100000 x g für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet nach der Ultrazentrifugation enthält die Plasmamembranen, wird in 1 ml Lysepuffer II resuspendiert und ÜN bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wird 3 x 10 s sonifiziert und bei 4000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Membranproteine befinden sich im Überstand. Bei jedem Schritt der Fraktionierung werden Proben für eine spätere Analyse genommen.

#### Lysepuffer I

10 mM Tris/HCl pH 7,4

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM KCl

Protease-Inhibitoren (complete Mini, Roche)

#### Lysepuffer II

1% Chaps in PBS

Protease-Inhibitoren (complete Mini, Roche)

### 2.2.3.3 Herstellung von Proteinextrakten

Die Zellen werden in PBS resuspendiert und abzentrifugiert (3000 rpm, 5 min, RT, TZ). Das Zellpellet wird in entsprechendem Volumen Lysepuffer (1x PBS, 1% Triton X-100, Protease-Inhibitoren (complete Mini, Roche)) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und

anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 4°C, TZ). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bei -20°C gelagert werden.

### 2.2.3.4 Proteinkonzentrierung

Sind Proteinlösungen zu verdünnt, ist es erforderlich sie vor der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu konzentrieren. Eine Methode ist die Proteinkonzentrierung nach Wessel und Flügge (Wessel and Flugge, 1984).

Dabei werden 100 µl proteinhaltige Lösung mit 400 µl Methanol gemischt und 10 s bei 13000 rpm abzentrifugiert. Es werden 100 µl Chloroform zugegeben, gemischt und zentrifugiert. Nach der Zugabe von 300 µl H<sub>2</sub>O wird 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Es erfolgt eine Phasentrennung, wobei sich die Proteine in der Interphase befinden. Die obere Phase wird verworfen, zu der Interphase/Chloroformphase werden 300 µl Methanol gegeben und gemischt. Durch Zentrifugation (13000 rpm, 2 min) werden die Proteine gefällt. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in der SpeedVac getrocknet. Das trockene Pellet wird in 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und kann bei -20°C aufbewahrt werden.

### 2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Gele verwendet, die in einer radikalischen Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylbisacrylamid hergestellt wurden. Je nach Anteil des Polyacrylamids und dessen Vernetzungsgrades verändern sich die Porengröße und somit die Eigenschaften des Gels. Das Gel besteht aus zwei Abschnitten, dem großporigen Sammelgel (3,9% Acrylamid, pH 6,8) und dem engporigem Trenngel (7-15% Acrylamid, pH 8,8). Die Proteine, die durch im Probenpuffer enthaltenes β-Mercaptoethanol reduziert werden und durch das SDS eine negative Ladung erhalten, werden zunächst im Sammelgel konzentriert, um dann im Trenngel nach ihrer molaren Masse aufgetrennt zu werden. Das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine in den verschiedenen Gelbereichen ist abhängig vom pH-unabhängigen Verhalten der Chloridionen (Leit-Anionen) im Gegensatz zu dem pH-abhängigen Laufverhalten des Folge-Ions Glycin (Laemmli, 1970).

Puffer für die SDS-PAGE:

4x „Upper“ Tris/HCl, pH 6,8  
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8  
0,4% SDS

4x „Lower“ Tris/HCl pH 8,8  
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8  
0,4% SDS

2x SDS-Probenpuffer  
100 mM Tris/HCl pH 6,8  
2% β-Mercaptoethanol  
4% SDS  
0,2% Bromphenolblau  
20% Glycerol

<u>Proteingel-Laufpuffer</u>	<u>Sammelgel</u>	2.2.3.5.1.1 <u>Trenngel</u>
33 mM Tris/HCl, pH 6,8	1 ml AA/BisAA	5 ml AA/BisAA
190 mM Glycin	2,5 ml 4x „Upper“ Tris	3,75 ml 4x „Lower“ Tris
0,1% SDS	6,5 ml H <sub>2</sub> O	6,25 ml H <sub>2</sub> O
	13,5 µl TEMED	15 µl TEMED
	40 µl 10% APS	25 µl 10% APS

### 2.2.3.6 Protein-Blotting und Zell-Overlay

Beim Protein-Blotting werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung mittels SDS-PAGE getrennt, auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für bestimmte Proteine spezifisch ist oder sein soll. Ursprünglich wurde die Methode dazu entwickelt, die Spezifität von Antikörpern gegenüber einem in einer Proteinmischung befindlichen Antigen zu überprüfen (Towbin et al., 1979). Diese als Western Blotting (Burnette, 1981) bekannte Variante, hat mittlerweile vielfältige Veränderungen erfahren, u.a. das Cell-Blotting, wobei intakte Zellen als Nachweissystem verwendet werden. Diese Methode wird auch als Zell-Overlay bezeichnet (O'Sullivan et al., 1997; Seshi, 1994).

Das Gel wird in der Blotapparatur Mini Trans Blot (Naßblot, BioRad) in Transferpuffer auf eine PVDF-Membran (Immuno-Blot™ PVDF Membrane, Biorad) geblottet. Geblottet wird 1 h bei 100 V. Die Membran wird nach dem Transfer mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen. Anschließend wird die Membran ÜN bei 4°C in Blockierungslösung abgesättigt. Alle weiteren Schritte erfolgen bei RT. Die Membran wird je einmal mit PBS und Bindungspuffer gewaschen. Radioaktiv-markierte PRBCs werden durch Gelatine-Sedimentation angereichert und einmal mit Bindungspuffer gewaschen. Die Effizienz der Markierung wird im Scintillationszähler bestimmt. 60 µl des PRBC-Pellets werden in 10 ml Bindungspuffer resuspendiert und zu den gewaschenen Membranen gegeben. Bei der einstündigen Inkubation werden die PRBCs alle 10-15 min resuspendiert. Anschließend werden die Membranen mit Bindungspuffer vorsichtig gewaschen bis keine ungebundenen PRBCs mehr zu sehen sind. Die Membranen werden für 10 min mit Fixierungslösung fixiert und dann an der Luft getrocknet. Ein Film (Biomax MR-1, Kodak) wird für 3 Tage bis 2 Wochen bei RT exponiert und anschließend entwickelt.

<u>Transferpuffer</u>	<u>Ponceau S</u>	<u>Blockierungslösung</u>
25 mM Tris	0,5% (w/v) Ponceau S in	5% BSA in BSA
192 mM Glycin	1% Essigsäure	
20% (v/v) Methanol		
 <u>Bindungspuffer</u>	 <u>Fixierungslösung</u>	
RPMI 1640 pH 6,8	1% Formalin in PBS	
0,5% BSA		

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 Kultur und Transformation prokaryontischer Zellen

#### 2.2.4.1.1 Verwendete Bakterienstämme

##### DH5 $\alpha$ :

*deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*( $r_k^-$ mk<sup>+</sup>), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*,  $\Delta$ (*lacZYA-argFV169*),  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15, F<sup>-</sup>

##### One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen):

F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*

#### 2.2.4.1.2 Medien und Lösungen für die Kultur von *E. coli*

##### Kulturmedien:

LB-Medium	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium + 1,5% Bacto-Agar (w/v)

##### Antibiotika-Stocklösung:

Ampicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert ⇒ Endkonzentration in LB-Medium: 50 $\mu$ g/ml
30% Glycerinlösung	70 ml LB-Medium 30 ml Glycerol, autoklaviert

#### 2.2.4.1.3 Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen

Die chemische Behandlung von prokaryontischen Zellen mit CaCl<sub>2</sub> erhöht deren Bereitschaft DNA aus der umgebenden Lösung aufzunehmen (Cosloy and Oishi, 1973; Hanahan, 1983). Derartig behandelte Zellen werden als kompetente Zellen bezeichnet.

5 ml LB-Medium werden mit DH5 $\alpha$ -Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Diese Übernachtskultur wird am nächsten Morgen in 50 ml LB-Medium zu einem OD<sub>600 nm</sub>-Wert von 0,2 verdünnt und bis zum Erreichen eines OD<sub>600</sub>-Wertes von 0,7- 0,8 weiter kultiviert (37°C, 220 rpm). Die Zellen werden anschließend 15 min auf Eis gekühlt, pelletiert (15 min, 5000 rpm, 4°C) und in 25 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wird erneut zentrifugiert (15 min, 3000 g, 4°C) und das Pellet in 2,5ml

CaCl<sub>2</sub>/Glycerin-Lösung aufgenommen. 200 µl Aliquots dieser Lösung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

### Lösungen zur Herstellung kompetenter *E. coli*:

CaCl <sub>2</sub> -Lösung:	0,1 M CaCl <sub>2</sub>
CaCl <sub>2</sub> /Glycerin-Lösung:	0,1 M CaCl <sub>2</sub> 10% (v/v) Glycerol, 4°C

#### **2.2.4.1.4 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen**

50 µl kompetente DH5α-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 3-5 µl der zu transformierenden Ligationsansätze oder der verdünnten Plasmid-DNA werden zusammen mit den kompetenten Zellen in einem Eppendorfgefäß gut gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wird der Ansatz für 45-60 s einer Temperatur von 42°C ausgesetzt (Hitzeschock). Diese Behandlung induziert einen transienten Zustand der Kompetenz in *E. coli*, d.h., daß die Bakterien nun im Stande sind, DNA aufzunehmen. Nach dem Hitzeschock läßt man die transformierten Bakterien für 5 min auf Eis abkühlen. Man gibt 200 µl LB-Medium auf die Zellen und inkubiert für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator. Danach können die transformierten Zellen z.B. auf einer LB<sub>Amp</sub>(50 µg/ml)-Platte oder einer Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

#### **2.2.4.1.5 Herstellung einer Glycerin-Bakterienstocklösung**

Die Bakterien (z.B. transformierte DH5α) werden auf einer LB<sub>Amp</sub>-Platte ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte impft man eine Übernachtskultur an und inkubiert ÜN bei 37°C auf dem Schüttler. Zu 500 µl 30% Glycerin-Lösung gibt man 500 µl Bakteriensuspension, mischt gut und lagert diese Bakterienstocklösung bei -80°C, wo sie für mehr als 2 Jahre haltbar ist.

## 2.2.4.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA

### 2.2.4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Folgende Methoden wurden zur Aufreinigung von DNA angewendet:

Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> /analytischer Maßstab	„Minipräp“ (Sambrook, 1989)
Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> für Sequenzierungen	High Pure Plasmid Isolation Kit, (Roche, Mannheim)
Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> /präparativer Maßstab	Nucleobond-System AX500, (Machery-Nagel, Hilden)
DNA-Fragmente aus Agarosegelen	QIAquick Gel Extraction Kit, (Qiagen)
DNA in verdünnten, wässrigen Lösungen	Ethanol- oder Isopropanol-Fällung, (Sambrook, 1989)

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers bzw. nach Angaben des Protokolls.

#### Lösungen für die Minipräp-Methode:

##### Lösung I

50 mM Glucose  
10 mM EDTA  
25 mM Tris/HCl, pH 8,0

##### Lösung II

0,2 M NaOH  
1% SDS

##### Lösung III

3 M K-Acetat, pH 4.8  
(eingestellt mit Eisessig)

##### RNase-A-Stammlösung

10 mg/ml TE-Puffer  
→ 1h, 90°C

##### TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH8,0  
1 mM EDTA, pH 8,0

### 2.2.4.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Plasmodium falciparum*

Für die Isolierung genomischer DNA aus *P. falciparum* verwendet man Parasitenkulturen mit späteren Parasitenstadien, da Trophozoiten und Schizonten im Vergleich zu Ringstadien mehr DNA enthalten.

Infizierte und nicht-infizierte Erythrocyten einer 10 cm-Kulturschale werden abzentrifugiert (1900 rpm, 2 min, RT). Das 0,5 ml Blutpellet wird in 5 ml Lysepuffer (0,15% Saponin/PBS) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert, um die Erythrocyten zu lysieren. Anschließend wird erneut abzentrifugiert (2500 rpm, 5 min), der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1x PBS gewaschen bis der Überstand klar ist. Das Pellet wird in 1 ml TKM1 resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das nach Zentrifugation (13000 rpm, 2 min, TZ) erhaltene Pellet wird in 50 µl TKM1 durch Vortexen resuspendiert. Es werden nacheinander 400 µl TKM2 und 25 µl 20% SDS zugegeben und nach jedem Schritt durch Vortexen

gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 56°C werden 150 µl 6 M NaCl zugegeben und gemischt. Es wird für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA befindet sich im Überstand und kann durch Zugabe von 1,2 ml 100% Ethanol gefällt werden (13000 rpm, 20 min, 4°C). Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl 1x TE aufgenommen.

<u>TKM1</u>	<u>TKM2</u>	<u>1x TE</u>
10 mM Tris pH 7,6	10 mM Tris pH 7,6	10 mM Tris/HCl pH 8,0
10 mM KCl	10 mM KCl	1 mM EDTA
10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM MgCl <sub>2</sub>	2.2.4.2.2.1 <u>Lysepuffer</u>
2 mM EDTA	2 mM EDTA	0,15% Saponin in PBS
	0,4 M NaCl	

### 2.2.4.2.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Die in die DNA eingebauten Basen absorbieren Licht verschiedenster Wellenlänge mit einem Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 260 nm. Dies macht man sich für die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung zunutze (Sambrook, 1989). Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, mißt man die Absorption dieser Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>). Die Konzentration einer Lösung mit doppelsträngiger DNA berechnet sich dann wie folgt:

$$(OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50) / 1000 = \text{DNA-Konzentration (in } \mu\text{g/ml)}.$$

### 2.2.4.2.4 DNA-Analyse mittels Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, 1989) wird zur Charakterisierung und Aufreinigung von doppelsträngiger DNA eingesetzt. Als Puffersystem dient TAE in einfacher Konzentration (1x). Die Agarosekonzentration der Gele lag zwischen 0,8 und 2%. Die DNA-Proben werden zum Beladen mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei 5-10 V/cm Elektrodenabstand. Die aufgetrennte DNA wird mittels Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

<u>50x TAE</u>
242 g Tris-Base
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

<u>6x DNA Ladepuffer</u>
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol FF
30% Glycerol

<u>Ethidiumbromid</u>
10 mg/ml in H <sub>2</sub> O

### **2.2.4.3 *In vitro*-Modifikation und Rekombination von DNA**

#### **2.2.4.3.1 Restriktion von DNA**

Restriktionsenzyme sind bakterielle Restriktionsendonukleasen, die die DNA sequenzspezifisch schneiden, wobei 5'- bzw. 3'-Überhänge oder doppelsträngige DNA-Enden entstehen. Die Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen dient u.a. der Analyse von Plasmiden und in präparativem Maßstab zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur *in vitro*-Rekombination neuer Plasmide.

Es wurden die Enzyme der Firma New England BioLabs mit den dazugehörigen Puffersystemen und Arbeitsvorschriften eingesetzt.

#### **2.2.4.3.2 Enzymatische DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wird DNA *in vitro* vervielfältigt (Saiki et al., 1985). Für analytische PCR-Reaktionen wird Taq DNA-Polymerase (MBI Fermentas und Bionline) verwendet. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten codierender Genabschnitte, die für Klonierungen eingesetzt werden, wird die Platinum<sup>®</sup> Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) benutzt. Polymerasen, Puffer und DNA wurden entsprechend den Angaben der Hersteller nach Standardprotokollen eingesetzt.

#### **2.2.4.3.3 Ligationen**

Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriohagen T4 katalysiert in Anwesenheit von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA.

Pro Ligrationsansatz wird die Ligasekonzentration üblicherweise auf 1 U/10 µl eingestellt. An Vektor-DNA werden 100-200 ng eingesetzt und die 4-5 fache Molarität an Insert-DNA. Es wird 1 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10-fach Puffers zugegeben und das Endvolumen mit sterilem bidest. Wasser auf 10 µl eingestellt. Der Ansatz wird entweder bei RT für 4 h oder bei 16°C im Wasserbad ÜN inkubiert.

Zusätzlich wurden folgende Systeme zur TA-Klonierung nach Herstellerangaben verwendet: TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe)  
pGEM<sup>®</sup>-T Vector Systems (Promega, Mannheim)

## 2.2.4.4 Methoden zur Analyse von RNA

### 2.2.4.4.1 Isolierung von RNA aus *P. falciparum*

RNA kann aus Parasiten aller Stadien isoliert werden (Kyes et al., 2000). Trophozoiten werden vor der RNA-Präparation über eine Magnetsäule angereichert und anschließend zentrifugiert (1900 rpm, 2 min). Parasiten im Ringstadium werden durch Saponinlyse von Erythrocytenmembranen und Proteinen getrennt (siehe 2.2.4.2.2). Parasitenpellets werden in 10 ml TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert und können bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Gefrorene TRIzol-Proben werden bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut und in ein 12 ml Polypropylen-Röhrchen (greiner bio-one) überführt. Es werden 2 ml Chloroform zugegeben, durch Vortexen gemischt und anschließend bei  $12000 \times g$  für 30-60 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Dabei trennen sich die organische und die wässrige Phase. Die wässrige, obere Phase enthält die RNA und wird in ein neues Röhrchen überführt. Dabei sollte die Interphase nicht berührt werden. Zu der wässrigen Phase werden 0,83 Volumen Isopropanol gegeben und es wird ÜN oder mehrere Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Fällung der RNA erfolgt durch Zentrifugation ( $12000 \times g$ , 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in der restlichen Lösung resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in der TZ zentrifugiert ( $13000 \text{ rpm}$ , 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Die RNA wird unter der Sterilen Werkbank getrocknet, anschließend in 30-100  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  + RNase-Inhibitor (RNaseOUT™, Invitrogen) oder Formamid resuspendiert und eventuell für 10 min bei  $60^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um eine vollständige Lösung der RNA zu erreichen. Die RNA für die Northern Blot Analyse wird sofort verwendet, RNA für RT-PCR kann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.2.4.4.2 DNase I-Behandlung der RNA

Bevor man RNA in eine RT-PCR einsetzen kann, muß sichergestellt werden, daß die RNA keine DNA-Kontaminationen enthält. Die in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöste RNA wird mit DNase I (Stratagene) nach Angaben des Herstellers für 30 min bei RT inkubiert. Durch anschließendes Erhitzen der Probe für 10 min auf  $65^{\circ}\text{C}$  wird die DNaseI inaktiviert. Mittels Kontroll-PCR kann überprüft werden, ob die Behandlung erfolgreich war.

### 2.2.4.4.3 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren. Diese Methode ist im Vergleich zur Northern Blot-Analyse erheblich sensitiver. Bei der RT-PCR erfolgt zuerst eine cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als

Matrize, darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient (Gassen and Schimpf, 1999).

Für die cDNA Erststrangsynthese wird das SUPERSRIPT™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Mit Hilfe der Oligo(dT)-Primer, die im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA hybridisieren, werden aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle selektiv in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zur Untersuchung der transkribierten *var* Gene einer *P. falciparum*-Kultur, verwendet man für die anschließende PCR die beiden degenerierten Primer  $\alpha$ AF und  $\alpha$ BR (Taylor et al., 2000). Mit ihrer Hilfe lassen sich die DBL $\alpha$ -Domänen der meisten *var* Gene amplifizieren und analysieren.

<u>PCR-Ansatz</u>	<u>PCR-Programm</u>	
1 $\mu$ l Matrize	1) 95°C, 5 min	
5 $\mu$ l 10x PCR-Reaktionspuffer	2) 42°C, 1 min	
1,75 $\mu$ l 50 mM MgCl <sub>2</sub>	3) 60°C, 1 min	
1 $\mu$ l 10 mM dNTPs	4) 95°C, 1 min	
1 $\mu$ l Primer $\alpha$ AF (50 pmol/ $\mu$ l)	5) 42°C, 1 min	
1 $\mu$ l Primer $\alpha$ BR (50 pmol/ $\mu$ l)	6) 60°C, 1 min	4)-6) 30 Zyklen
1,5 $\mu$ l Taq-Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	7) 60°C, 10 min	
<u>37,75 <math>\mu</math>l H<sub>2</sub>O</u>	8) 4°C	
50 $\mu$ l $\Sigma$		

Gereinigte PCR-Produkte werden für die weiteren Analysen in den Vektor pCR.2.1 kloniert (TOPO TA Cloning®). Die Analyse erfolgt mittels PCR direkt auf die Bakterienkolonien mit den Primern M13 Reverse und M13 (-20) Forward und anschließender Restriktionsanalyse der PCR-Produkte mit *Sau3A* I (Amersham pharmacia biotech). Von einigen Klonen wird Plasmid-DNA isoliert (High Pure Plasmid Isolation Kit) und die Plasmid-DNA mit dem Primer M13 Reverse sequenziert. Die Analyse der Sequenzen erfolgte unter Verwendung der folgenden Programme und Internetseiten:

Chromas 1.45

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>

<http://clustalw.genome.ad.jp/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>

<http://www.plasmodb.org>

### 2.2.4.4.4 Northern Blot-Analyse

Mit Hilfe des RNA Blottings (Northern Blot) bestimmt man die Größe und Menge spezifischer mRNA-Moleküle in Präparationen von Gesamt-RNA oder poly(A)<sup>+</sup> RNA (Alwine et al., 1979; Alwine et al., 1977). Die RNA wird gemäß ihrer Größe mittels denaturierender Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt und dann auf eine Nylonmembran transferiert. Die spezifische RNA wird durch Hybridisierung mit markierten DNA- oder RNA-Sonden detektiert. Da *P. falciparum* viele längere RNA-Transkripte (> 7 kb) besitzt, ist eine Anpassung des Protokolls erforderlich (Kyes et al., 2000).

Um RNasen aus der Gelapparatur zu entfernen, wird diese zuerst mit einer 0,5% SDS-Lösung gereinigt und mit H<sub>2</sub>O ausgespült, anschließend mit 70% Ethanol desinfiziert und getrocknet, für 10 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O ausgespült.

Für die Analyse großer mRNA-Transkripte (> 7 kb) wird ein 0,8% Agarosegel verwendet. 0,8 g Agarose werden in 100 ml 1x TBE geschmolzen und sobald das Gel auf 55-60°C abgekühlt ist, werden 0,5 ml 1 M Guanidinthiocyanat (Endkonzentration 5 mM) zugegeben. Das Gel wird gegossen und frühestens nach 30 min verwendet.

Die RNA-Isolierung aus *P. falciparum* erfolgt wie unter 2.2.4.4.1 beschrieben. Die RNA wird in geeigneten Mengen Formamid resuspendiert, für 10 min bei 60°C inkubiert und anschließend bis zur Verwendung auf Eis gestellt. RNA kann in Formamid direkt auf das Gel geladen werden. Als Marker wurde die 0,5-9 kb RNA-Leiter (New England Biolabs) verwendet. 6 µl Standard werden mit 4 µl mitgeliefertem Ladepuffer gemischt, 3 min bei 60°C erhitzt und dann bis zur Verwendung auf Eis gestellt. Pro Spur trägt man 3,3 µl Standard auf das Gel auf. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 1x TBE als Puffersystem für 15 min bei 110 V, dann bei 80 V für 3 h. Anschließend wird das Gel für 10 min mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TBE gefärbt und fotografiert. Das Gel wird zweimal für je 10 min in 7,5 mM NaOH inkubiert. Es folgt ein Kapillartransfer auf eine Hybond N<sup>+</sup> Membran (Amersham) in 7,5 mM NaOH über Nacht. Nach dem Transfer wird die Membran in 2x SSC für 5 min neutralisiert, an der Luft getrocknet und mit UV-Licht (50 mJoule) bestrahlt, um die RNA mit der Membran zu vernetzen. Unter UV-Licht können Markerbanden sichtbar gemacht und auf der Membran eingezeichnet werden.

In die Hybridisierungsröhren werden 10-20 ml 6x SSC vorgelegt und die Membranen durch Benetzen mit 6x SSC luftblasenfrei in die Röhren überführt. Das SSC wird verworfen. Membranen werden mindestens für 3 h in 18 ml Hybridisierungslösung bei 55°C im Hybridisierungsofen prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt in der gleichen Lösung unter

Zugabe der gewünschten, hitzedenaturierten Sonde (1 Mio cpm/ml) über Nacht. Zum Waschen werden die Hybridisierungsröhren einmal kurz mit 20 ml Waschlösung ausgespült und zweimal für 20 min mit je 30 ml Waschlösung bei 60°C inkubiert. Membranen werden anschließend in Frischhaltefolie eingepackt und Filme für 6 h bis zu drei Tagen in einer Kassette mit „intensifier screen“ bei -80°C exponiert.

Solange die Membranen nicht austrocknen, können sie mehrfach wiederverwendet werden. Dazu ist es notwendig die bereits gebundenen Sonden wieder zu entfernen, indem die Membranen für 10 min bei 95°C in Stripping-Puffer inkubiert werden. Die vollständige Entfernung der Sonden wird durch Exposition eines Films kontrolliert.

<u>1x TBE</u> 0,089 M Tris 0,089 M Borsäure 2 mM EDTA in DEPC- H <sub>2</sub> O	<u>1M Guanidinthiocyanat</u> 118 mg Guanidinthiocyanat (Sigma) in 1ml H <sub>2</sub> O	<u>7,5mM NaOH</u> 7,5 ml 1M NaOH in 1l DEPC- H <sub>2</sub> O
<u>2x SSC</u> 0,3 M NaCl 0,03 M Na Citrat	<u>6x SSC</u> 0,9 M NaCl 0,09 M Na Citrat	<u>Hybridisierungslösung</u> 7% SDS 0,5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2 2% Dextransulfat
<u>Waschlösung</u> 0,5x SSC 0,1% SDS	<u>Stripping-Puffer</u> 0,2% SDS 10 mM Tris, pH 7,4	<u>TE pH 7,6</u> 10 mM Tris, pH 7,6 1 mM EDTA, pH 8,0

### Herstellung von DEPC- H<sub>2</sub>O:

1-2 ml DEPC (Sigma) werden zu 1 l H<sub>2</sub>O gegeben (0,1-0,2% DEPC), ÜN bei RT oder 1-2 h bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert, um RNasen aus dem H<sub>2</sub>O zu entfernen.

### **2.2.4.4.5 Herstellung radioaktiv-markierter Sonden für die Northern Blot-Analyse**

Für die Herstellung der radioaktiv-markierten Sonden wird das HexaLabel™ DNA Labeling Kit (MBI Fermentas) verwendet. Als DNA-Template werden PCR-Fragmente bzw. DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Allerdings erfolgte der Einbau des radioaktiv-markierten [<sup>32</sup>P]-α-dATP (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) für 1 h bei 37°C, es wurden keine weiteren unmarkierten dNTPs zugegeben.

Um die markierten Sonden von nicht-eingebauten dNTPs zu trennen, erfolgt eine Chromatographie auf Sephadex® G-50. Für die Herstellung der Säulchen werden 1 ml-Spritzen verwendet. Die untere Öffnung der Spritze wird mit Glaswolle abgedichtet und die

Spritze mit Sephadex® G-50 in TE pH 7,6 gefüllt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gestellt. Um die Säule zu packen wird für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wird wiederholt bis ungefähr 1 ml Sephadex® G-50 in der Säule ist. Ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß wird in das 15 ml Zentrifugenröhrchen gestellt, um die Sonde aufzufangen. Die markierten Sonden werden mit 80 µl TE, pH 7,6 verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Ein Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm für 5 min trennt die markierten Sonden von nicht-eingebauten dNTPs. Die Sonden werden im Scintillationszähler (LS 6000IC, Beckman Coulter) auf die eingebaute Radioaktivität untersucht, anschließend 10 min bei 95°C denaturiert und die gewünschte Menge sofort in die Hybridisierungslösung pipettiert.

### Herstellung von Sephadex® G-50 in TE, pH 7,6:

5 g Sephadex® G-50 (Sephadex DNA Grade, G-50 Fine, Sigma) werden in 200 ml TE, pH 7,6 eingeweicht. Sephadex® G-50 wird viermal gewaschen, indem der Überstand über der sedimentierten Matrix abgenommen und durch neues TE, pH 7,6 ersetzt wird. Anschließend wird autoklaviert.

### **2.2.4.4.6 Microarray-Analyse**

Der Microarray ist in ein modifizierter Northern Blot, bei dem die relativen Expressionslevel der Gene in zwei zu vergleichenden Proben bestimmt werden. Anders als in der konventionellen Northern Blot-Analyse können in der Microarray-Analyse gleichzeitig die Expression von hunderten oder tausenden von Genen in einem einzigen Experiment untersucht werden (Albelda and Sheppard, 2000).

Microarray-Analysen der vorliegenden Arbeit wurden von Dr. Ulrich Wulbrand, Institut für Immunologie, Medizinische Hochschule Hannover durchgeführt.

### ***RNA-Isolierung***

Zellen für die Microarray-Analyse werden wie unter 2.2.1.5 beschrieben, behandelt und geerntet. Die RNA-Isolierung aus den HUVEC Zellen (+/- Plasmodien) erfolgt mit 2 ml TRIzol (siehe 2.2.4.4.1). Die gewonnene RNA wird anschließend mit DNase I behandelt, um kontaminierende DNA zu entfernen (siehe 2.2.4.4.2) und über Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung (2.2.4.4.2) erneut gereinigt. Die RNA wird nach dem Trocknen in 20-100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Je 3 µg der RNA-Proben werden anschließend auf einem 1%-igen Agarosegel auf Integrität getestet.

### ***Durchführung des Arrays***

Die Amplifizierung der RNA zur Herstellung der Sonde wird nach dem Protokoll der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg durchgeführt. Für jedes Experiment wurde jeweils eine RBC-Probe mit Cy3 und eine FCR3-Probe mit Cy5 markiert. Die anderen RNA-Proben wurden mit den jeweils anderen fluorochrom-markierten Nucleotiden markiert. Da die Fluorochrome z.T. nicht gleich intensiv fluoreszieren, kann so ein verfälschtes Ergebnis durch das Überkreuzexperiment ausgeschlossen werden. Am Ende der Amplifikation wird die RNA-Konzentration erneut bestimmt, da je Probe 10 µg RNA für die Hybridisierung auf dem Chip verwendet werden. Aus den Sondenreaktionen werden je 10 µg beider Proben (Cy5 bzw. Cy3 markiert) gemischt und 15 min bei 94°C im Fragmentierungspuffer (10x Fragmentierungspuffer: 40 mM Tris-Acetat, pH 8,1, 100 mM KOAc, 30 mM MgOAc) fragmentiert. Die Proben werden mit 100 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und über YM10 Micron Filtereinheiten (Amicon) ultrafiltriert und das verbliebene Restvolumen in der SpeedVac getrocknet. Das Pellet wird in 120 µl Hybridisierungspuffer (MWG Biotech) aufgenommen und nach Denaturierung für 3 min bei 94°C auf Eis abgekühlt und bei 42°C ÜN auf dem Chip (custom made, „Migrationschip“) zur Hybridisierung eingesetzt. Die Chips werden anschließend in Waschlösung 1 (2x SSC, 0,1% SDS), 1x SSC und 0,5x SSC je 5 min bei RT gewaschen und danach für 2 min bei 500 g zum Trocknen zentrifugiert. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgt in unterschiedlichen Verstärkerstufen von 30/40/45 bis 60/65/70 (Array-Scanner Affimetrix 428). Die in dieser Weise aufgenommenen Daten werden mit der Software „Image“ (MWG Biotech) ausgewertet.

### ***Datenauswertung***

Zur Auswertung müssen die Daten standardisiert werden. Dazu werden vier Verfahren angewandt: 1. Standardisierung über die Äquivalenzanalyse, 2. Standardisierung über alle Gene, 3. Standardisierung über die Kontrollgene, 4. Standardisierung über die Summe aller Intensitäten = 1. Die dabei entstehenden Datensätze werden zur statistischen Analyse der Arraydaten über SAM (significance Analysis of Microarrays = SAM) (Chu et al.) durchgeführt. Dieses ist als Excel-AddIn oder in der Tiger-Software (Saeed et al., 2003) enthalten, die auch ein Clustering erlaubt. Die durch Standardisierung ermittelten Daten werden sowohl in SAM-Excel als auch in SAM-Tiger analysiert und die Ergebnisse beider Programme verglichen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aktivierung von Endothelzellen durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten

Eine effiziente Bindung *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrocyten an Endothelzellen wird von einigen Molekülen vermittelt, die auf Endothelzellen nicht konstitutiv exprimiert sind. Die Expression einiger Adhäsionsmoleküle, wie z.B. von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin wird erst in einem entzündlichen Milieu hochreguliert (Bevilacqua, 1993). Es stellt sich die Frage, ob eine initiale Interaktion *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrocyten mit Endothelzellen Veränderungen im Mikromilieu hervorrufen kann, die zu einem proadhäsiven Phänotyp der Endothelzellen führen könnte. Eine verstärkte Adhäsion der *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrocyten könnte die Überlebenschancen der Parasiten im Wirt erhöhen. Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden könnte zu veränderter Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Endothelzelle führen und es könnten immunregulatorische Moleküle wie z.B. Cytokine freigesetzt werden.

#### 3.1.1 *In vitro*-Modellsystem zur Untersuchung der Aktivierung

Voraussetzung für die Untersuchung des Aktivierungszustandes der Zellen ist die Wahl eines geeigneten Zelltyps, sowie die Festlegung der Versuchsbedingungen. Erste Versuche wurden mit einer humanen Lungen-Endothelzelllinie (HLEC) und mit einer humanen malignen Schwannoma-Zelllinie (HMS-97) durchgeführt. Da es jedoch nicht möglich war diese beiden immortalisierten Zelllinien durch TNF $\alpha$  oder IFN $\gamma$  zu aktivieren (ohne Abbildung), wurden primäre humane Endothelzellen für die Aktivierungsversuche verwendet. Primäre Endothelzellen besitzen den Vorteil, daß sie aufgrund der niedrigeren Passagenzahl nur wenige Chromosomenmutationen besitzen und auf externe Stimuli reagieren können. Humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells) werden häufig für Aktivierungsstudien eingesetzt.

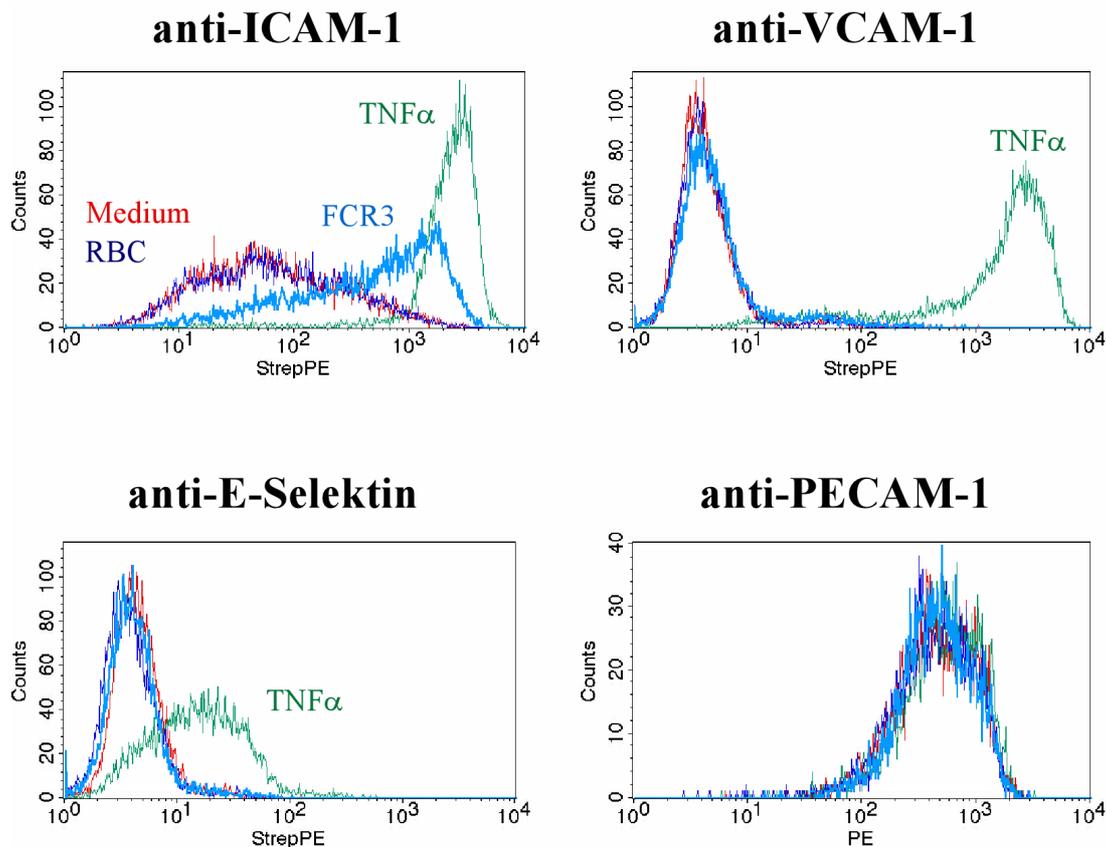
Um zu untersuchen, ob *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten Endothelzellen aktivieren können, werden Endothelzellen und *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten für einen bestimmten Zeitraum kokultiviert. Für die meisten Experimente wurden Trophozoiten und Schizonten der klonalen Parasitenlinie FCR3 eingesetzt, die in der Lage sind PfEMP-1 auf der Oberfläche der Erythrocyten zu exprimieren und somit die Fähigkeit zur Cytoadhäsion

besitzen (Scherf et al., 1998). Analysiert wurden die Expressionlevel einiger Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche, die Konzentrationen sezernierter, löslicher Proteine, sowie das Transkriptionsmuster der Endothelzellen, die durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten aktivierten wurden.

### 3.1.1.1 Charakterisierung der Veränderungen im Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle aktivierter Endothelzellen

*Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten könnten, wie z.B. auch Viren (Colden-Stanfield et al., 1993) die Fähigkeit besitzen, Endothelzellen zu aktivieren und die Expression einiger Adhäsionsmoleküle zu verändern. *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten wurden mit Endothelzellen für 20 h kokultiviert, die Zellen anschließend mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle gefärbt und im Durchflusscytometer analysiert. Untersucht wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, sowie PECAM-1. Es wurden *Plasmodium*-Parasiten der klonalen Linie FCR3 verwendet.

Die verwendeten HUVECs exprimieren im nicht-aktivierten Zustand kein VCAM-1 und E-Selektin und nur geringe Mengen an ICAM-1, wie in der Mediumkontrolle sowie in der Erythrocytenkontrolle (RBC) zu sehen sind (Abb. 3.1).  $\text{TNF}\alpha$  (10 ng/ml) aktivierte Endothelzellen und induzierte eine verstärkte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin. Dieser Ansatz wurde als Positivkontrolle für die Aktivierbarkeit der Endothelzellen verwendet. Wurden *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten (FCR3) mit HUVECs kokultiviert, so wurde die ICAM-1 Expression auf der Zelloberfläche deutlich hochreguliert. Erythrocyten alleine waren nicht in der Lage die Endothelzellen zu stimulieren. Das Niveau der ICAM-1 Expression der Endothelzellen das durch  $\text{TNF}\alpha$  induziert wurde, wurde durch Aktivierung der HUVECs mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten nicht erreicht. *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten hatten im Gegensatz zu  $\text{TNF}\alpha$  keinen Effekt auf die Expression von VCAM-1 und E-Selektin. Für den Parasiten-Ansatz wurden  $5 \times 10^6$  PRBCs/ml eingesetzt, die mit Gelatine angereichert waren. Nicht-infizierte Erythrocyten wurden mindestens einen Tag in Parasitenmedium kultiviert und ebenfalls in Gelatine inkubiert, um eventuelle Einflüsse dieser Behandlungen auf die Aktivierung detektieren zu können. Es wurden jeweils die gleichen Gesamtzellzahlen eingesetzt. Die Expression von PECAM-1 auf der Zelloberfläche war in allen Ansätzen gleich hoch. Da PECAM-1 ein Molekül ist, das an der Bildung interzellulärer Verbindungen beteiligt ist, ist eine Veränderung des Expressionslevels auch nicht zu erwarten.



**Abb. 3.1: Erhöhte ICAM-1-Expression auf PRBC-aktivierten HUVECs**

Endothelzellen wurden für 20 h mit Medium, TNF $\alpha$  (10 ng/ml), nicht-infizierten Erythrocyten (RBC) oder *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrocyten (FCR3) kokultiviert. Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, PECAM-1 wurde durch Färbung der Zellen mit Antikörpern und anschließender Analyse im Durchflusscytometer bestimmt. Die Histogramme zeigen die Expression der unterschiedlichen Adhäsionsmoleküle für die verschiedenen Ansätze. Zellen der Medium- und Erythrocytenkontrolle (RBC) zeigten keine Expression von VCAM-1 und E-Selektin und nur eine geringe Expression von ICAM-1. TNF $\alpha$  aktivierte Endothelzellen und regulierte die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin hoch. *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten konnten die ICAM-1 Expression erhöhen, nicht aber die Expression der anderen Moleküle. Für die PECAM-1 Expression wurden keine Unterschiede sichtbar.

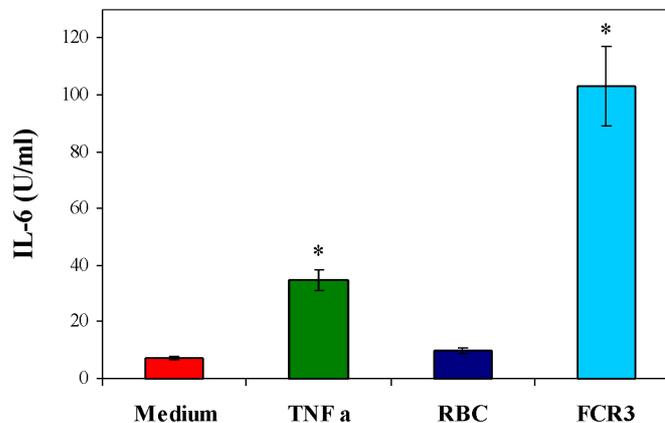
Um die Abbildungen leichter verstehen zu können, wurde wenn möglich ein einheitlicher Farbcode für die Ansätze verschiedener Experimente verwendet: Mediumkontrolle: rot, Erythrocytenkontrolle: dunkelblau, TNF $\alpha$ -Kontrolle: grün, Ansatz mit PRBCs: hellblau.

Da Erythrocyten alleine nicht in der Lage sind die Endothelzellen zu aktivieren, konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, daß mit dem *Plasmodium*-Stamm FCR3 infizierte Erythrocyten mit Endothelzellen direkt durch Zell-Zell-Interaktion oder indirekt durch lösliche Mediatoren interagieren und diese so aktivieren können. Ergebnis dieser Aktivierung ist eine Hochregulierung der ICAM-1 Expression.

### 3.1.1.2 *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten induzieren IL-6 Sekretion

Interleukin 6 (IL-6) ist ein multifunktionelles Cytokin, das u.a. von Endothelzellen sezerniert wird und eine wichtige Rolle in den ersten Schritten einer Entzündungsreaktion spielt (Marin et al., 2001).

Da IL-6 ein Cytokin ist, das von aktivierten Endothelzellen sezerniert wird, ist es möglich, daß PRBC-aktivierte Endothelzellen ebenfalls IL-6 sezernieren. Mittels ELISA konnte die Menge an IL-6 bestimmt werden, die durch die aktivierten Endothelzellen in das Medium sezerniert wurde. Die Aktivierung der Endothelzellen erfolgte für 18-22 h.



**Abb. 3.2: *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten induzieren Sekretion von IL-6**

Die Menge des IL-6, das durch die aktivierten HUVECs in das Kulturmedium sezerniert wurde, wurde mittels IL-6 ELISA bestimmt. Überstände wurden 18-22 h nach Aktivierung der Endothelzellen untersucht. Zellen der Kontrollen Medium (rot) und nicht-infizierter Erythrocyten (dunkelblau) sezernierten nur geringe Mengen IL-6, der Unterschied zwischen diesen beiden Kontrollen war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 8$ ). Die IL-6 Sekretion in den Ansätzen TNF $\alpha$  (grün; \*,  $p < 0,001$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 8$ ) und FCR3 (hellblau; \*,  $p < 0,001$ , verglichen mit RBC,  $n = 8$ ) war signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts, SEM) der gemessenen IL-6 Konzentrationen (U/ml) der einzelnen Versuche.

Zellen der Negativkontrolle, die nur mit Medium inkubiert wurden, sezernierten nur sehr geringe Mengen IL-6, wie auch die Zellen der zweiten Negativkontrolle, die mit uninfizierten Erythrocyten kokultiviert wurden (Abb. 3.2). Obwohl die RBC-behandelten HUVECs etwas mehr IL-6 sezernierten als die der Mediumkontrolle, war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 8$ ). TNF $\alpha$ -Behandlung der HUVECs diente als Positivkontrolle für die Aktivierbarkeit der Endothelzellen. HUVECs, die mit TNF $\alpha$  stimuliert wurden, sezernierten ungefähr fünfmal mehr IL-6 als die Zellen der Mediumkontrolle ( $p < 0,001$ ,  $n = 8$ ). Im Vergleich zu der Erythrocytenkontrolle, war die IL-6-Sekretion durch die PRBC-

aktivierten HUVECs um einen Faktor von 11 signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ,  $n = 8$ ). Die IL-6 Sekretion der PRBC-aktivierten HUVECs war deutlich höher als die der TNF $\alpha$ -aktivierten.

*Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten sind nicht nur in der Lage die Expression von ICAM-1 auf der Oberfläche der aktivierten HUVECs zu verändern, sie können außerdem die IL-6 Sekretion dieser aktivierten Zellen erhöhen. Die Aktivierung der Endothelzellen durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten unterscheidet sich von der Aktivierung durch TNF $\alpha$ .

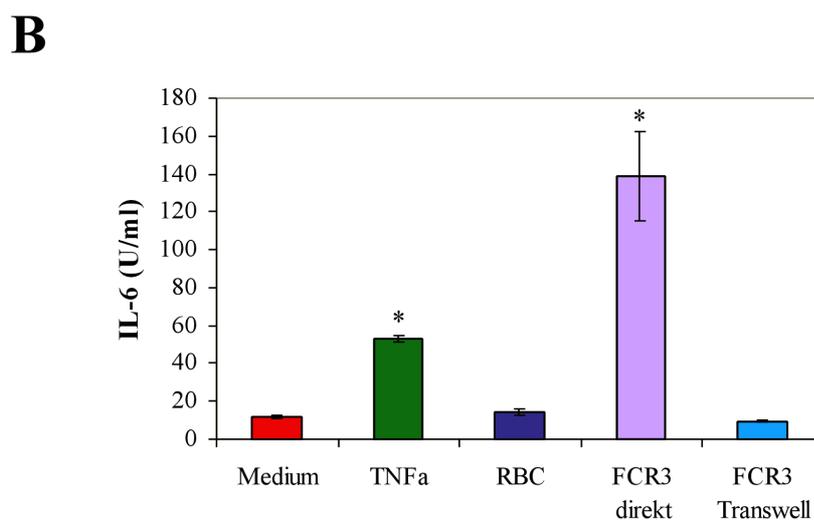
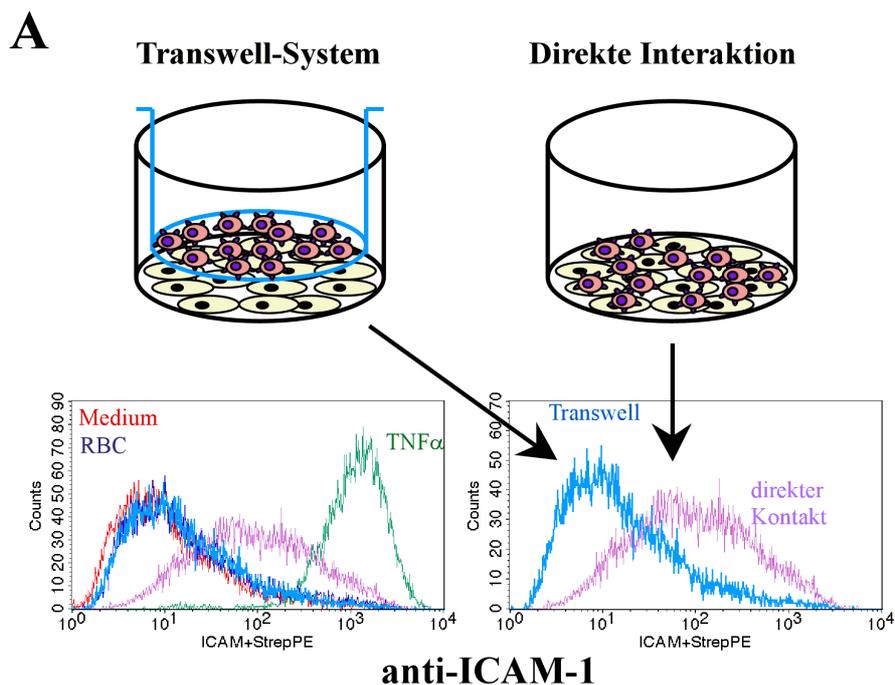
### 3.1.2 Aktivierung durch direkte Interaktion

Es stellt sich die Frage, ob die direkte Interaktion von PRBCs und Endothelzellen für deren Aktivierung erforderlich ist, oder ob von den PRBCs sezernierte lösliche Proteine oder andere Mediatoren ausreichen.

Aus diesem Grund wurden PRBCs und Endothelzellen in einem Transwell-System separiert, um den direkten Kontakt der Zellen zu verhindern. Es wurde eine Membran mit einer Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  verwendet. Lösliche Mediatoren sind in der Lage diese Poren durch Diffusion ohne Probleme zu passieren. Da die Bedingungen für die meisten Versuche gleich waren, werden in den jeweiligen Experimenten nur die Abweichungen von dem „Standardprotokoll“ beschrieben.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten die Endothelzellen nur aktivierten, wenn sie direkt interagieren konnten. Aktivierte HUVECs sezernierten IL-6 und die ICAM-1 Expression auf der Zelloberfläche war hochreguliert (Abb. 3.3). Wurden *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten durch eine Membran von den Endothelzellen getrennt und der direkte Kontakt verhindert, nicht aber der Austausch löslicher Moleküle, so fand keine Aktivierung der Endothelzellen statt. Die ICAM-1 Expression sowie die IL-6 Sekretion der Endothelzellen blieben im Vergleich zu den Negativkontrollen unverändert.

Diese Experimente zeigen, daß der direkte Kontakt von PRBCs und Endothelzellen für die Aktivierung erforderlich ist. Der Austausch löslicher Moleküle über das Medium ist nicht ausreichend.



**Abb. 3.3: Der direkte Kontakt *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten mit Endothelzellen ist für die Aktivierung erforderlich**

*P. falciparum*-infizierte Erythrocyten konnten Endothelzellen nicht aktivieren, wenn sie durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  getrennt waren. Der direkte Kontakt der Zellen war erforderlich.

**A:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und Analyse der ICAM-1 Expression

oben: Der Aufbau eines Transwell-Systems im Vergleich zur Inkubation mit direkter Interaktion ist schematisch dargestellt.

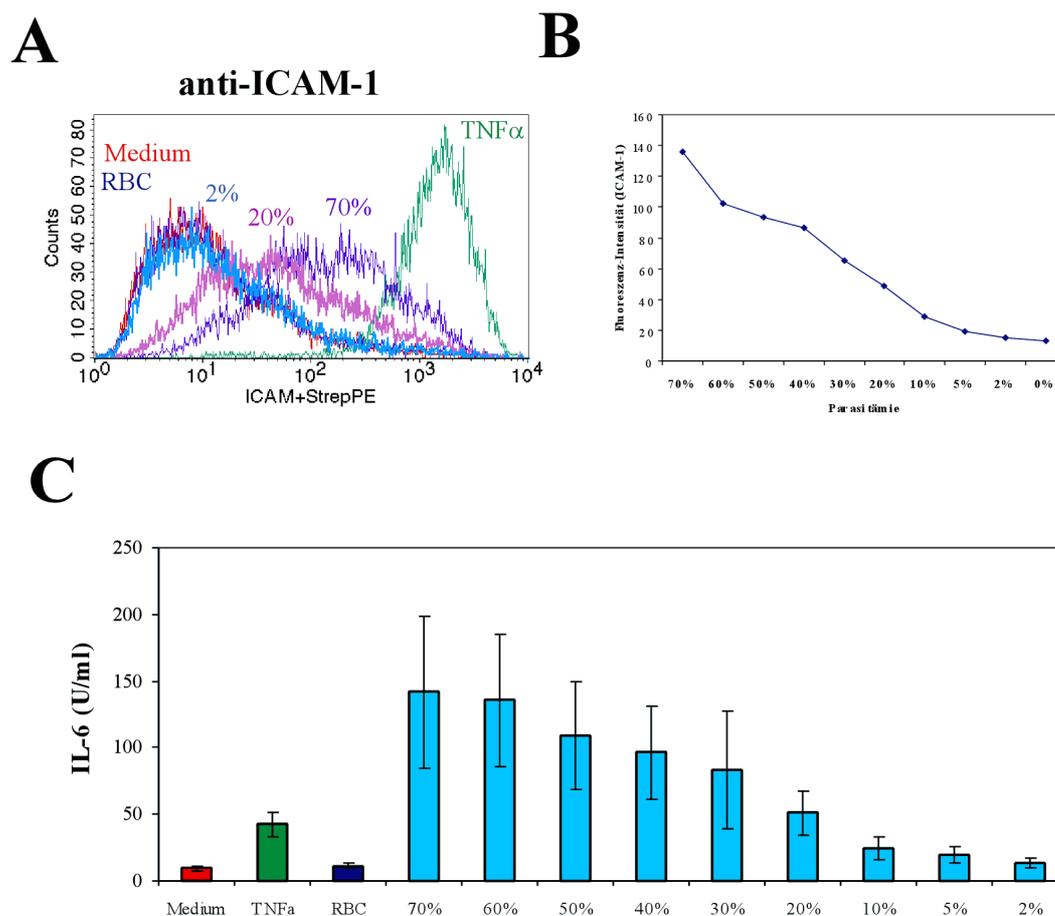
unten: Die Histogramme zeigen die Expression von ICAM-1 nach Behandlung der HUVEC-Zellen für 20 h. Die Zellen wurden mit  $\alpha$ -ICAM-1 Antikörpern gefärbt und anschließend im Durchflusscytometer analysiert. links: Es sind die Kontrollen dargestellt, sowie die beiden unterschiedlichen Ansätze mit Parasiten. Die Trennung von PRBCs und Endothelzellen in einem Transwell-System verhinderte die Aktivierung der Endothelzellen. rechts: Zur Verdeutlichung wurden nur die beiden Parasiten-Ansätze separat dargestellt.

**B:** Die Menge des in das Kulturmedium sezernierten IL-6, wurde mittels IL-6 ELISA bestimmt. Überstände wurden 20 h nach Aktivierung der Endothelzellen untersucht. Endothelzellen, die keinen direkten Kontakt mit PRBCs hatten, sezernierten wie die beiden Negativkontrollen kaum IL-6. Die IL-6 Sekretion in den Ansätzen TNF $\alpha$  (grün; \*,  $p < 0,01$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 2$ ) und FCR3 direkt (rosa; \*,  $p < 0,05$ , verglichen mit FCR3 Transwell,  $n = 2$ ) war signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der gemessenen IL-6 Konzentrationen (U/ml).

Es wurde ein abweichender Farbcode verwendet: FCR3 direkt: rosa und FCR3 Transwell: hellblau.

### 3.1.3 Titration der Parasitenanzahl und der Parasitämie

Da die Parasitämie im Blut der Patienten mit *Malaria tropica* oft sehr hoch ist und z.T. über 20% beträgt (Kayser et al., 2001), ist es möglich die Experimente mit Gelatine-angereicherten Parasiten und einer Parasitämie von 40-80% durchzuführen. Allerdings ist es notwendig zu untersuchen welche Parasitenanzahl bzw. Parasitämie für eine Aktivierung der Endothelzellen erforderlich ist.



**Abb. 3.4: Die Aktivierung der Endothelzellen ist abhängig von der Anzahl *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten und der Parasitämie**

**A:** Die Histogramme zeigen die Expression von ICAM-1 nach Behandlung der HUVEC-Zellen für 20 h. Die Zellen wurden mit  $\alpha$ -ICAM-1 Antikörpern gefärbt und anschließend im Durchflusscytometer analysiert. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden nur die Parasitenansätze mit 70%, 20% und 2% sowie die Kontrollen dargestellt. Eine Parasitämie von 70% entspricht in diesem Experiment  $5 \times 10^6$  PRBCs/ml, 20% entspricht  $1,4 \times 10^6$  PRBCs/ml und 2% entspricht  $1,4 \times 10^5$  PRBCs/ml. Je höher die Parasitämie und die Parasitenanzahl waren, desto höher war auch die Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche der Endothelzellen.

**B:** Darstellung des geometrischen Mittels der Fluoreszenz-Intensitäten der Zellen nach Oberflächenfärbung mit  $\alpha$ -ICAM-1 Antikörpern und Analyse im Durchflusscytometer. Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt. Mit abnehmender Parasitämie und Gesamtparasitenanzahl, nahm auch die Menge des exprimierten ICAM-1 ab.

**C:** Die Menge des in das Kulturmedium sezernierten IL-6, wurde mittels IL-6 ELISA bestimmt. Die Ausschüttung von IL-6 durch die aktivierten HUVECs war proportional zu der Parasitämie und Parasitenanzahl. Je weniger *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten für die Aktivierung eingesetzt wurden, um so weniger IL-6 wurde sezerniert.

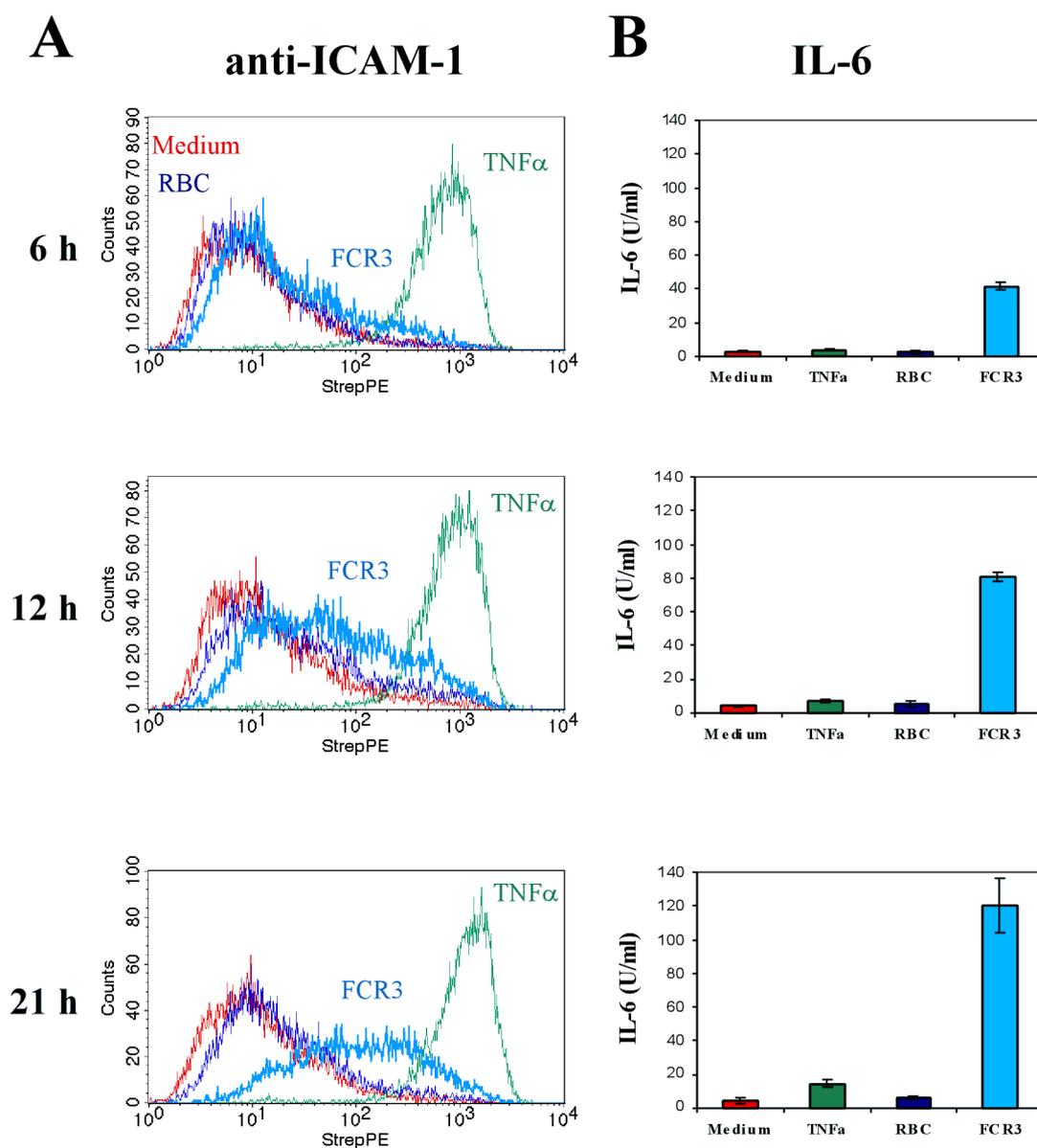
Es wurden mit Gelatine angereicherte Trophozoiten und Schizonten für dieses Experiment verwendet.  $5 \times 10^6$  PRBCs/ml mit einer Parasitämie von 70% wurden als Ausgangsparasitenpopulation in die Versuche eingesetzt. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Erythrocyten mit der gleichen Gesamtzellzahl. Um eine niedrigere Parasitämie zu erhalten, wurden die PRBCs in Erythrocyten verdünnt, so daß die Parasitämie sowie die Anzahl *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten in den Proben abnahm, nicht jedoch die Gesamtzellzahl. Es wurden Parasitämien von 70% bis 0% eingesetzt. Der Aktivierungszustand der Endothelzellen hing von der eingesetzten Parasitämie und der Parasitenzahl ab. Sowohl die Menge des sezernierten IL-6 als auch die Höhe der ICAM-1 Expression waren proportional zu der Anzahl verwendeter Parasiten (Abb. 3.4).

Dieses Experiment zeigt, daß der Aktivierungszustand der Endothelzellen direkt von der Parasitämie und der Anzahl eingesetzter *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten abhängt.

### 3.1.4 Zeitverlauf der Endothelzell-Aktivierung

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der Endothelzellen durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten nach 18 bis 22 h deutlich nachzuweisen ist. Es ist nicht bekannt, wie schnell die Endothelzellen ihre Expression von ICAM-1 verändern bzw. wie lange es dauert bis die Zellen mit der Sekretion von IL-6 beginnen.

Um diese Frage zu klären, wurden die Endothelzellen und Zellkulturüberstände nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Sowohl die TNF $\alpha$ -induzierten als auch die PRBC-induzierten Endothelzellen wurden aktiviert und reagierten bereits nach 6 h auf die Stimuli. Die durch TNF $\alpha$  und PRBCs ausgelösten Reaktionen der Zellen unterschieden sich jedoch deutlich. Während TNF $\alpha$ -aktivierte HUVECs schon nach 6 h mit maximaler Hochregulierung der ICAM-1 Expression reagierten, war eine Veränderung der ICAM-1 Expression der PRBC-aktivierten Endothelzellen nach 6 h noch kaum zu erkennen und steigerte sich erst im Laufe der Zeit (Abb. 3.5). Das Niveau der ICAM-1 Expression der Endothelzellen das durch TNF $\alpha$  induziert wurde, wurde durch Aktivierung der HUVECs mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten nicht erreicht. Wurde die IL-6 Sekretion dieser unterschiedlich aktivierten Zellpopulationen untersucht, konnten für die TNF $\alpha$ -induzierten HUVECs nach 6 h nur geringere Mengen an IL-6 detektiert werden, die im Verlauf der Zeit zunahmen. Im Vergleich konnte bereits nach 6 h eine deutliche Zunahme der IL-6 Sekretion durch die PRBC-aktivierten HUVECs beobachtet werden, die sich im Verlauf des Experiments steigerte.



**Abb. 3.5: Zeitkinetik der Endothelzell-Aktivierung**

Die Versuche wurden nach 6 h, 12 h und 22 h gestoppt und die ICAM-1 Expression der aktivierten Endothelzellen mittels FACS-Analyse bestimmt (A). Die Aktivierung der Endothelzellen durch TNF $\alpha$  (10 ng/ml) führte bereits nach 6 h zu einer maximalen Hochregulierung von ICAM-1, die über die gesamte Versuchsdauer bestehen blieb. Im Vergleich erfolgte die Hochregulierung der ICAM-1 Expression durch die PRBC-aktivierten HUVECs deutlich langsamer. Nach 6 h waren kaum Veränderungen in der Expression zu erkennen. Die Expression von ICAM-1 wurde erst mit der Zeit deutlich gesteigert.

**B:** Die Sekretion von IL-6 in den Medienüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. In diesem Experiment konnten für die TNF $\alpha$ -induzierten HUVECs nur geringe Mengen an IL-6 detektiert werden, die im Verlauf der Zeit etwas zunahm. Im Vergleich konnte bereits nach 6 h eine deutliche Zunahme der IL-6 Sekretion durch die PRBC-aktivierten HUVECs beobachtet werden, die sich im Verlauf des Experiments steigerte.

Diese Daten zeigen, daß die Aktivierung der Endothelzellen sowohl durch TNF $\alpha$  als auch durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten bereits nach 6 h erkennbar ist, sich das Ausmaß der Aktivierung jedoch deutlich unterscheidet.

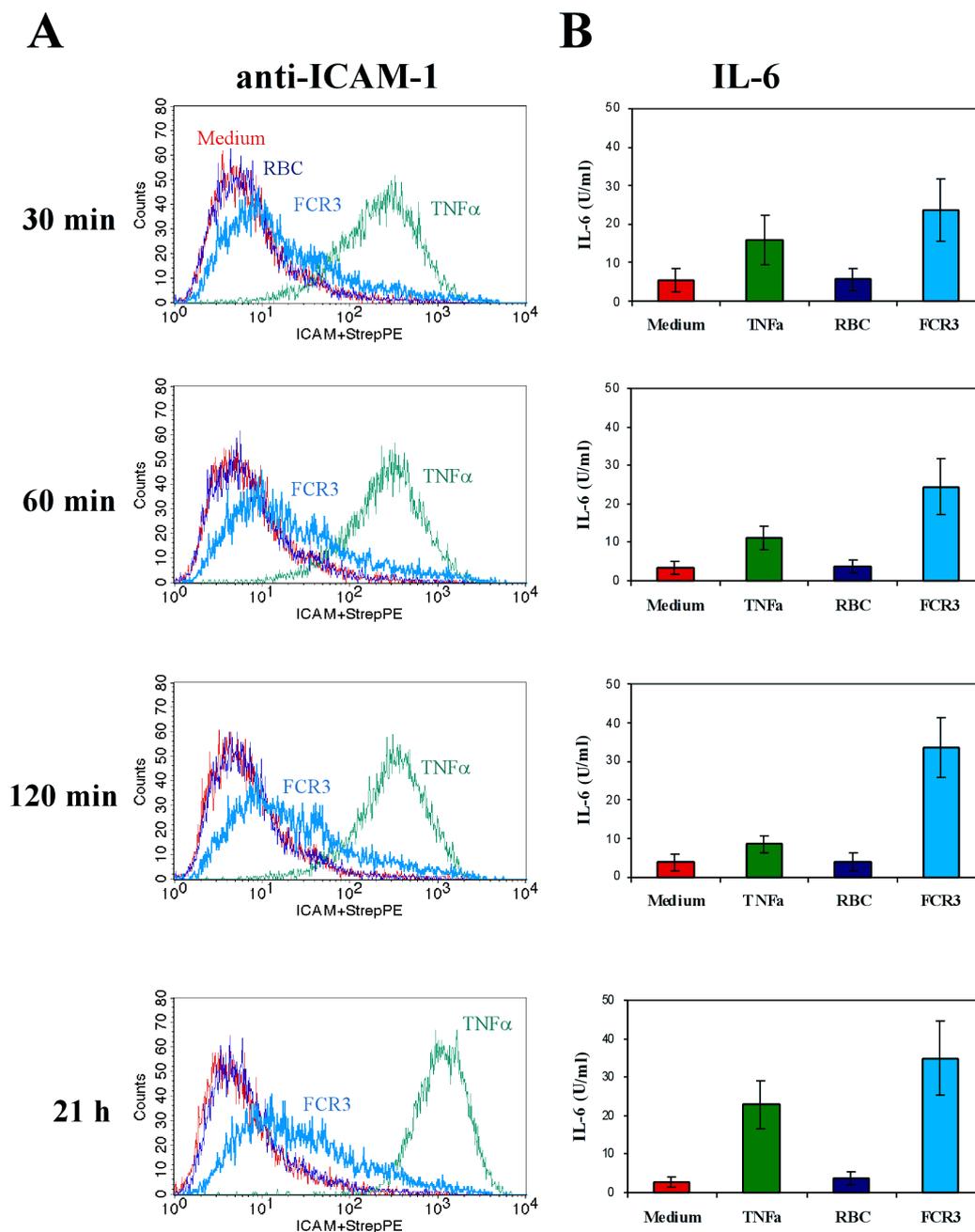
### 3.1.5 Induktion der Aktivierung durch kurzen Kontakt von PRBCs und Endothelzellen

*P. falciparum*-infizierte Erythrocyten im Blutstrom des Malariapatienten kommen mit Endothelzellen nur kurz in Kontakt, es sei denn sie cytoadhärieren an Endothelzellen. Es ist daher wichtig zu untersuchen, ob eine kurze Interaktion der *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit den Endothelzellen ausreichend ist, um eine Aktivierung der Endothelzellen zu induzieren oder ob eine längerfristige Interaktion stattfinden muß.

Um diese Frage zu klären, wurden die Endothelzellen nach verschiedenen Zeitpunkten dreimal mit Endothelzellmedium gewaschen, um *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten zu entfernen. Die Zellen der Kontrollen wurden ebenfalls gewaschen, um eventuelle Einflüsse die durch das Waschen entstehen könnten zu erkennen. Die Analyse erfolgte nach weiteren 18 – 20 h.

Eine 30-minütige Coinkubationszeit der Endothelzellen mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten sowie mit TNF $\alpha$  reichte aus, um die Endothelzellen zu aktivieren. Die Aktivierung der Endothelzellen ließ sich mit zunehmender Coinkubationszeit verstärken. Je länger *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten mit den Endothelzellen kokultiviert wurden, desto höher war die Menge des sezernierten IL-6 sowie die Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche. TNF $\alpha$ -aktivierte HUVECs verstärkten die ICAM-1 Expression ebenfalls mit zunehmender Stimulierungsdauer. Die Menge des detektierten IL-6 war nach 30 min Stimulation mit TNF $\alpha$  deutlich höher als nach 1 h bzw. 2 h.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, daß schon der kurze Kontakt von *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit den Endothelzellen ausreicht, um Endothelzellen zu aktivieren. Diese Aktivierung läßt sich mit zunehmender Coinkubationszeit verstärken.



**Abb. 3.7: Induktion der Aktivierung durch kurzen Kontakt von PRBCs und Endothelzellen**

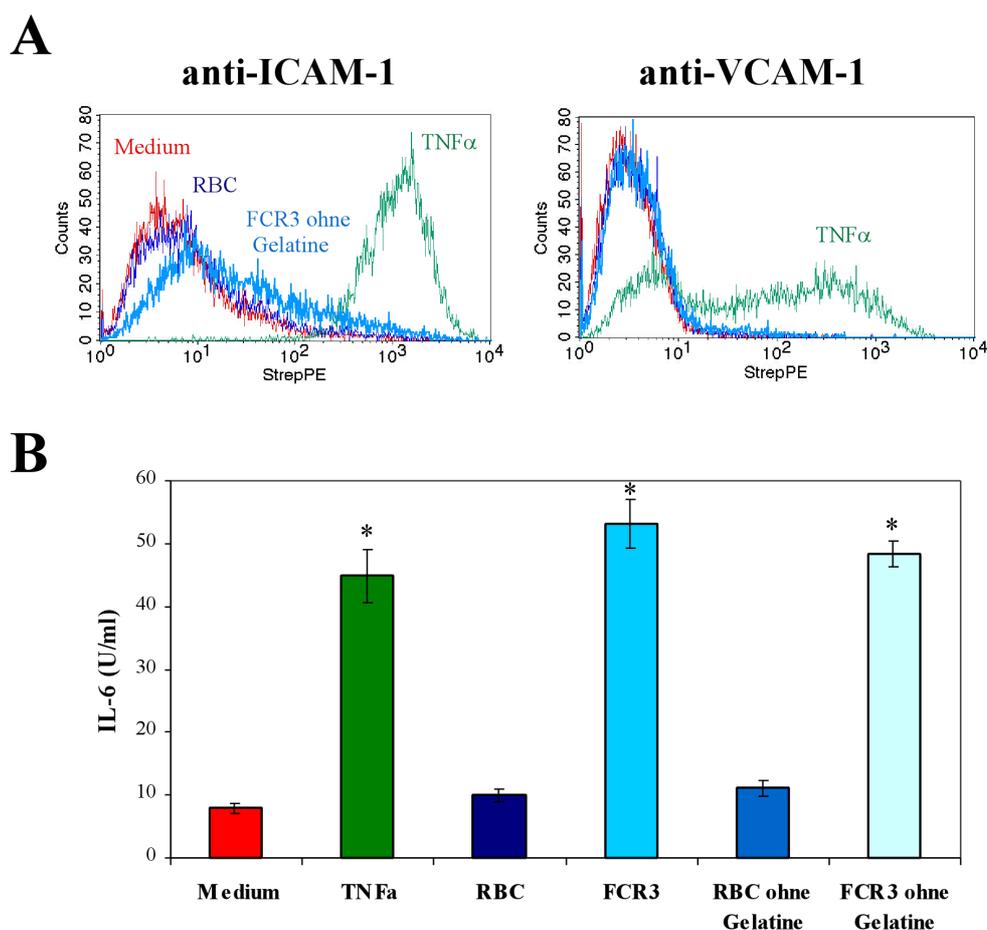
Die Endothelzellen wurden nach 30 min, 60 min und 120 min gewaschen, um PRBCs, RBCs und TNF $\alpha$  zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend für weitere 18–20 h inkubiert.

**A:** Die ICAM-1 Expression der behandelten HUVECs wurde mittels FACS-Analyse bestimmt und in den Histogrammen dargestellt. Bereits 30 min Kontakt der HUVECs mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten waren ausreichend, um die Endothelzellen zu aktivieren. Mit zunehmender Coinkubationszeit wurde die Aktivierung der Endothelzellen verstärkt, d.h. die Zellen exprimierten höhere Mengen an ICAM-1 auf der Zelloberfläche. Auch die TNF $\alpha$ -behandelten Zellen exprimierten abhängig von der Coinkubationszeit mehr ICAM-1. Das Waschen der HUVECs zeigte keinen Effekt auf den Aktivierungszustand der Zellen.

**B:** Die Menge des sezernierten IL-6 wurde mittels ELISA bestimmt. Schon 30 min Coinkubationszeit waren ausreichend, um die IL-6 Sekretion sowohl in PRBC als auch in TNF $\alpha$ -behandelten Zellen zu induzieren. Während die Menge des sezernierten IL-6 bei den PRBC-behandelten HUVECs mit der Coinkubationszeit zunahm, nahm die Menge des durch die TNF $\alpha$ -aktivierten HUVECs sezernierten IL-6 zuerst ab und anschließend wieder zu.

### 3.1.6 Kein Einfluß der Gelatine-Behandlung auf die Endothelzell-Aktivierung

Es ist nicht auszuschließen, daß die Behandlung der PRBCs und RBCs mit Gelatine einen Einfluß auf die Aktivierung der Endothelzellen hat. Aus diesem Grund wurden die Parasiten bis zu einer Parasitämie von 20-25% kultiviert, indem der Hämatokrit in den Parasitenkulturen verringert wurde.



**Abb. 3.7: Kein Einfluß der Gelatine Behandlung der PRBCs und RBCs auf die Endothelzell-Aktivierung**

**A:** Die Histogramme zeigen die Expression von ICAM-1 nach Behandlung der HUVEC-Zellen für 20 h. Die Zellen wurden mit  $\alpha$ -ICAM-1 Antikörpern gefärbt und anschließend im Durchflusscytometer analysiert. *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten, die nicht mittels Gelatine-Sedimentation angereichert wurden, konnten die Endothelzellen aktivieren und die Expression von ICAM-1 hochregulieren.

**B:** Die Sekretion von IL-6 in den Medienüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Zellen der Mediumkontrolle und der Erythrocytenkontrollen mit bzw. ohne Gelatine-Behandlung sezernierten nur geringe Mengen IL-6, der Unterschied zwischen diesen Kontrollen war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 2$ ). Die IL-6 Sekretion in den Ansätzen TNF $\alpha$  (\*,  $p < 0,05$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 2$ ), FCR3 (\*,  $p < 0,01$ , verglichen mit RBC,  $n = 2$ ) und „FCR3 ohne Gelatine“ (\*,  $p < 0,01$ , verglichen mit „RBC ohne Gelatine“,  $n = 2$ ) war signifikant erhöht. Der Unterschied in der Menge des sezernierten IL-6 in den Ansätzen FCR3 und „FCR3 ohne Gelatine“ war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 2$ ).

Infizierte und nicht-infizierte Erythrocyten wurden nur abzentrifugiert, einmal in RPMI 1640, 5% FCS gewaschen und in Endothelzellmedium resuspendiert. In das Experiment wurden  $5 \times 10^6$  PRBCs/ml bzw. die zugehörige Anzahl Erythrocyten eingesetzt.

Vergleicht man die Aktivierung der Endothelzellen durch PRBCs, die mit Gelatine behandelt wurden mit der Aktivierung durch unbehandelte PRBCs, so konnte in den Versuchen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.8). Unbehandelte PRBCs konnten die Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche der Endothelzellen hochregulieren. Die Menge des sezernierten IL-6 in den Ansätzen FCR3 bzw. „FCR3 ohne Gelatine“ war vergleichbar. Die Medium- und Erythrocyten-Kontrollen wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf. Im Vergleich zu früheren Experimenten war die Aktivierung der Endothelzellen durch die PRBCs geringer, unabhängig von der Behandlungsweise.

Die Verwendung der Gelatine-Sedimentation zur Anreicherung der *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten hat keinen negativen Einfluß auf die Aktivierung der Endothelzellen.

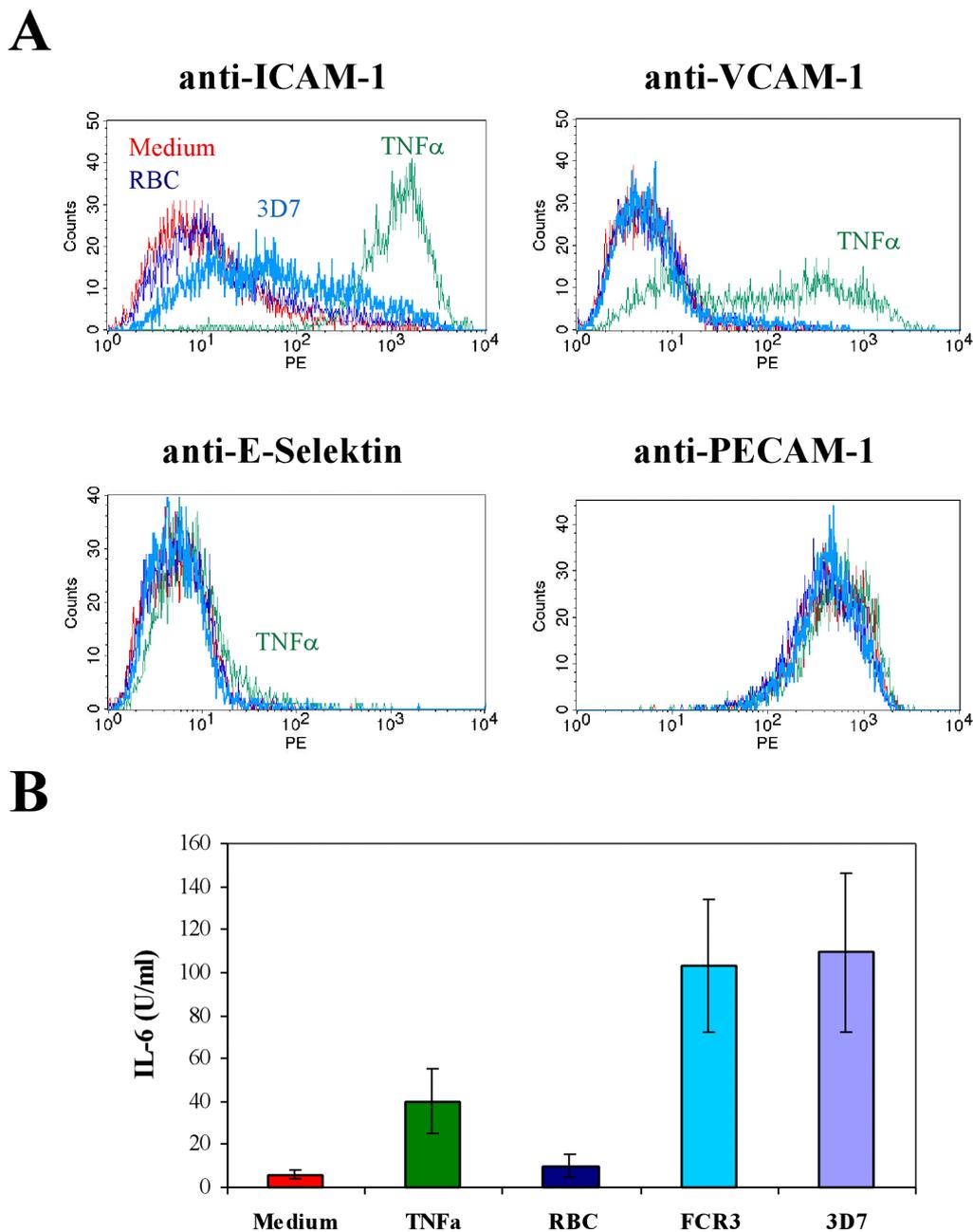
### **3.1.7 Aktivierung durch *P. falciparum*-Parasiten anderer klonaler Linien**

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde der Parasitenstamm FCR3 verwendet. Da FCR3 ein Klon ist, der seit längerer Zeit unter Kulturbedingungen gehalten wird, ist es möglich, daß sich diese Parasiten verändert haben. Um auszuschließen, daß die Adaptation der Parasiten an die Kulturbedingungen eine artifizielle Aktivierung der Endothelzellen bewirkt, wurden einige der Versuche mit Parasiten anderer Klone wiederholt.

#### **3.1.7.1 Parasiten der klonalen Linie 3D7**

*Plasmodium falciparum*-Parasiten des Klons 3D7 sind ebenfalls an Kulturbedingungen adaptiert, stammen jedoch aus einer anderen Region und unterscheiden sich genotypisch von Parasiten des FCR3-Klons. Sie werden für viele Experimente verwendet, da ihr Genom durchsequenziert ist (Gardner et al., 2002).

In diesen Experimenten konnte kein Unterschied in der Aktivierung der Endothelzellen durch die beiden unterschiedlichen Parasitenstämme festgestellt werden (Abb 3.8). Wie FCR3 war auch 3D7 in der Lage, die Expression von ICAM-1 auf der Oberfläche der Endothelzellen hochzuregulieren, während die Expression der Oberflächenmoleküle VCAM-1, E-Selektin und PECAM-1 unverändert blieb. Die Sekretion von IL-6 wurde in den 3D7-aktivierten HUVECs induziert, es konnte kein signifikanter Unterschied zu FCR3 festgestellt werden.



**Abb. 3.8: Parasiten des Klon 3D7 aktivieren Endothelzellen auf die gleiche Weise**

**A:** Die Histogramme zeigen die Expression von ICAM-1 nach Behandlung der HUVEC-Zellen für 20 h. Die Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern gefärbt und anschließend im Durchflusscytometer analysiert. Erythrocyten, die mit Plasmodien des Stammes 3D7 infiziert waren, konnten die Endothelzellen aktivieren und die ICAM-1 Expression hochregulieren. Die Expression von VCAM-1, E-Selektin und PECAM-1 wurde nicht verändert. TNF $\alpha$ -aktivierte Endothelzellen regulierten die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und sehr schwach von E-Selektin hoch.

**B:** Die Sekretion von IL-6 in den Medienüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Der Unterschied in der IL-6 Sekretion von FCR3-aktivierten Endothelzellen verglichen mit 3D7-aktivierten HUVECs war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 2$ ).

Erythrocyten, die mit Plasmodien des Stammes 3D7 infiziert sind, können Endothelzellen in gleicher Weise aktivieren wie Parasiten des Stammes FCR3.

### 3.1.7.2 ICAM-1 bindende *P. falciparum*-Parasiten

Parasiten der Stämme A4 und ItG wurden auf Adhäsion an ICAM-1 selektioniert. Da HUVECs geringe Mengen an ICAM-1 exprimieren, sollten diese Parasiten in der Lage sein mit den Endothelzellen zu interagieren und an sie zu adhären. Unklar ist, ob die Parasiten A4 und ItG aufgrund ihres Phänotyps eine stärkere Aktivierung der HUVECs hervorrufen.

Erythrocyten, die mit Plasmodien der Stämme A4 und ItG infiziert waren, aktivierten die Endothelzellen auf die gleiche Weise wie Parasiten des Stammes FCR3 (Abb. 3.9). Obwohl sie die Fähigkeit besitzen an ICAM-1 zu adhären und HUVECs im unaktivierten Zustand geringe Mengen ICAM-1 exprimieren, war kein Unterschied in der Aktivierung der HUVECs durch A4 und ItG im Vergleich zu FCR3 zu erkennen. Diese ICAM-1 bindenden Parasiten stimulierten nur die ICAM-1 Expression der Endothelzellen und induzierten die Sekretion von IL-6. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Mengen des sezernierten IL-6 in den Ansätzen mit den verschiedenen Parasiten festgestellt werden.

Erythrocyten, die mit ICAM-1-bindenden Plasmodien infiziert sind, aktivieren die Endothelzellen genauso wie Plasmodien der Stämme FCR3 und 3D7.

**Abb. 3.9: ICAM-1 bindende *Plasmodium*-Parasiten aktivieren Endothelzellen (Abbildung: siehe nächste Seite)**

**A:** Die Histogramme zeigen die Expression von ICAM-1 nach Behandlung der HUVEC-Zellen für 20 h. Die Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern gefärbt und anschließend im Durchflusscytometer analysiert. Erythrocyten, die mit Plasmodien des Stammes A4 bzw. ItG infiziert waren, konnten die Endothelzellen aktivieren und die ICAM-1 Expression hochregulieren. Die Expression von VCAM-1, E-Selektin und PECAM-1 wurde nicht verändert. TNF $\alpha$ -aktivierte Endothelzellen regulierten die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und sehr schwach von E-Selektin hoch. PECAM-1 blieb unverändert.

**B:** Die Sekretion von IL-6 in den Medienüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Der Unterschied in der IL-6 Sekretion von FCR3-aktivierten Endothelzellen verglichen mit A4- bzw. ItG-aktivierten HUVECs war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 2$ ). Die IL-6 Sekretion in den Ansätzen TNF $\alpha$  (\*,  $p < 0,01$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 2$ ), A4 (\*,  $p < 0,05$ , verglichen mit RBC,  $n = 2$ ) und ItG (\*,  $p < 0,001$ , verglichen mit RBC,  $n = 2$ ) war signifikant erhöht.

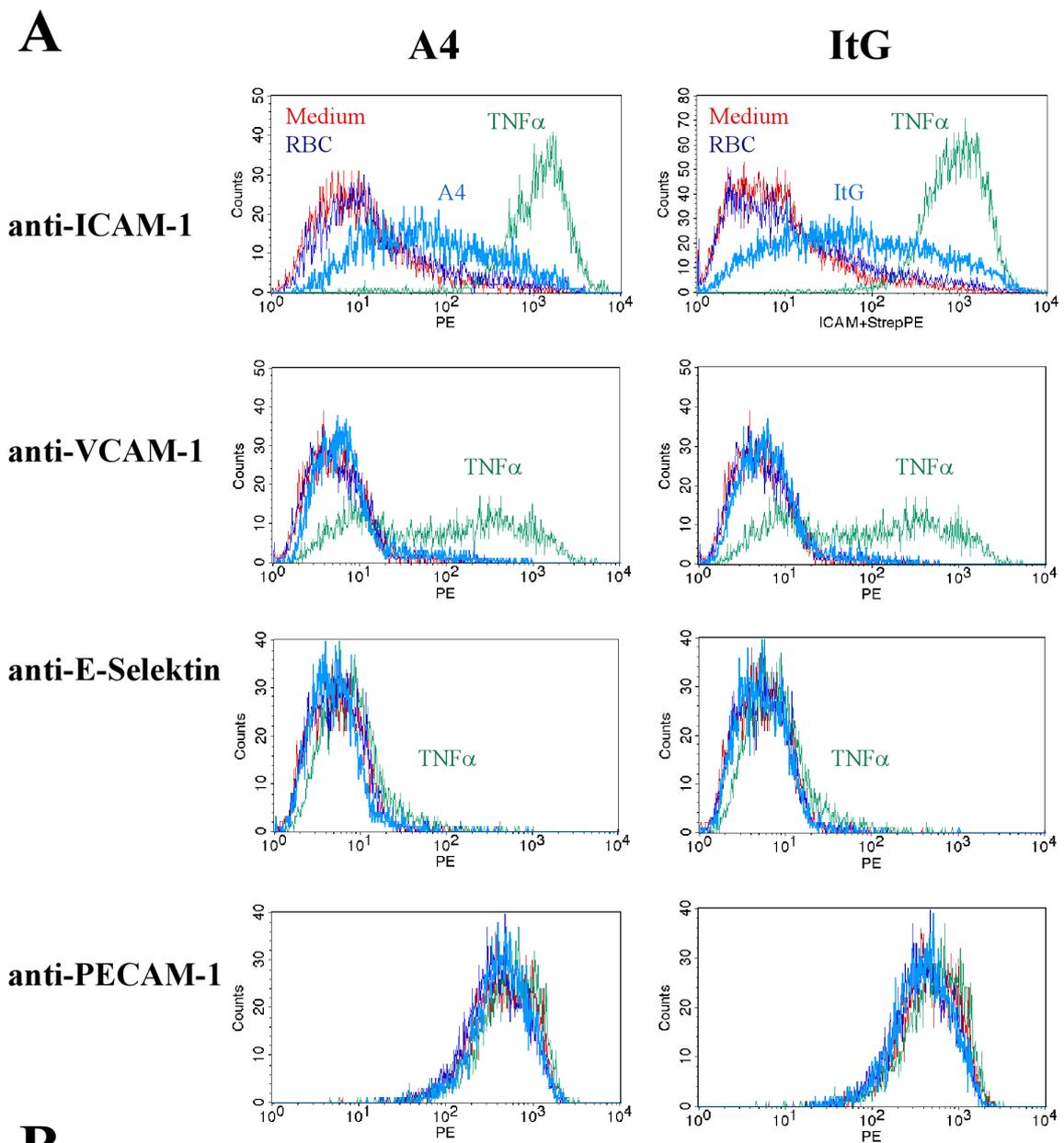


Abb. 3.9: ICAM-1 bindende *Plasmodium*-Parasiten aktivieren Endothelzellen

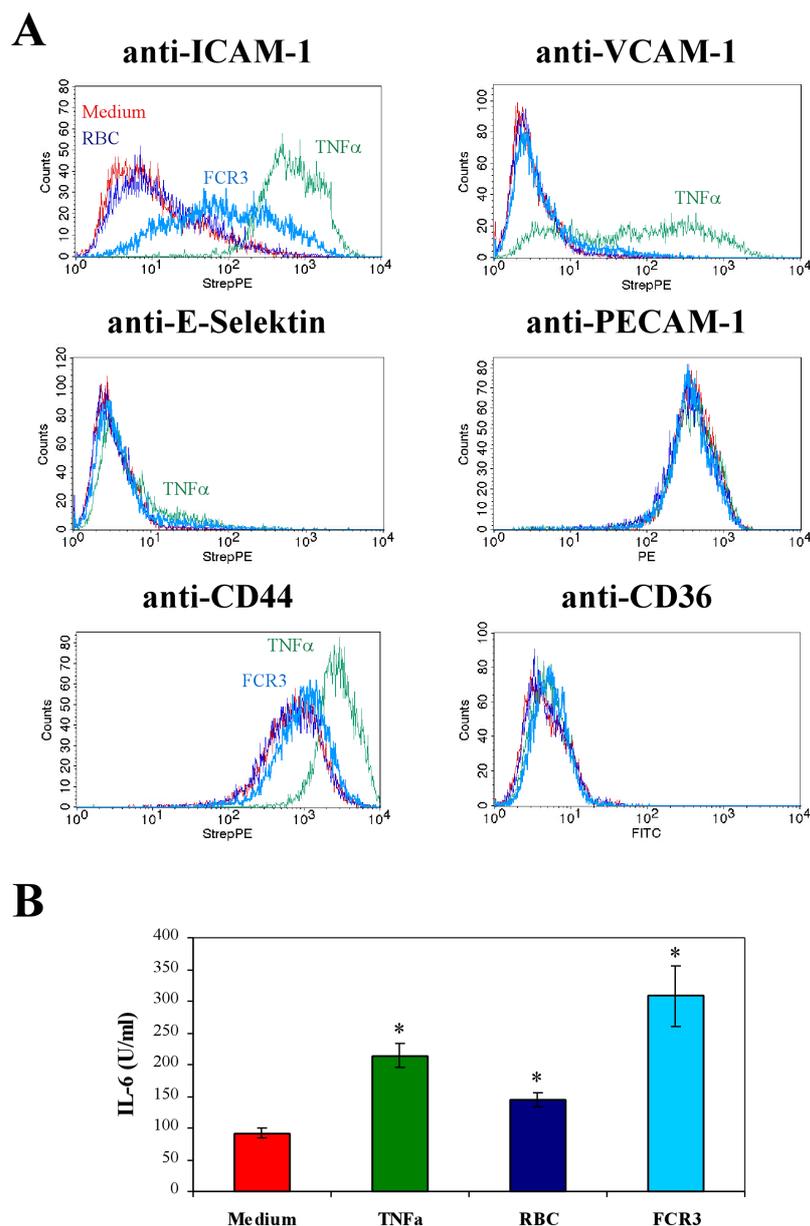
### 3.1.8 Aktivierung unterschiedlicher primärer Endothelzellen

Humane Nabelschnur-Endothelzellen eignen sich gut als Modell zur Untersuchung von Aktivierungsvorgängen, da sie relativ leicht zu isolieren und ausreichend charakterisiert sind. Im Malaria-Patienten kommen diese Zellen jedoch nicht in Kontakt mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrocyten, da die Plazenta normalerweise eine Barriere für nicht-infizierte sowie für infizierte Erythrocyten darstellt. Eine Ansteckung des Fötus mit *Plasmodium falciparum* wird so verhindert. Endothelzellen anderer Blutgefäße sollten sich durch *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten auf ähnliche Weise aktivieren lassen wie die HUVECs.

#### 3.1.8.1 Humane arterielle Endothelzellen der Lunge (HPAEC)

*Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten können in der Lunge sequestrieren (Miller et al., 2002), d.h. mit Endothelzellen der Lunge interagieren. Humane arterielle Endothelzellen der Lunge (HPAEC) sind Zellen, die mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrocyten in Kontakt kommen können.

Humane arterielle Endothelzellen der Lunge wurden mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten kokultiviert. Anschließend wurde der Aktivierungszustand der Zellen bestimmt. HPAEC reagierten auf die Stimulation mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten durch verstärkte Expression der Oberflächenmoleküle ICAM-1 und CD44, sowie mit erhöhter Sekretion von IL-6 ( $p < 0,01$ , verglichen mit RBC-Kontrolle) (Abb. 3.10). Die Expression von VCAM-1, E-Selektin, PECAM-1 und CD36 wurde nicht verändert. TNF $\alpha$  induzierte die erhöhte Expression von ICAM-1, VCAM-1, CD44 und schwach von E-Selektin, sowie die Sekretion von IL-6 ( $p < 0,001$ , verglichen mit Mediumkontrolle). Die Expression von PECAM-1 und CD36 wurde durch TNF $\alpha$  ebenfalls nicht verändert. Kokultivierung der HPAEC mit Medium oder RBC führte zu keiner Veränderung in der Expression der Oberflächenmoleküle der Endothelzellen, aber zu einer erhöhten IL-6 Sekretion der Endothelzellen, die mit RBC kokultiviert wurden ( $p < 0,01$ , verglichen mit Mediumkontrolle). *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten können nicht nur humane Nabelschnur-Endothelzellen aktivieren, sie sind auch in der Lage humane arterielle Endothelzellen der Lunge in ähnlicher Weise zu aktivieren.



**Abb. 3.10: Aktivierung von humanen arteriellen Endothelzellen der Lunge durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten**

Die Endothelzellen wurden für 18 – 22 h mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten kokultiviert und die Zellen und Medienüberstände anschließend analysiert.

**A:** Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, PECAM-1, CD44, CD36 wurde durch Färbung der Zellen mit Antikörpern und anschließender Analyse im Durchflusscytometer bestimmt. Die Histogramme zeigen die Expression der unterschiedlichen Adhäsionsmoleküle für die verschiedenen Ansätze. Zellen der Medium- und Erythrocytenkontrolle (RBC) zeigten nur eine geringe Expression von ICAM-1 und keine Expression von VCAM-1 und E-Selektin. TNF $\alpha$  aktivierte Endothelzellen und regulierte die Expression von ICAM-1, VCAM-1, CD44 und schwach von E-Selektin hoch. *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten konnten die ICAM-1 und CD44 Expression erhöhen, nicht aber die Expression der anderen Moleküle. Für die Expression von CD36 und PECAM-1 wurden keine Unterschiede sichtbar.

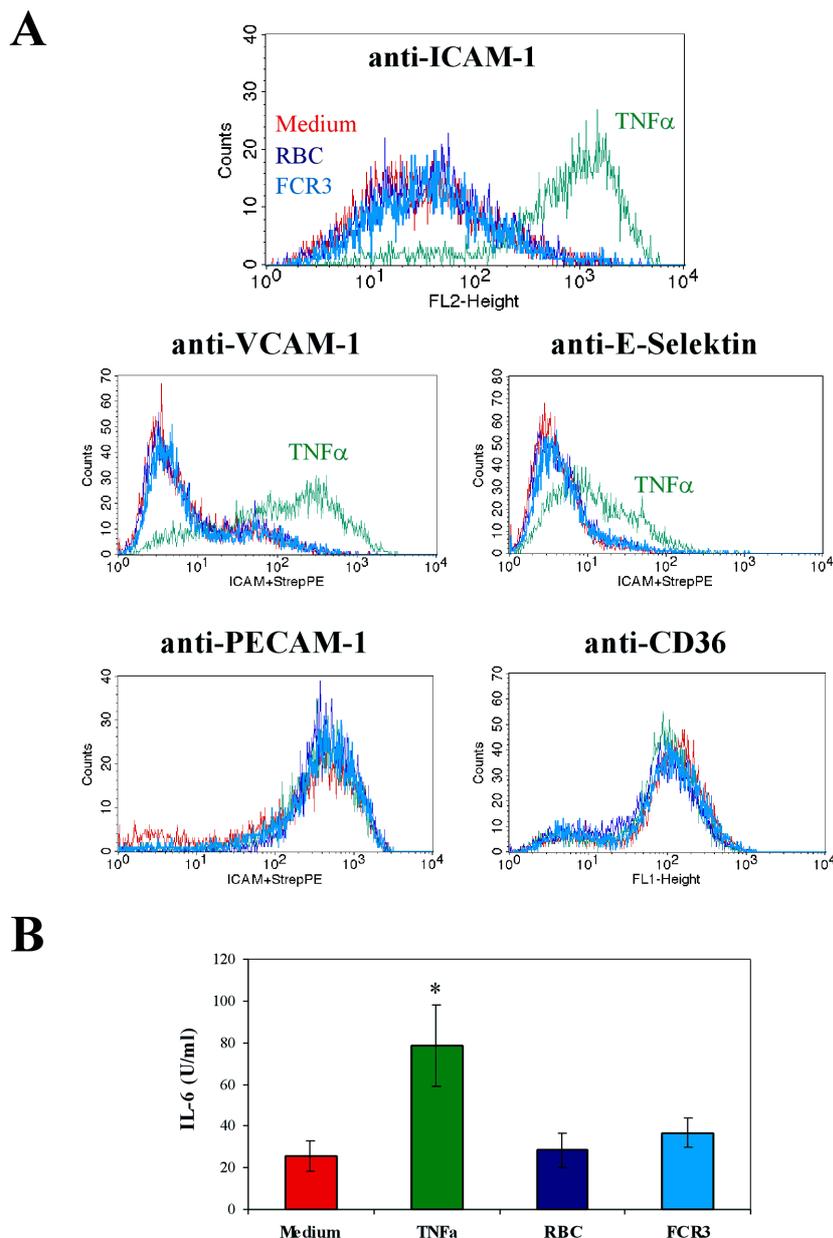
**B:** Die Menge des in den Medienüberstand sezernierten IL-6 wurde mittels ELISA bestimmt. Zellen der Negativkontrollen Medium und RBC sezernierten deutlich weniger IL-6 als die durch TNF $\alpha$ - und PRBC-aktivierte HPAEC. Die IL-6 Sekretion der Endothelzellen, die mit TNF $\alpha$  (\*,  $p < 0,001$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 7$ ) und FCR3 (\*,  $p < 0,01$ , verglichen mit RBC-Kontrolle,  $n = 7$ ) aktiviert wurden, war signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. In diesen Experimenten war auch die RBC-Kontrolle im Vergleich zu der Mediumkontrolle erhöht (\*,  $p < 0,01$ ,  $n = 7$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der gemessenen IL-6 Konzentrationen (U/ml) der Versuche.

### 3.1.8.2 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC)

Die eigentlichen Probleme in der durch *P. falciparum* ausgelösten Malaria verursachen infizierte Erythrocyten, die in der Mikrovaskulatur adhäreren und die kleinen Blutgefäße verstopfen. Aus diesem Grund wurden einige der Versuche mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen der Haut (HDMEC) wiederholt.

*P. falciparum*-infizierte Erythrocyten konnten in den durchgeführten Experimenten die humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen nicht aktivieren. Es konnte kein Unterschied in der Expression der Oberflächenmoleküle ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, PECAM-1 und CD36 festgestellt werden (Abb. 3.11). Im Vergleich zu den Medium- und RBC-Kontrollen war die IL-6 Sekretion in den Ansätzen mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten leicht, jedoch nicht signifikant erhöht ( $p > 0,05$ ,  $n = 8$ ). Die Aktivierbarkeit der humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen wurde in der TNF $\alpha$ -Kontrolle überprüft. Durch TNF $\alpha$  ließ sich die Expression der Moleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin hochregulieren. TNF $\alpha$  hatte keinen Effekt auf die Expression von PECAM-1 und CD36, induzierte aber die erhöhte Sekretion von IL-6 (\*,  $p < 0,05$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 8$ ).

*P. falciparum*-infizierte Erythrocyten können humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen nicht aktivieren. Da jedoch nur isolierte HDMEC-Zellen eines Spenders verwendet wurden, ist nicht auszuschließen, daß die Aktivierung mit Zellen eines anderen Isolats vergleichbar zu den Ergebnissen mit HUVECs und HPAECs ist.



**Abb. 3.11: Keine Aktivierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten**

Die Endothelzellen wurden für 18 – 22 h mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten kokultiviert und die Zellen und Medienüberstände anschließend analysiert.

**A:** Die Histogramme zeigen die Expression von ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, PECAM-1 und CD36 nach Behandlung der HDMEC-Zellen. Die Expression der Adhäsionsmoleküle wurde durch Färbung der Zellen mit Antikörpern und anschließender Analyse im Durchflusscytometer bestimmt. Zellen der Medium- und Erythrocytenkontrolle (RBC) zeigten Expression von CD36, nur eine schwache Expression von ICAM-1 und keine Expression von VCAM-1 und E-Selektin. TNF $\alpha$  aktivierte Endothelzellen und regulierte die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin hoch. *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten konnten weder die ICAM-1 Expression signifikant erhöhen, noch die Expression der anderen Moleküle verändern. Für die Expression von CD36 und PECAM-1 wurden keine Unterschiede sichtbar.

**B:** Die Menge des in den Medienüberstand sezernierten IL-6 wurde mittels ELISA bestimmt. Zellen der Negativkontrollen Medium und RBC sezernierten kaum weniger IL-6 als die PRBC-aktivierten HDMEC ( $p > 0,05$ , verglichen mit Mediumkontrolle bzw. RBC-Kontrolle,  $n = 8$ ). Die IL-6 Sekretion der Endothelzellen, die mit TNF $\alpha$  aktiviert wurden (\*,  $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ), war signifikant erhöht im Vergleich zu der Mediumkontrolle. Die Negativkontrollen Medium und RBC wiesen keine signifikanten Unterschied auf ( $p > 0,05$ ,  $n = 8$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der gemessenen IL-6 Konzentrationen (U/ml) der Versuche.

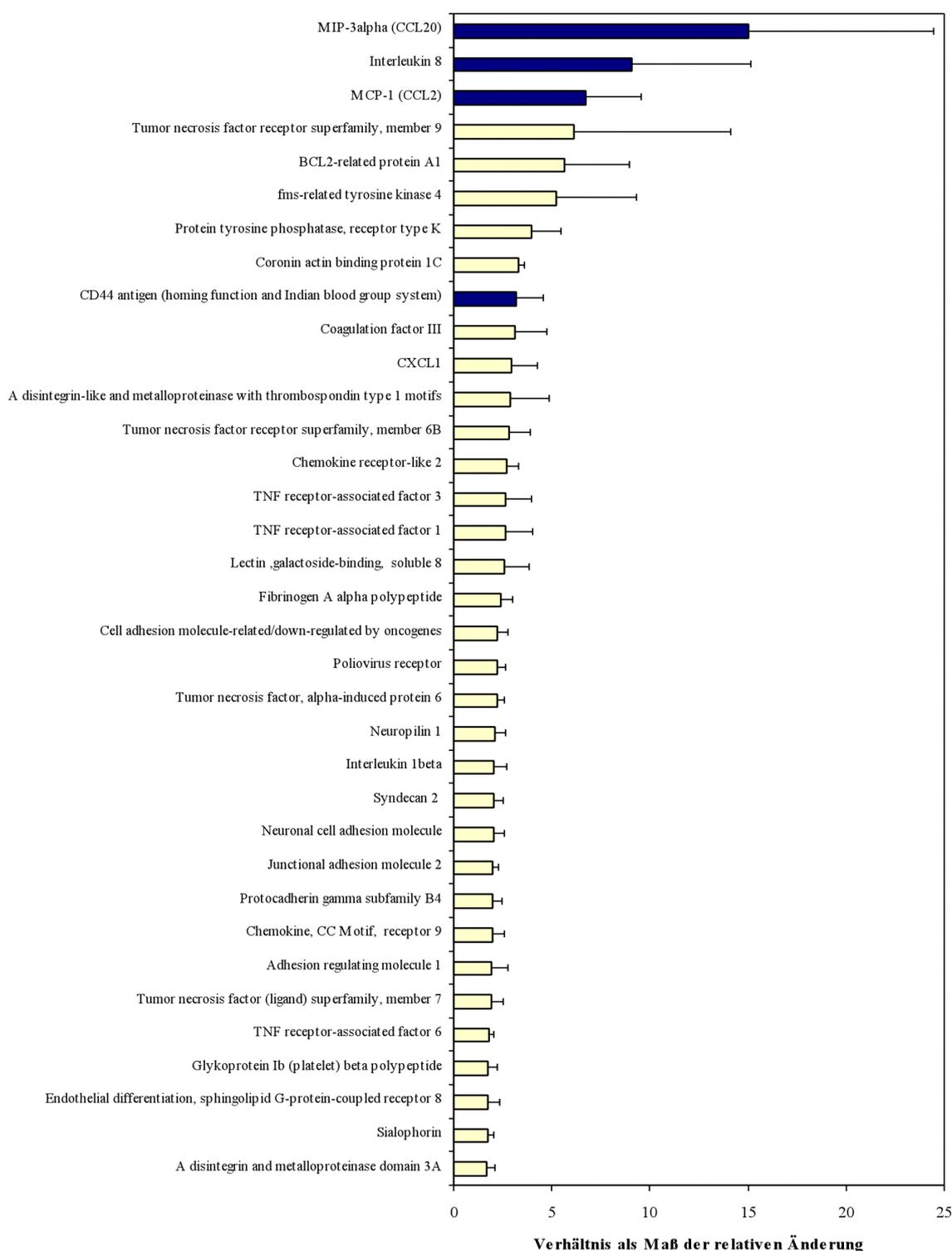
### 3.1.9 Bestimmung des Transkriptions- und Expressionsmusters PRBC-aktivierter Endothelzellen

Microarray-Analysen eignen sich für die gleichzeitig Untersuchung der Transkriptionsmuster vieler verschiedener Gene in einem einzigen Experiment.

#### 3.1.9.1 Ergebnisse der Microarray-Analyse

Die Microarrays wurden von Dr. Ulrich Wulbrand, Medizinische Hochschule Hannover, durchgeführt. Für die Microarray-Analyse wurden HUVECs mit nicht-infizierten und mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten für 12 h kokultiviert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die Aktivierung der Endothelzellen zu diesem Zeitpunkt schon deutlich sichtbar ist, wenn die Parameter ICAM-1 und IL-6 betrachtet werden, die Aktivierung aber noch weiter zu steigern ist, wenn die Kokultivierungsdauer bis auf 22 h ausgeweitet wird. Es wurden zwei Experimente mit jeweils zwei Ansätzen für Endothelzellen, die mit nicht-infizierten bzw. mit FCR3-infizierten Erythrocyten coinkubiert wurden, durchgeführt. Die RNA wurde aus allen Proben getrennt aufgereinigt und es wurden fluorochrom-markierte Sonden hergestellt mit denen die Chips hybridisiert wurden. Der Unterschied in der Menge der Transkripte in PRBC-aktivierten Endothelzellen im Vergleich zu RBC-behandelten Endothelzellen wird als Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten angegeben. Der verwendete Chip enthielt 618 Gene, von denen 16 Gene als Haushalts-Gene („House-keeping-genes“) eingetragen sind. Nach Standardisierung der Arraydaten und anschließender statistischer Analyse über SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Chu et al.) konnten 35 Gene identifiziert werden, deren Transkripte in beiden Experimenten und in allen vier Ansätzen in den PRBC-aktivierten Endothelzellen signifikant hochreguliert waren (Abb. 3.12). Eine deutlich erhöhte Transkription in den PRBC-aktivierten Endothelzellen erfolgte u.a. für MIP-3 $\alpha$  (CCL20), IL-8 (CXCL-8), MCP-1 (CCL2) und CD44, sowie für Protein tyrosine phosphatase (receptor type K), fms-related tyrosine kinase 4, BCL2-related protein A1, Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9 (Abb. 3.12).

Die Microarray-Analyse lieferte insgesamt 35 Kandidatengene, deren Transkription durch Kontakt der Endothelzellen mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrocyten hochreguliert wird.

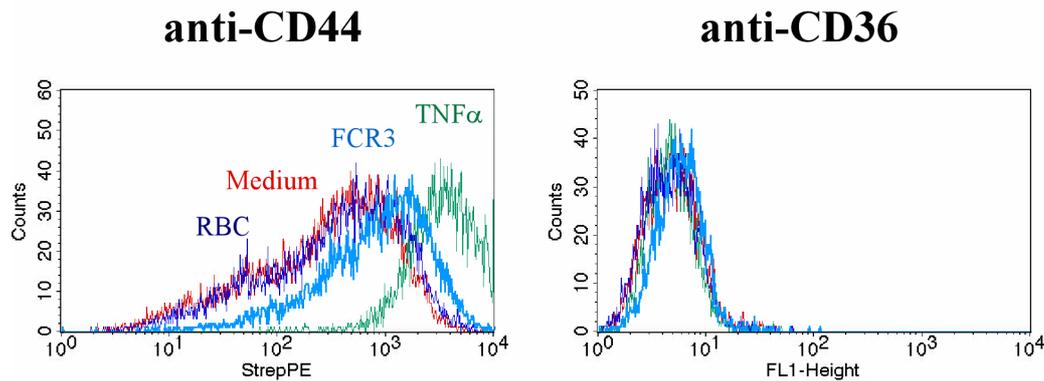


### Abb. 3.12: Ergebnisse der Microarray-Analyse

Dargestellt ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten als Maß für die relativen Veränderungen der Transkriptkonzentrationen. 35 Gene der HUVECs wiesen eine signifikant erhöhte Transkriptkonzentration nach Cokultivierung mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten auf, im Vergleich zur Erythrocytenkontrolle. Die Graphik zeigt die Mittelwerte der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten für die vier verschiedenen Ansätze ( $\pm$  Standardabweichung). Gene, deren Proteinexpression charakterisiert wurde sind in blau dargestellt.

### 3.1.9.2 Bestimmung der Expressionlevel von CD44 und CD36 auf aktivierten Endothelzellen

Da die Menge der mRNA nicht mit der Menge der exprimierten Proteine korrelieren muß, wurde für einige der identifizierten Kandidatengene auch die Expression der Proteine untersucht. Die Expression der Adhäsionsmoleküle CD44 und CD36 wurde bestimmt.



**Abb. 3.13: Expression von CD44 und CD36 auf PRBC-aktivierten HUVECs**

Die Endothelzellen wurden für 20 h mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten kokultiviert und die Zellen anschließend mit  $\alpha$ -CD44 bzw.  $\alpha$ -CD36 Antikörpern gefärbt und im Durchflusscytometer analysiert. Die Histogramme zeigen die Expression von CD44 und CD36 auf der Oberfläche der HUVECs. HUVECs exprimierten hohe Mengen CD44 auf der Zelloberfläche. Durch Stimulation der Endothelzellen mit TNF $\alpha$  konnte die CD44 Expression deutlich hochreguliert werden, aber auch die Kokultivierung der HUVECs mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten steigerte die CD44 Expression. Für die Expression von CD36 wurden keine Unterschiede sichtbar, die Zellen aller Ansätze waren negativ für CD36.

Die für diese Versuche verwendeten HUVECs exprimierten im nicht-aktivierten Zustand hohe Mengen an CD44 auf der Zelloberfläche (Abb. 3.13). Allerdings ließ sich die CD44 Expression durch Aktivierung der Endothelzellen mit TNF $\alpha$  signifikant steigern. Die Coinkubation der Endothelzellen mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten führte ebenfalls zu einer erhöhten CD44 Expression.

HUVECs exprimierten kein CD36 auf der Zelloberfläche. Auch Endothelzellen, die mit TNF $\alpha$  oder *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten aktiviert wurden, veränderten die CD36 Expression nicht.

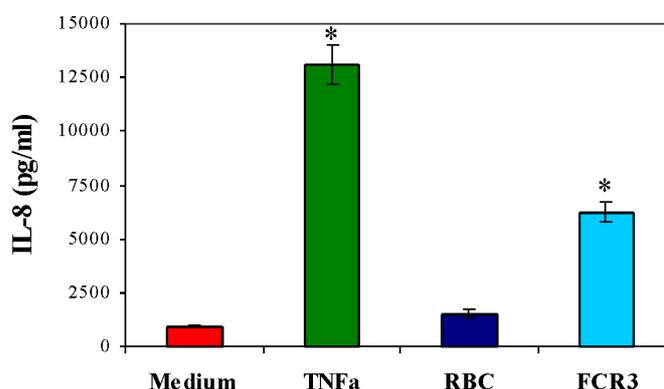
Während die Expression von CD44 durch Kontakt der Endothelzellen mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten gesteigert wird, bleiben die Zellen negativ für CD36.

### 3.1.9.3 Sekretion verschiedener Cytokine und Chemokine

Cytokine sind kleine Moleküle, die von verschiedenen Zellen als Antwort auf einen aktivierenden Stimulus freigesetzt werden. Durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor können sie auf autokrine oder parakrine Weise das Verhalten der Zellen beeinflussen (Janeway et al., 2001). Sie eignen sich gut als Marker für die Bestimmung des Aktivierungszustandes von Zellen.

#### 3.1.9.3.1 Interleukin 8 (IL-8)

IL-8 (CXCL8), ein Mitglied der neutrophil-spezifischen CXC-Unterfamilie der Chemokine, ist ein wichtiger Faktor für die chemotaktische Anlockung und Aktivierung von Neutrophilen. Es ist ein primäres inflammatorisches Cytokin, das von vielen Zellen u.a. auch von stimulierten Endothelzellen produziert wird (Modi et al., 1990).



**Abb. 3.14: *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten induzieren Sekretion von IL-8**

Die Menge des IL-8, das durch die aktivierten HUVECs in das Kulturmedium sezerniert wurde, wurde mittels IL-8 ELISA bestimmt. Überstände wurden 18-22 h nach Aktivierung der Endothelzellen untersucht. Zellen der Kontrollen Medium (rot) und nicht-infizierter Erythrocyten (dunkelblau) sezernierten nur geringe Mengen IL-8. Die IL-8 Sekretion in den Ansätzen TNF $\alpha$  (grün; \*,  $p < 0,001$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 9$ ) und FCR3 (hellblau; \*,  $p < 0,001$ , verglichen mit RBC,  $n = 9$ ) war signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der gemessenen IL-8 Konzentrationen (pg/ml) der einzelnen Versuche.

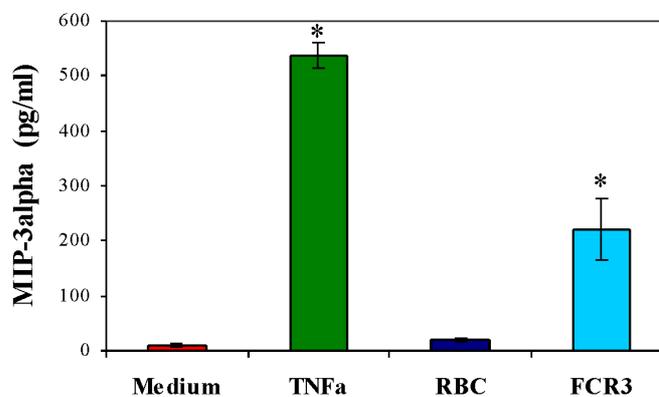
Zellen, der Negativkontrolle, die nur mit Medium inkubiert wurden, sezernierten nur sehr geringe Mengen IL-8, wie auch die Zellen der zweiten Negativkontrolle, die mit uninfizierten Erythrocyten kokultiviert wurden (Abb. 3.14). HUVECs, die mit TNF $\alpha$  stimuliert wurden, sezernierten signifikant mehr IL-8 als die Zellen der Mediumkontrolle ( $p < 0,001$ ,  $n = 9$ ). Im Vergleich zu der Erythrocytenkontrolle, war die IL-8-Sekretion durch die PRBC-aktivierten

HUVECs ebenfalls signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ,  $n = 9$ ). Die IL-8 Sekretion der TNF $\alpha$ -aktivierten HUVECs war deutlich höher als die der PRBC-aktivierten.

Endothelzellen, die durch *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten aktiviert werden, sezernieren IL-8.

### 3.1.9.3.2 Macrophage inflammatory protein 3 alpha (MIP-3 $\alpha$ )

MIP-3 $\alpha$  (CCL20) ist ein CC-Chemokin, das z.B. von aktivierten Endothelzellen produziert wird und selektive chemotaktische Eigenschaften für Lymphocyten und Dendritische Zellen besitzt (Hieshima et al., 1997; Hromas et al., 1997; Rossi et al., 1997).



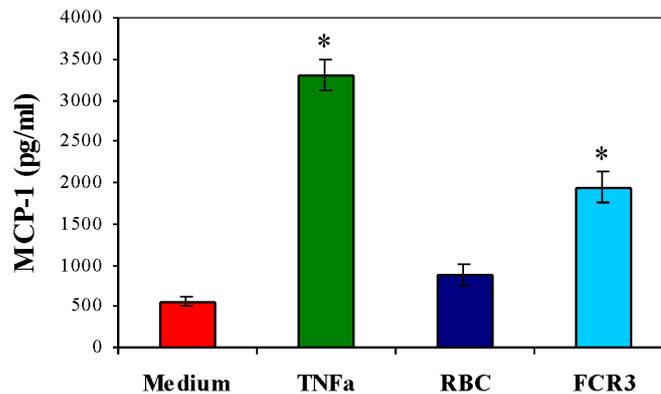
**Abb. 3.15: *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten induzieren Sekretion von MIP-3 $\alpha$**

Die Menge des in das Kulturmedium sezernierten MIP-3 $\alpha$  wurde mittels MIP-3 $\alpha$ -ELISA bestimmt. Überstände wurden 18-22 h nach Aktivierung der Endothelzellen untersucht. Zellen der Mediumkontrollen und Erythrocytenkontrollen sezernierten nur sehr geringe Mengen MIP-3 $\alpha$ , der Unterschied zwischen den Kontrollen war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 6$ ). Die MIP-3 $\alpha$  Sekretion in den Ansätzen TNF $\alpha$  (\*,  $p < 0,001$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 6$ ) und FCR3 (\*,  $p < 0,01$ , verglichen mit RBC,  $n = 6$ ) war signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der gemessenen MIP-3 $\alpha$  Konzentrationen (pg/ml) der einzelnen Versuche.

Zellen der beiden Negativkontrollen sezernierten nur sehr geringe Mengen MIP-3 $\alpha$ , der Unterschied war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 6$ ) (Abb. 3.15). TNF $\alpha$ -aktivierte Endothelzellen sezernierten signifikant höhere Mengen an MIP-3 $\alpha$  ( $p < 0,001$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 6$ ). Im Vergleich zu der Erythrocytenkontrolle, war die MIP-3 $\alpha$  Sekretion durch die PRBC-aktivierten HUVECs ebenfalls signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ). Dieses Experiment zeigt, daß nicht nur die Menge an MIP-3 $\alpha$  mRNA in den PRBC-aktivierten Endothelzellen erhöht ist, sondern auch eine verstärkte Sekretion von MIP-3 $\alpha$  stattfindet.

### 3.1.9.3.3 Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)

MCP-1 (CCL2) ist ein CC-Chemokin mit chemotaktischen Eigenschaften für Monocyten. Es wird von einer Vielzahl von Zellen nach Stimulation exprimiert, u.a. von Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinocyten (Mack et al., 2001).



#### Abb. 3.16: *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten induzieren Sekretion von MCP-1

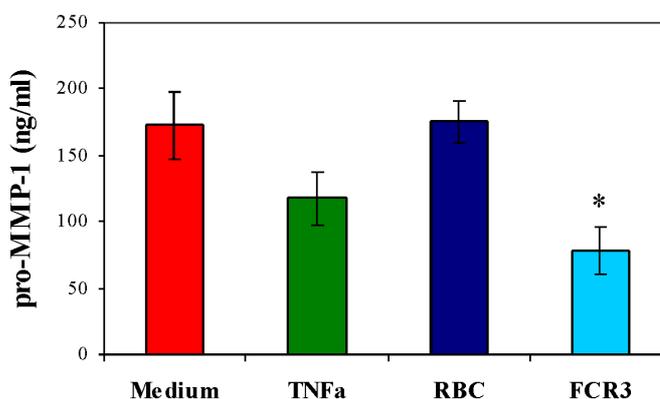
Die Menge des in das Kulturmedium sezernierten MCP-1 wurde mittels ELISA bestimmt. Überstände wurden 18-22 h nach Aktivierung der Endothelzellen untersucht. Zellen der Mediumkontrollen und Erythrocytenkontrollen sezernierten nur wenig MCP-1, der Unterschied zwischen den Kontrollen war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 5$ ). Die MCP-1 Sekretion in den Ansätzen TNF $\alpha$  (\*,  $p < 0,001$ , verglichen mit Mediumkontrolle,  $n = 5$ ) und FCR3 (\*,  $p < 0,01$ , verglichen mit RBC,  $n = 5$ ) war signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der gemessenen MCP-1 Konzentrationen (pg/ml) der einzelnen Versuche.

Bereits die nicht-aktivierten Endothelzellen sezernierten MCP-1. Endothelzellen, die mit nicht-infizierten Erythrocyten kokultiviert wurden, wiesen eine höhere MCP-1 Sekretion auf als die Mediumkontrolle (Abb. 3.16). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 5$ ). TNF $\alpha$ -aktivierte Endothelzellen sezernierten signifikant mehr MCP-1 als die Zellen der Mediumkontrolle ( $p < 0,001$ ,  $n = 5$ ). Auch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten waren in der Lage die Sekretion von MCP-1 durch die Endothelzellen im Vergleich zu den Erythrocytenkontrollen signifikant zu erhöhen ( $p < 0,01$ ,  $n = 5$ ).

Wie für die IL-8 und die MIP-3 $\alpha$  Sekretion gezeigt werden konnte, wird in den PRBC-aktivierten Endothelzellen sowohl die MCP-1 mRNA als auch die Menge an sezernierten MCP-1 Proteinen erhöht.

### 3.1.9.3.4 Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1)

Matrixmetalloproteinasen werden als Zymogene (pro-MMPs) durch aktivierte Zellen, u.a. Endothelzellen sezerniert und durch verschiedene Proteinasen aktiviert. Sie spielen eine wichtige Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen, z.B. bei der Wundheilung und bei Entzündungen und sind an der Degradation von Collagenfasern in der extrazellulären Matrix beteiligt (Pratta et al., 2003).



**Abb. 3.17: *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten erniedrigen die Menge an freiem pro-MMP-1**

Die Menge des in das Kulturmedium sezernierten pro-MMP-1 wurde mittels ELISA bestimmt. Überstände wurden 18 - 22 h nach Aktivierung der Endothelzellen untersucht. Zellen der Mediumkontrolle und der Erythrocytenkontrolle sezernierten große Mengen (ungefähr 175 ng pro-MMP-1/ml) in das Medium. Der Unterschied war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 5$ ). Die detektierte Menge an pro-MMP-1 im Medium der TNF $\alpha$ -aktivierten Endothelzellen war geringer, wenn auch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ,  $n = 5$ ). *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten konnten die pro-MMP-1 Konzentration signifikant erniedrigen (\*,  $p < 0,01$ , verglichen mit Erythrocytenkontrolle,  $n = 5$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der gemessenen pro-MMP-1 Konzentrationen (ng/ml) der einzelnen Versuche.

In diesem ELISA wird keine aktive MMP-1, sondern nur ungebundene pro-MMP-1 detektiert. Nicht-aktivierte Endothelzellen der Mediumkontrolle und der Erythrocytenkontrolle sezernierten große Mengen pro-MMP-1. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ansätzen festgestellt werden ( $p > 0,05$ ,  $n = 5$ ). Im Medienüberstand TNF $\alpha$ -aktivierter Endothelzellen wurde weniger sezernierte pro-MMP-1 detektiert als bei den Zellen der Mediumkontrolle ( $p > 0,05$ ,  $n = 5$ ). *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten waren in der Lage die Menge der pro-MMP-1 im Medienüberstand im Vergleich zur Erythrocytenkontrolle signifikant zu erniedrigen ( $p < 0,01$ ,  $n = 5$ ).

Aktivierung der Endothelzellen durch *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten erniedrigt die Konzentration an ungebundenem pro-MMP-1 im Medienüberstand.

## **3.2 Keine Interaktion des endocytotischen Rezeptors L-SIGN mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten und *P. berghei* Sporozoiten**

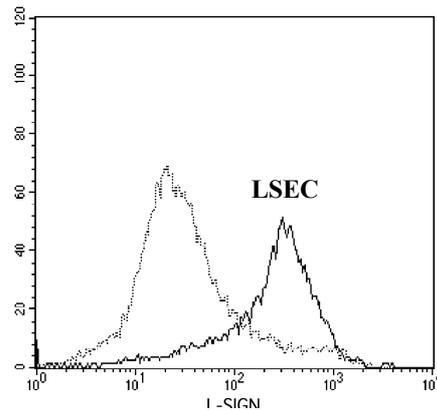
Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten findet in vielen verschiedenen Organen statt, u.a. im Gehirn, in der Placenta und in der Leber (Miller et al., 2002). Adhäsionsvermittelnde Moleküle konnten bisher nur in einigen Organen identifiziert werden, ein spezifischer Rezeptor auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber wurde noch nicht charakterisiert. Ein Molekül, das in der Leber konstitutiv exprimiert ist und diese Interaktion mit *Plasmodium*-infizierten Erythrocyten vermitteln könnte, ist das C-type Lektin L-SIGN (Liver/lymph node specific ICAM-3 grabbing nonintegrin).

### **3.2.1 Nachweis der L-SIGN-Expression auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber**

In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Mary Carrington, Frederick und Yvette van Kooyk, Amsterdam war es möglich die Lokalisation von L-SIGN auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) nachzuweisen. Mitarbeiter dieser Arbeitsgruppen konnten L-SIGN mRNA in humaner Leber sowie in Lymphknoten nachweisen (Bashirova et al., 2001).

Um die Zellen der Leber zu identifizieren, die L-SIGN exprimieren, wurden primäre humane LSECs isoliert. Im Gegensatz zu anderen in der Leber ansässigen Zellen, besitzen LSECs die Fähigkeit Ovalbumin zu binden und zu internalisieren (Knolle and Gerken, 2000). Wird fluorochrom-markiertes Ovalbumin verwendet, so lassen sie sich dadurch von anderen Zellen unterscheiden, z.B. bei Analysen im Durchfluscytometer oder Fluoreszenzmikroskop.

Färbung der Leberzellen mit polyklonalen  $\alpha$ -L-SIGN Antikörpern zeigte, daß L-SIGN ausschließlich auf den Zellen der Leber exprimiert war, die Ovalbumin aufgenommen hatten. Ovalbumin negative Zellen exprimierten kein L-SIGN (Abb. 3.18).



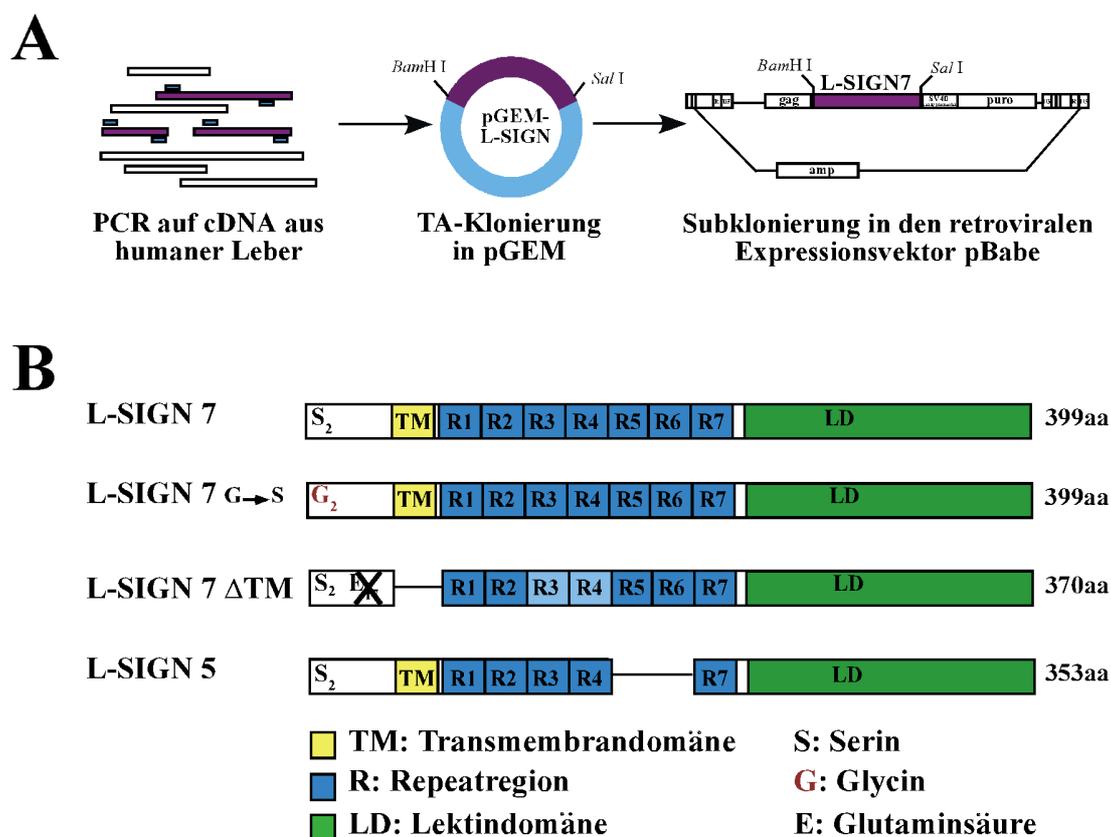
**Abb. 3.18: Nachweis der L-SIGN Expression auf LSEC**

Primäre humane Leberzellen wurden einen Tag nach der Isolierung mit fluorochrom-markiertem Ovalbumin für 2 h inkubiert. Die L-SIGN-Expression wurde durch Färbung mit polyklonalen  $\alpha$ -L-SIGN Antikörpern bestimmt. Die Expression von L-SIGN auf Zellen, die Ovalbumin aufgenommen haben (LSEC) (schwarze Linie) und Zellen, die kein Ovalbumin aufgenommen haben (Hepatocyten und andere in der Leber ansässige Zellen) (gestrichelte Linie) ist dargestellt. Es wurde auf Ovalbumin-positive bzw. negative Zellpopulationen gated.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß L-SIGN auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber exprimiert ist.

### **3.2.2 Klonierung von L-SIGN und Herstellung stabil exprimierender Transfektanten**

Um die mögliche Funktion von L-SIGN in der Pathogenese der Malaria zu untersuchen, wurde die cDNA von L-SIGN in einen retroviralen Expressionsvektor kloniert und auf der Oberfläche von CHO-K1 Zellen exprimiert.



**Abb. 3.19: Klonierung von L-SIGN**

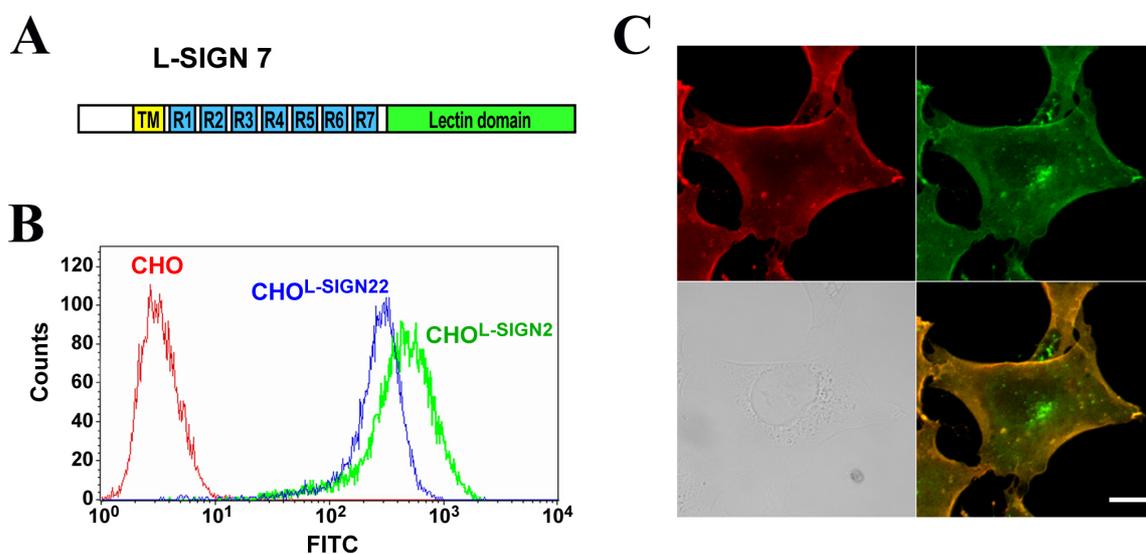
**A:** L-SIGN cDNA wurde mittels PCR aus einer cDNA-Bank aus humaner Leber amplifiziert und in den Vektor pGEM kloniert. Ein L-SIGN mit 7 Repeatregionen wurde anschließend mit *Bam*H I und *Sal* I in den retroviralen Vektor pBabe subkloniert.

**B:** Verschiedene L-SIGN cDNAs wurden durch Sequenzierung der pGEM-L-SIGN Vektoren identifiziert. Es wurden Isoformen von L-SIGN mit fünf und sieben Repeatregionen identifiziert, sowie ein lösliches L-SIGN, das keine Transmembrandomäne enthält.

L-SIGN cDNA wurde aus einer cDNA-Bank aus humaner Leber mittels PCR amplifiziert und für weitere Analysen zuerst in den TA-Klonierungsvektor pGEM kloniert (Abb. 3.19A). Durch Sequenzierung der Plasmide konnten verschieden Formen von L-SIGN identifiziert werden. Es konnten L-SIGNs mit fünf und sieben Repeatregionen nachgewiesen werden, sowie eine lösliche Form von L-SIGN, die keine Transmembrandomäne besaß (Abb. 3.19B). Für die weiteren Versuche wurde das L-SIGN mit sieben Repeatregionen (L-SIGN7) verwendet, da dieses Allel in der Bevölkerung am häufigsten vorkommt (Bashirova et al., 2001). L-SIGN7 wurde mit *Bam*H I und *Sal* I in den retroviralen Expressionsvektor pBabe subkloniert (Abb. 3.19A). Mittels retroviralem Gentransfer wurden CHO-K1 Zellen hergestellt, die L-SIGN stabil exprimieren. Diese Zellpopulation wurde mit dem  $\alpha$ -L-SIGN Antikörper 604 und mit  $\alpha$ -Maus Ig-FITC gefärbt und im DIVA FACSsorter auf L-SIGN-positive Zellen sortiert. Anschließend wurden die Zellen subkloniert und die Klone wie

beschrieben mit  $\alpha$ -L-SIGN Antikörpern gefärbt und im Durchflusscytometer analysiert. Klone mit unterschiedlicher L-SIGN Expression wurden für weitere Experimente ausgewählt. Der Klon CHO<sup>L-SIGN2</sup> exprimierte mehr L-SIGN auf der Zelloberfläche als CHO<sup>L-SIGN22</sup> (Abb. 3.20B).

Um die Lokalisation von L-SIGN in den Transfektanten zu bestimmen wurden eine Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. L-SIGN konnte in den CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen an der Zelloberfläche (rot) und im endosomalen Kompartiment (grün) der Zelle detektiert werden (Abb. 3.20C).



**Abb. 3.20: Herstellung stabil exprimierender Transfektanten**

**A:** L-SIGN7 besteht aus einer Lektindomäne, sieben Repeatregionen (R1-R7), einer Transmembranregion und einer N-terminalen cytoplasmatischen Domäne, die Internalisierungs- und Sortierungssignale enthält.

**B:** Stabil exprimierende CHO<sup>L-SIGN</sup> Transfektanten wurden mittels retroviralem Gentransfer hergestellt. Transduzierte Zellen wurden mit  $\alpha$ -L-SIGN Antikörpern gefärbt und sortiert (DIVA FACSorter, Becton Dickinson). Die Zellen wurden subloniert und die L-SIGN Expression der Klone im Durchflusscytometer bestimmt. Zellen des Klons CHO<sup>L-SIGN2</sup> exprimierten mehr L-SIGN als die des Klons CHO<sup>L-SIGN22</sup>. CHO Zellen dienten als Kontrolle.

**C:** L-SIGN wurde durch indirekte Immunfluoreszenz-Analyse sowohl an der Zelloberfläche (rot) als auch intrazellulär in endosomalen Kompartimenten nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit  $\alpha$ -SIGN-Antikörpern AZN-D2, sowie  $\alpha$ -Maus Alexa-546 und  $\alpha$ -Maus Alexa 488. Balken, 10  $\mu$ m

Diese Ergebnisse zeigen, daß verschiedene Formen von L-SIGN in der Leber exprimiert werden. Die Herstellung stabil exprimierender CHO<sup>L-SIGN</sup> Transfektanten mittels retroviralem Gentransfer lieferte Klone mit unterschiedlicher L-SIGN7 Expression. L-SIGN ist an der Zelloberfläche lokalisiert, sowie intrazellulär in Vesikeln des endosomalen Kompartiments.

### 3.2.3 Inhibition der L-SIGN spezifischen Bindung und Aufnahme von Dextran-FITC in CHO<sup>L-SIGN</sup> Zellen durch $\alpha$ -SIGN spezifische Antikörper und Mannan

Um die Funktion von L-SIGN auf den CHO<sup>L-SIGN</sup> Zellen bestimmen zu können wurden die Zellen mit fluorochrom-markiertem Substrat inkubiert und die Bindung, Aufnahme sowie die Lokalisierung des Substrats untersucht.

CHO Zellen wurden für 2 h mit Dextran-FITC inkubiert und die Fluoreszenz der Zellen anschließend mittels Durchflusszytometrie oder konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. Diese Experimente zeigten, daß die Bindung und Aufnahme von Liganden wie Dextran-FITC in die CHO Zellen abhängig von der Expression von L-SIGN auf der Zelloberfläche war. Zwar konnten CHO Zellen geringe Mengen an Dextran-FITC binden bzw. aufnehmen, die Aufnahme des Liganden in die CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen war jedoch signifikant höher. Zusätzlich konnte die L-SIGN spezifische Aufnahme des Substrats in die CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen durch Präinkubation der Zellen mit  $\alpha$ -SIGN Antikörpern (Abb. 3.21A) und Konkurrenz mit dem unmarkierten Liganden Mannan inhibiert werden (Abb. 3.21B+C). Diese Inhibitoren hatten keinen Effekt auf die Substrataufnahme in die CHO Kontrollzellen. Außerdem korreliert die Menge des Substrats, die durch Rezeptor-vermittelte Endocytose in die Zellen gelangte direkt mit dem Expressionslevel von L-SIGN auf der Zelloberfläche. CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen, die eine höhere L-SIGN Expression aufweisen als CHO<sup>L-SIGN22</sup> konnten auch mehr Dextran-FITC binden und aufnehmen (Abb. 3.21D). Analyse der subzellulären Lokalisation der internalisierten Liganden in CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie zeigte, daß die L-SIGN vermittelte Aufnahme zu einer Verteilung der Liganden in endosomale Kompartimente führte (Abb. 3.21E).

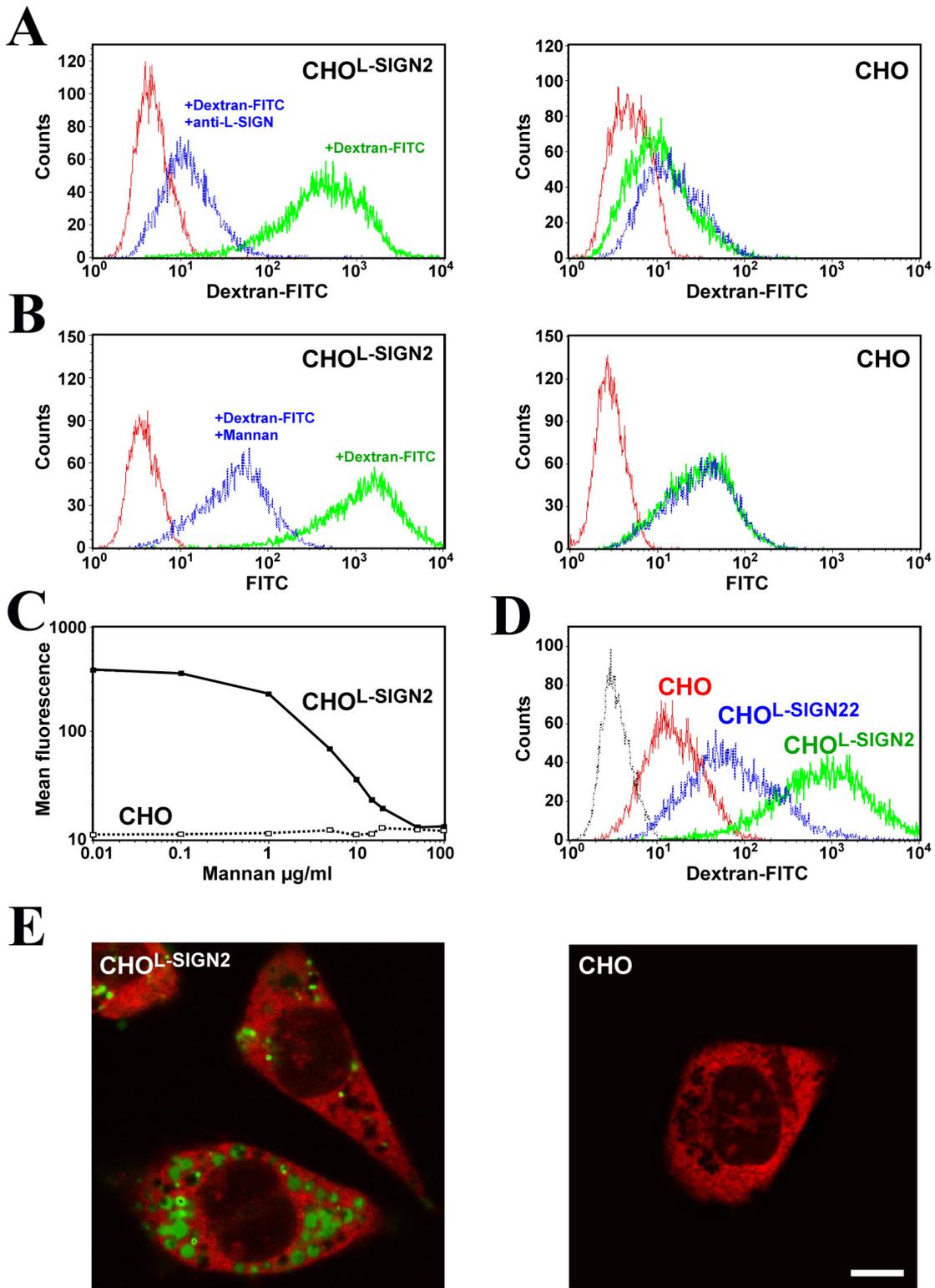


Abb. 3.21: Inhibition der L-SIGN spezifischen Bindung und Aufnahme von Dextran-FITC in CHO<sup>L-SIGN</sup> Zellen durch  $\alpha$ -SIGN spezifische Antikörper und Mannan

**Abb. 3.21: Inhibition der L-SIGN spezifischen Bindung und Aufnahme von Dextran-FITC in CHO<sup>L-SIGN</sup> Zellen durch  $\alpha$ -SIGN spezifische Antikörper und Mannan**

**A:** L-SIGN spezifische Bindung und Aufnahme von Dextran-FITC in CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen wurde in An- und Abwesenheit von  $\alpha$ -SIGN Antikörpern 612 (10  $\mu$ g/ml) analysiert. Zellen wurden für 1 h mit bzw. ohne Antikörper inkubiert, bevor Dextran-FITC (500 kDa, 100  $\mu$ g/ml) für 2 h zugeben wurde. CHO Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

**B:** Inkubation mit Mannan (100  $\mu$ g/ml) reduzierte die spezifische Aufnahme von Dextran-FITC in die CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen. CHO Kontrollzellen zeigten keinen Unterschied.

**C:** Die Inhibition der Dextran-FITC Aufnahme war abhängig von der Mannankonzentration. Je mehr Mannan zugegeben wurde, umso geringer war die Dextran-FITC Aufnahme. Die Aufnahme von Dextran-FITC in die CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen war umgekehrt proportional zu der eingesetzten Mannankonzentration.

**D:** Die Expression von L-SIGN auf der Zelloberfläche korrelierte direkt mit der Menge der aufgenommenen Liganden. CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen nahmen mehr Dextran-FITC auf als die Zellen des Klons CHO<sup>L-SIGN22</sup> und als die CHO Kontrollzellen.

**E:** Analyse der subzelluläre Lokalisation des internalisierten Dextran-FITC in den CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie zeigte das Substrat in endosomalen Kompartimenten (grün). Zellen erscheinen durch Autofluoreszenz rot. CHO Zellen dienten als Kontrolle. Balken, 10  $\mu$ m

Diese Daten zeigen, daß L-SIGN in der Lage ist Liganden zu binden und zu internalisieren und in endosomale Kompartimente zu transportieren.

### 3.2.4 Interaktion von L-SIGN mit Plasmodien

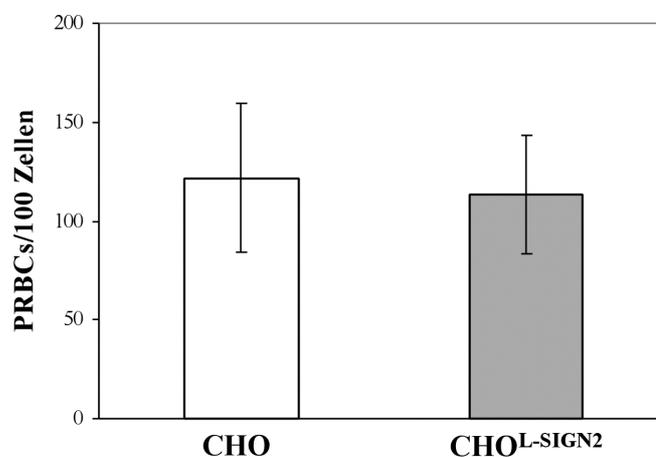
Voraussetzung für die Untersuchung der Interaktion von L-SIGN mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrocyten, sowie mit *Plasmodium berghei* Sporozoiten war die Herstellung der CHO<sup>L-SIGN</sup> Zelllinien, die funktionelles L-SIGN exprimieren.

#### 3.2.4.1 Interaktion von *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit L-SIGN

*Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten sind in der Lage in der Leber zu cytoadhären (Miller et al., 2002). Bisher ist noch kein spezifischer Rezeptor auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber identifiziert, der diese Interaktion vermitteln könnte. Ein Molekül, das konstitutiv auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber exprimiert ist, ist L-SIGN. Aufgrund seiner Struktur könnte eine initiale Interaktion von *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit L-SIGN die Endothelzellen stimulieren und die Hochregulierung anderer Adhäsionsmoleküle bewirken oder zu der Entstehung von Immuntoleranz in der Leber beitragen. Um eine mögliche Interaktion von *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit L-SIGN zu untersuchen, wurden Adhäsionsversuche durchgeführt.

Um eine Parasitenpopulation zu erhalten, die einen Bindungsphänotyp für einen bestimmten Rezeptor aufweist, müssen die Parasiten mehrfach selektioniert werden. Aus diesem Grund wurden Erythrocyten, die mit dem *P. falciparum* Klon FCR3 infiziert waren mittels Gelatine-

Sedimentation angereichert und mit CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen inkubiert. Die gebundenen *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten wurden zurück in Kultur genommen, vermehrt und erneut auf CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen selektioniert. Für diese Adhäsionsversuche wurden CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen mit Chondroitinase ABC (0,5 U/ml) behandelt, die Adhäsion fand in Anwesenheit von löslichem CSA (100 µg/ml) statt, um eine CSA-spezifische Adhäsion der infizierten Erythrocyten an CHO-Zellen zu verhindern. Cytoadhäsionsversuche wurden in RPMI 1640 Medium, pH 6,8 mit 10% FCS durchgeführt. Nach acht Selektionsrunden wurde die Parasitenpopulation FCR3<sup>L-SIGN</sup> auf ihre Bindungsspezifität für L-SIGN untersucht.



**Abb. 3.22: Bewertung der L-SIGN spezifischen Adhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten**

Nach mindestens acht Selektionsrunden der FCR3 Parasiten auf CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen, wurde die Bindungsspezifität der FCR3<sup>L-SIGN</sup>-infizierten Erythrocyten bestimmt. Um sicherzustellen, daß infizierte Erythrocyten nicht an den Adhäsionsrezeptor Chondroitin-4-sulfat binden, der auf CHO-Zellen exprimiert ist, wurden alle Cytoadhäsionsversuche auf Chondroitinase ABC behandelten Zellen und in Anwesenheit von löslichem CSA durchgeführt. Es wurde die Bindung der CHO<sup>L-SIGN2</sup> selektionierten Parasitenpopulation an CHO (heller Balken) und CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen (grauer Balken) bestimmt.

Mittelwerte gebundener infizierter Erythrocyten pro 100 Zellen (± SD) sind dargestellt.

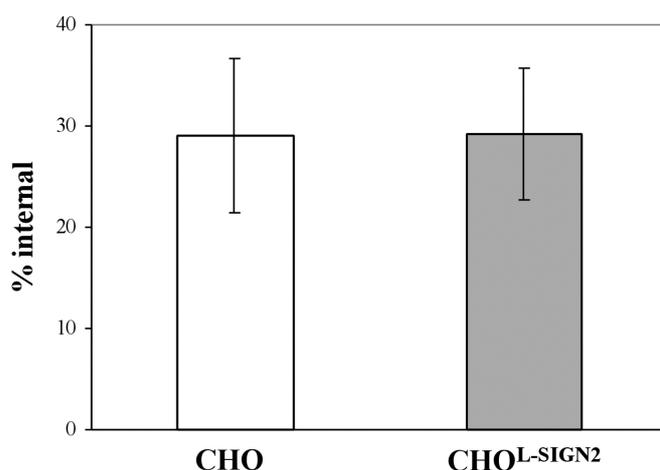
FCR3<sup>L-SIGN</sup> Parasiten zeigten keine gesteigerte Bindungsfähigkeit an CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen im Vergleich zu der Bindung an CHO Kontrollzellen (Abb. 3.22). Es konnte keine L-SIGN spezifische Adhäsion der *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß L-SIGN kein Adhäsionsrezeptor für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten ist.

### 3.2.4.2 Interaktion von *Plasmodium berghei* Sporozoiten mit L-SIGN

Da gezeigt wurde, daß L-SIGN die erste Interaktion von Wirtszellen mit einigen Pathogenen vermittelt (Bashirova et al., 2001; Gardner et al., 2003), wäre es möglich, daß L-SIGN eine Rolle in der Erkennung der Leber durch *Plasmodium* Sporozoiten spielt. Durch Interaktion mit L-SIGN könnten die Sporozoiten den Blutstrom in der Leber verlassen und zu den Hepatocyten gelangen.

Um zu untersuchen, ob L-SIGN eine Rolle bei der Bindung bzw. Invasion der Speicheldrüsen-Sporozoiten spielt, wurden Invasionsversuche durchgeführt. *P. berghei* Sporozoiten, die aus Speicheldrüsen der weiblichen *Anopheles*-Mücken isoliert wurden, wurden mit CHO Zellen oder CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen inkubiert. Das Verhältnis internalisierter Sporozoiten wurde durch unterscheidende Immunfluoreszenz-Analyse der extra- und intrazellulären Sporozoiten bestimmt.



**Abb. 3.23: Bewertung der L-SIGN spezifischen Invasion von *P. berghei* Sporozoiten**

*P. berghei* Sporozoiten, die aus Speicheldrüsen der weiblichen *Anopheles*-Mücken isoliert wurden, wurden für 90 min mit CHO Zellen (heller Balken) oder CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen (dunkler Balken) inkubiert. Das Verhältnis internalisierter Sporozoiten wurde durch unterscheidende Immunfluoreszenz-Analyse der extra- und intrazellulären Sporozoiten bestimmt. Es wurden zwei Experimente mit jeweils vier Ansätzen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der beiden Experimente ( $\pm$  SD).

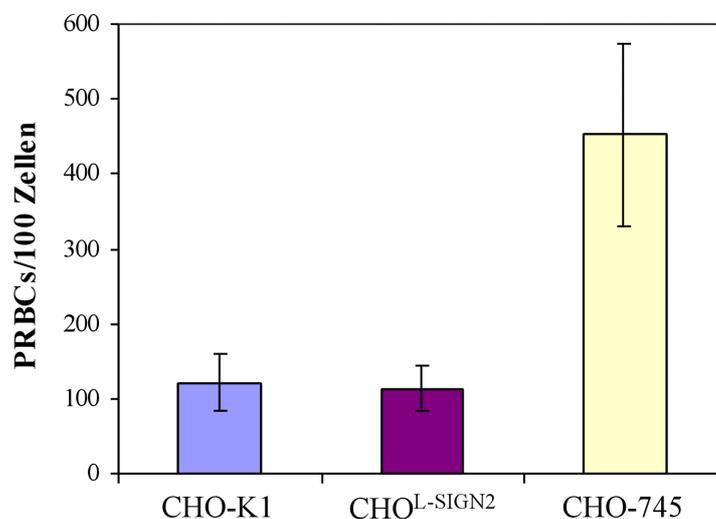
Inkubation der CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen mit Sporozoiten des Mausmalaria-Parasiten, *P. berghei* zeigte keine bevorzugte Bindung im Vergleich zu dem Kontrollexperiment, in dem die Bindung an CHO-K1 Zellen untersucht wurde. Es konnte auch kein Effekt auf die Invasion der Sporozoiten nachgewiesen werden (Abb. 3.23).

Es konnte nachgewiesen werden, daß humanes L-SIGN keine Rolle in der Bindung und Invasion von *P. berghei* Sporozoiten spielt.

### 3.3 Charakterisierung der Interaktion von *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit CHO-745 Zellen

#### 3.3.1 Charakterisierung der Interaktion von FCR3<sup>L-SIGN</sup> mit CHO-745 Zellen

*Plasmodium falciparum*-Parasiten, die auf CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen in Abwesenheit von CSA selektioniert wurden, zeigten keine spezifische Bindung an L-SIGN. Um den Phänotyp der selektionierten Parasiten zu überprüfen, wurde ihre Bindungsfähigkeit an CHO-K1, CHO<sup>L-SIGN2</sup> und CHO-745 Zellen untersucht. CHO-745 Zellen sind Mutanten, die keine aktive Xylosyl-Transferase exprimieren und deshalb im Gegensatz zu den Wildtypzellen CHO-K1 keine bzw. kaum Proteoglycane synthetisieren (Esko et al., 1987). CHO-745 Zellen exprimieren z.B. kein Chondroitin-4-sulfat und kein Heparansulfat auf der Zelloberfläche (Franco et al., 2001).



**Abb. 3.24: Adhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an CHO-745 Zellen**

Nach mindestens acht Selektionsrunden der FCR3 Parasiten auf CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen, wurde die Bindungsspezifität der FCR3<sup>L-SIGN</sup>-infizierten Erythrocyten bestimmt. Um sicherzustellen, daß infizierte Erythrocyten nicht an CSA binden, wurden die Cytoadhäsionsversuche auf Chondroitinase ABC behandelten Zellen und in Anwesenheit des löslichen, kompetitiven Inhibitors CSA durchgeführt. Es wurde die Bindung der CHO<sup>L-SIGN2</sup> selektionierten Parasitenpopulation an CHO-K1 (blauer Balken), CHO<sup>L-SIGN2</sup> (roter Balken) und CHO-745 Zellen (gelber Balken) bestimmt. Mittelwerte gebundener infizierter Erythrocyten pro 100 Zellen ( $\pm$  SD) sind dargestellt.

Wie bereits gezeigt wurde, konnte kein Unterschied in der Bindung der FCR3<sup>L-SIGN</sup>-infizierten Erythrocyten an die CHO-K1 und an die CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen festgestellt werden. FCR3<sup>L-SIGN</sup>-

Trophozoiten zeigten jedoch eine gute Bindung an CHO-745 Zellen. Ungefähr viermal mehr infizierte Erythrocyten konnten an die CHO-745 Zellen binden im Vergleich zu den Wildtyp CHO-K1 Zellen und den CHO<sup>L-SIGN2</sup> Transfektanten (Abb. 3.24). Ähnliche Beobachtungen wurden auch unter anderen Versuchsbedingungen gemacht (K. Andrews, persönliche Mitteilung).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß sowohl auf CHO-K1 als auch verstärkt auf CHO-745 Zellen ein bisher uncharakterisierter Rezeptor exprimiert ist, der die Cytoadhäsion *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrocyten vermitteln kann.

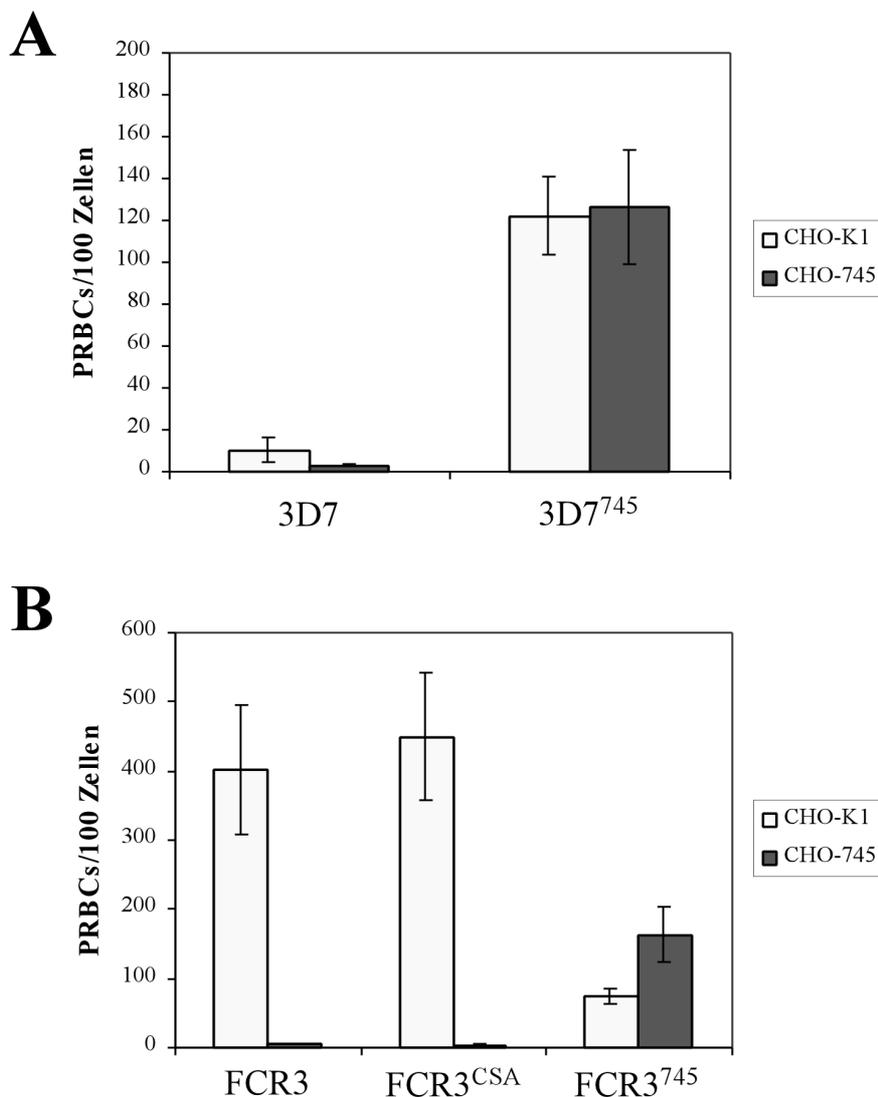
### 3.3.2 Selektion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten auf CHO-745 Zellen

Um die Interaktion *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrocyten mit CHO-745 Zellen charakterisieren zu können, wurden Parasiten der Klone FCR3 und 3D7 im Trophozoitenstadium mehrfach auf CHO-745 Zellen selektioniert. Infizierte Erythrocyten wurden mit CHO-745 Zellen inkubiert, die ungebundenen infizierten Erythrocyten durch Waschen entfernt und die gebundenen *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten zurück in Kultur genommen. Nach mindestens sechs Selektionsrunden unter den gleichen Bedingungen, wurde der Bindungsphänotyp der infizierten Erythrocyten der selektionierten und der unselektionierten Parasitenpopulation bestimmt. Diese selektionierten Parasitenpopulationen wurden als FCR3<sup>745</sup> und 3D7<sup>745</sup> bezeichnet. Als Kontrolle wurden parasitierte Erythrocyten des Klons FCR3<sup>CSA</sup> verwendet, die auf CHO-K1 Zellen selektioniert wurden und einen CSA-spezifischen Bindungsphänotyp aufweisen.

Erythrocyten, die mit Trophozoiten des *Plasmodium falciparum*-Klons 3D7 infiziert waren, konnten vor der Selektion kaum an CHO-745 und CHO-K1 Zellen adhäreren. Erst nach der Selektion auf CHO-745 Zellen konnten die Parasiten der klonalen Linie 3D7<sup>745</sup> sowohl an CHO-745 als auch an CHO-K1 adhäreren. Die Cytoadhäsion 3D7<sup>745</sup>-infizierter Erythrocyten an Zellen der beiden verschiedenen Linien wies keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 3.25A).

Trophozoiten des unselektionierten Klons FCR3 besitzen einen gemischten Bindungsphänotyp, d.h. sie besitzen die Fähigkeit sowohl CSA-spezifisch als auch CD36-spezifisch an Zellen zu adhäreren (Andrews et al., 2003a). Die Adhäsion der FCR3-infizierten Erythrocyten an CHO-K1 Zellen ist CSA-spezifisch. Wurden diese FCR3 Parasiten auf CHO-K1 Zellen selektioniert, so konnte die Bindung der Parasitenpopulation FCR3<sup>CSA</sup> an

CHO-K1 Zellen nur geringfügig gesteigert werden. Wie auch FCR3 besitzen Plasmodien der klonalen Linie FCR3<sup>CSA</sup> nicht die Fähigkeit an CHO-745 Zellen zu adhären (Abb. 3.25B).



**Abb. 3.25: Vergleich der Adhäsionseigenschaften unselektionierter und selektionierter *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an CHO Zellen**

Die Bindungsspezifität der *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten im Trophozystenstadium wurde vor und nach Selektion der Parasitenpopulation auf CHO-745 Zellen bestimmt.

**A:** Dargestellt sind folgende Parasitenpopulationen: unselektionierte 3D7 und 3D7<sup>745</sup>, die auf CHO-745 Zellen selektioniert wurden.

**B:** Dargestellt sind die Parasitenpopulationen: unselektionierte FCR3, FCR3<sup>CSA</sup>, die auf einen CSA-bindenden Phänotyp selektioniert wurden, sowie FCR3<sup>745</sup>, die auf CHO-745 Zellen selektioniert wurden.

Die Anzahl der gebundenen infizierten Erythrocyten wurde für CHO-K1 (helle Balken) und für CHO-745 Zellen (dunkle Balken) bestimmt. Mittelwerte gebundener infizierter Erythrocyten pro 100 Zellen ( $\pm$  SD) für drei unabhängige Experimente mit jeweils drei bis vier Ansätzen sind dargestellt.

Durch Selektion der FCR3 Parasiten auf CHO-745 Zellen konnte auf Parasiten mit einem neuen Bindungsphänotyp selektioniert werden. *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten der klonalen Linie FCR3<sup>745</sup> konnten sowohl an CHO-K1 als auch an CHO-745 Zellen binden. Die

Cytoadhäsion an CHO-745 Zellen war jedoch deutlich besser als die Adhäsion an CHO-K1 Zellen. Im Vergleich zu den unselektionierten FCR3 war die Adhäsion an CHO-745 Zellen signifikant erhöht, die Adhäsion an CHO-K1 Zellen jedoch deutlich erniedrigt (Abb. 3.25B). Erythrocyten, die mit *P. falciparum*-Trophozoiten der Klone 3D7 und FCR3 infiziert sind, lassen sich auf CHO-745 Zellen selektionieren und können nach der Selektion sowohl an CHO-745 als auch an CHO-K1 Zellen cytoadhärieren.

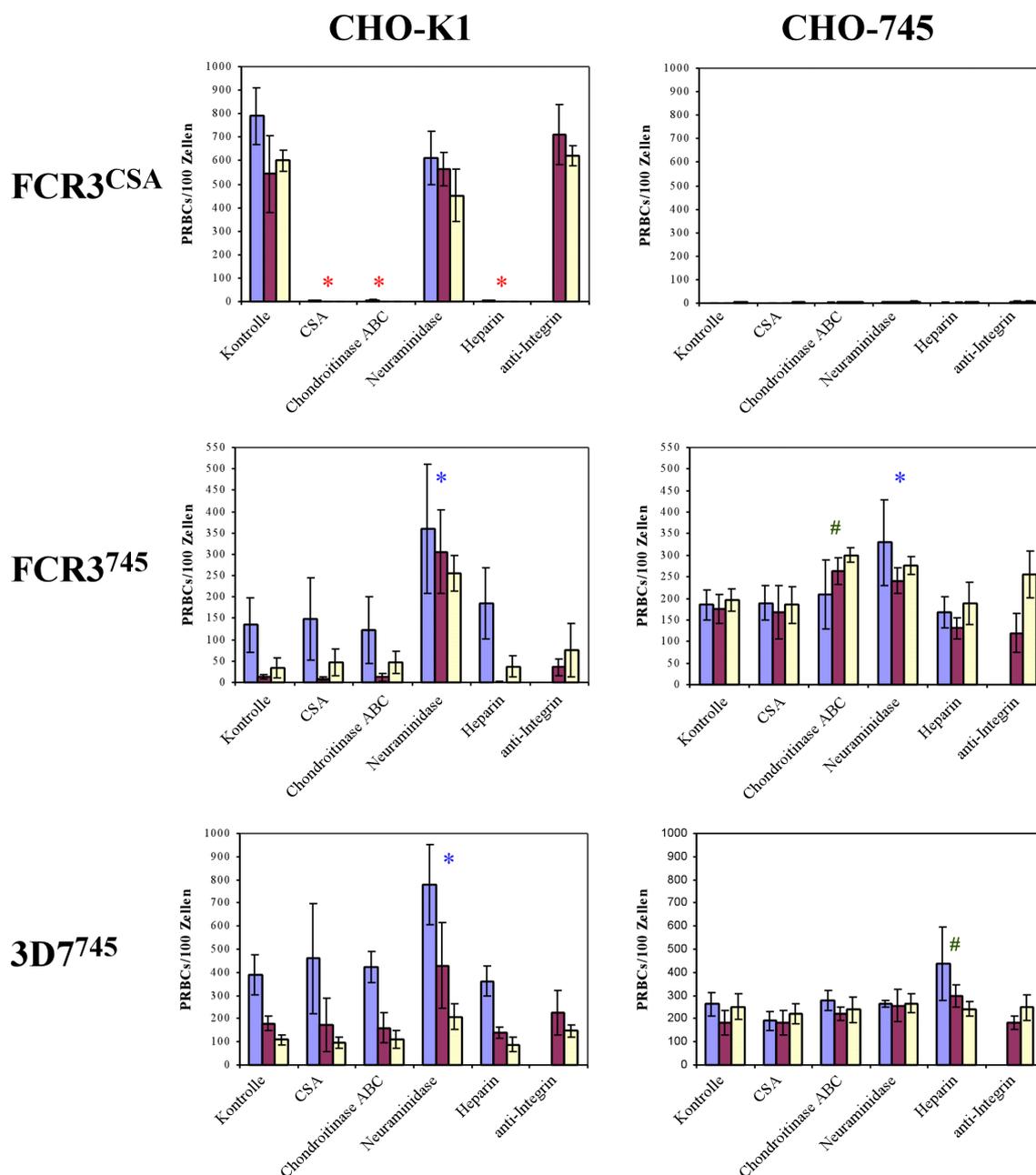
### 3.3.3 Charakterisierung der Adhäsionseigenschaften von FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten

Um die Adhäsionseigenschaften der Parasitenklone FCR3<sup>745</sup> und 3D7<sup>745</sup> näher charakterisieren zu können, wurden verschiedene lösliche Substanzen, Enzyme und Antikörper auf ihre Fähigkeit getestet, die Interaktion von FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten mit CHO Zellen zu inhibieren.

*P. falciparum*-infizierte Erythrocyten wurden mittels Gelatine-Sedimentation angereichert und entweder direkt zu den CHO-Zellen gegeben oder mit den löslichen Inhibitoren CSA (100 µg/ml) bzw. Heparin (100 µg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie zu den Zellen gegeben wurden. Die CHO Zellen wurden vor dem Adhäsionsversuch mit 0,5 U/ml Chondroitinase ABC, 13,5 U/ml Neuraminidase oder 20 µg/ml  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin Antikörpern für 30 min in serumfreiem Medium bei 37°C inkubiert. Chondroitinase ABC entfernt Chondroitinsulfate von der Zelloberfläche. Neuraminidase entfernt enzymatisch die Sialinsäure-Reste (Cassidy et al., 1965). Der Effekt von  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin Antikörpern auf die Cytoadhäsion der FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten an CHO Zellen wurde untersucht, da CHO Zellen dieses Heterodimer exprimieren (ohne Abbildung). Der Adhäsionsrezeptor  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist auf CHO Zellen nicht exprimiert (ohne Abbildung).

Die Adhäsionseigenschaften der Erythrocyten, die mit Plasmodien der Stämme FCR3<sup>CSA</sup>, FCR3<sup>745</sup> und 3D7<sup>745</sup> infiziert waren, wurden auf CHO-K1 und auf CHO-745 Zellen in An- und Abwesenheit der verschiedenen Inhibitoren bestimmt. Der Einfluß der inhibitorischen Substanzen wurde statistisch ermittelt.

Bestimmung der Adhäsion FCR3<sup>CSA</sup>-infizierter Erythrocyten diente als Kontrolle für die Versuche. In Anwesenheit von löslichem CSA sowie von Heparin und nach Behandlung der CHO-K1 Zellen mit Chondroitinase ABC konnte keine Adhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an CHO-K1 Zellen festgestellt werden (Abb. 3.26).



**Abb. 3.26: Vergleich der Adhäsionseigenschaften in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren**

Getestet wurden die inhibitorischen Eigenschaften der löslichen Faktoren CSA und Heparin, der Enzyme Chondroitinase ABC und Neuraminidase sowie des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin Antikörpers (P1F6.20 EMD 122752) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Die Adhäsionseigenschaften der Erythrocyten, die mit Plasmodien der Stämme FCR3<sup>CSA</sup>, FCR3<sup>745</sup> und 3D7<sup>745</sup> infiziert waren, wurden auf CHO-K1 und auf CHO-745 Zellen bestimmt.

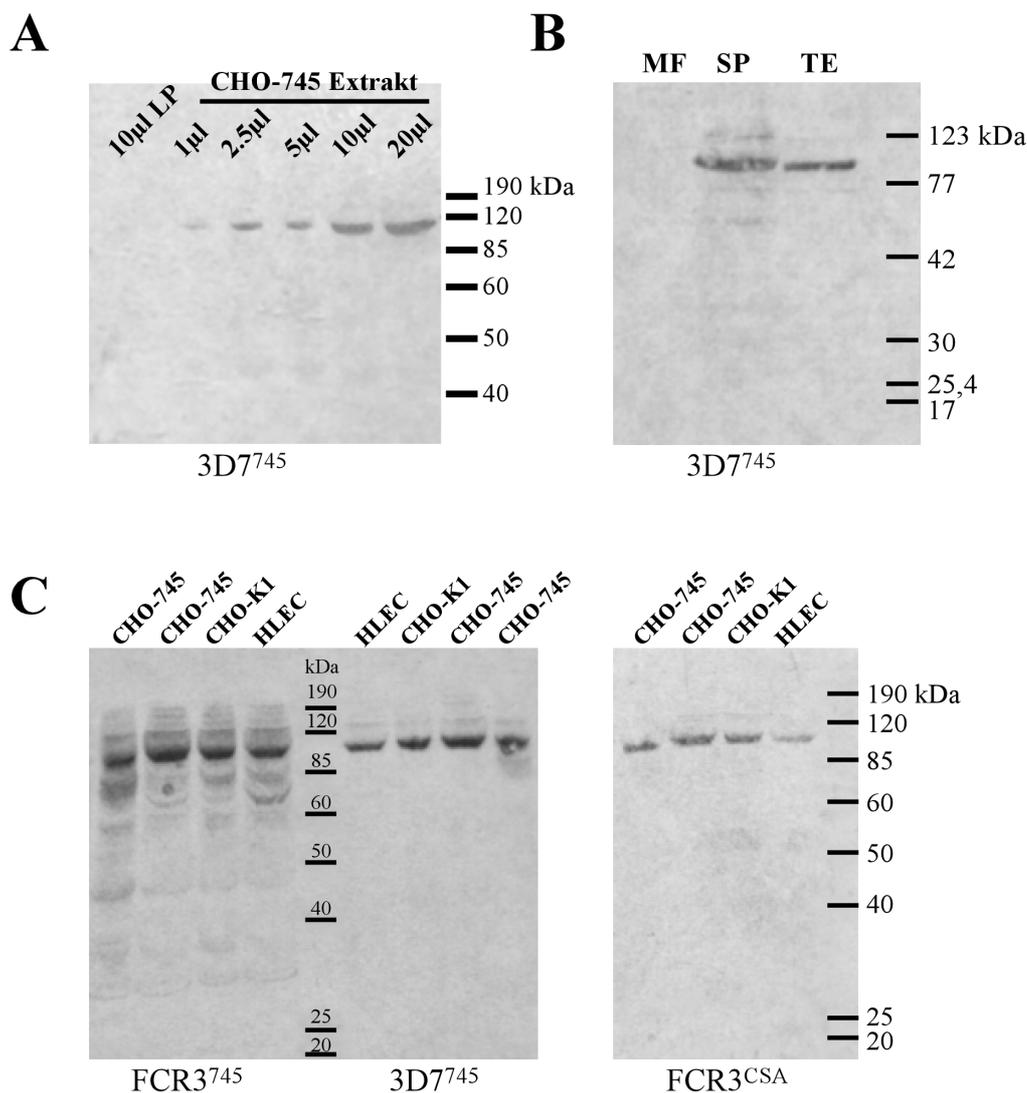
Dargestellt sind die Mittelwerte gebundener infizierter Erythrocyten pro 100 Zellen ( $\pm$  SD) für die drei unabhängigen Experimente. Die Anzahl der gebundenen infizierten Erythrocyten wurde jeweils in vier Gesichtsfeldern im Lichtmikroskop bei  $\sim$ 32x Vergrößerung bestimmt: Experiment 1 (blaue Balken), Experiment 2 (rote Balken), Experiment 3 (gelbe Balken). Inhibitoren, die die Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle signifikant ( $p < 0,001$ ) erniedrigen konnten, sind mit \* gekennzeichnet. Substanzen, die die Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhten sind mit \* ( $p < 0,001$ ) oder mit # ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

Diese drei Substanzen konnten die Adhäsion der infizierten Erythrocyten im Vergleich zur Kontrolle signifikant inhibieren ( $p < 0,001$ ). Neuraminidase-Behandlung und Inkubation der Zellen mit  $\alpha$ -Integrin-Antikörpern hatten keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften FCR3<sup>CSA</sup>-infizierter Erythrocyten.

Die Adhäsion FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten sowohl an CHO-K1 als auch an CHO-745 Zellen konnte durch keine der getesteten Substanzen inhibiert werden. Interessanterweise führte die Behandlung der CHO Zellen mit Neuraminidase zu einer signifikant verstärkten Adhäsion FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierter Erythrocyten ( $p < 0,001$ ). Auch die Cytoadhäsion FCR3<sup>745</sup>-infizierter Erythrocyten an die CHO-745 Zellen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC, war signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ). Inkubation der 3D7<sup>745</sup>-infizierter Erythrocyten in Anwesenheit von Heparin verstärkte die Adhäsion an CHO-745 Zellen (<sup>#</sup>,  $p < 0,01$ ). In allen anderen Ansätzen konnte keine Inhibition der Adhäsion FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierter Erythrocyten an CHO-K1 und CHO-745 Zellen festgestellt werden. Auffällig ist auch, daß die Bindung der FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten an CHO-K1 Zellen in den unterschiedlichen Experimenten stark variierte, während die Bindung an CHO-745 Zellen in allen Experimenten sehr vergleichbar war. Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß keine der getesteten Substanzen einen inhibitorischen Effekt auf die Cytoadhäsion FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierter Erythrocyten an CHO-Zellen hatte, die Adhäsion auf Neuraminidase-behandelten Zellen sogar verstärkt wurde.

### **3.3.4 Zell-Overlay - eine Methode zur Charakterisierung des Adhäsionsrezeptors auf CHO-745 Zellen?**

CHO-K1 und CHO-745 Zellen besitzen mindestens einen bisher uncharakterisierten Adhäsionsrezeptor für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten. Zur Charakterisierung der Interaktionen von Pathogenen mit Wirtszellrezeptoren werden Wirtszellproteine elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit intakten Zellen detektiert. Diese Methode wird als Zell-Overlay oder Cell-Blotting bezeichnet (Seshi, 1994) (O'Sullivan et al., 1997). Um die Interaktion von CHO-745 Zellen mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten durch Cell-Blotting untersuchen zu können, wurden radioaktiv-markierte Trophozoiten mit den Membranen inkubiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.



**Abb. 3.27: *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten detektieren ein 100 kDa-Protein im Zell-Overlay**

Proteine verschiedener Zelllinien wurden im Zell-Overlay mit FCR3<sup>CSA</sup>-, FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten nachgewiesen.

**A:** CHO-745 Zellen wurden mit Lysepuffer lysiert und unterschiedliche Mengen des Extrakts elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit radioaktiv-markierten 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten detektiert. LP: Lysepuffer

**B:** CHO-745 Zellen wurden fraktioniert, um Membranproteine (MF) von löslichen Proteinen (SP) zu isolieren. Proteine dieser Fraktionen wurden vor der elektrophoretischen Trennung konzentriert. Als Kontrolle diente CHO-745 Extrakt (TE). Die Detektion erfolgte mit radioaktiv-markierten 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten.

**C:** Proteinextrakte verschiedener Zelllinien (CHO-745, CHO-K1, HLEC) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit FCR3<sup>CSA</sup>-, FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten detektiert.

Mit dem *Plasmodium falciparum* Klon 3D7<sup>745</sup> infizierten Erythrocyten binden im Zell-Overlay an ein ungefähr 100 kDa großes Protein des CHO-745 Extrakts. Je mehr Proteinextrakt eingesetzt wurde, um so mehr 3D7<sup>745</sup>-infizierte Erythrocyten konnten an die Proteinbande binden (Abb. 3.27A).

Da das gesuchte Adhäsionsmolekül auf CHO-745 Zellen eventuell ein integrales Membranprotein ist, wurden Plasmamembranen und Membranproteine der CHO-Zellen isoliert. Im Vergleich wurden Proteine analysiert, die sich nach Sonifikation und Ultrazentrifugation im Überstand befanden. Diese löslichen Proteine können z.B. cytoplasmatische Proteine oder periphere Membranproteine sein. Da die Proteine dieser beiden Fraktionen zu verdünnt waren, wurden sie nach der Methode von Wessel und Flügge (Wessel and Flugge, 1984) konzentriert, bevor sie mittels SDS-PAGE getrennt wurden. Im Zell-Overlay konnten 3D7<sup>745</sup>-infizierte Erythrocyten nur Proteine im CHO-745 Gesamtextrakt, sowie in der Fraktion mit löslichen Proteinen detektieren, nicht jedoch in der Fraktion, die die Membranproteine enthält (Abb. 3.27B).

Um zu untersuchen, ob dieses 100 kDa Protein nur in CHO-745 Zellen vorhanden ist und ob nur infizierte Erythrocyten mit Bindungsspezifität für CHO-745 Zellen an dieses Protein adhären können, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Es wurden Proteinextrakte von CHO-745, CHO-K1 und HLEC (Human lung endothelial cells) hergestellt und jeweils 12 µg der Proteinextrakte pro Spur auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Zell-Overlay mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten unterschiedlicher Stämme detektiert. Infizierte Erythrocyten der Stämme FCR3<sup>CSA</sup>, FCR3<sup>745</sup> und 3D7<sup>745</sup> konnten an das 100 kDa Protein binden. Das Protein war in Proteinextrakten aller Zelllinien zu finden (Abb. 3.27C).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß FCR3<sup>CSA</sup>-, FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierte Erythrocyten im Zell-Overlay an ein lösliches 100 kDa Protein adhären, das in CHO-K1, CHO-745 und HLEC Zellen zu finden ist.

### **3.3.5 Charakterisierung der transkribierten *var* Gene in den Parasitenpopulationen 3D7<sup>745</sup> und FCR3<sup>745</sup>**

#### **3.3.5.1 RT-PCR-Analyse der transkribierten DBL1 $\alpha$ -Domänen**

Um die *var* Gene zu charakterisieren, die in 3D7<sup>745</sup> und FCR3<sup>745</sup> exprimiert wurden, wurden infizierte Erythrocyten im Trophozoitenstadium durch magnetische Separation isoliert. Aus diesen Trophozoiten wurde RNA isoliert und mittels RT-PCR amplifiziert. Durch Verwendung universeller *var* Gen Primer ( $\alpha$ AF/ $\alpha$ BR) (Taylor et al., 2000), die an konservierte Motive innerhalb der polymorphen DBL1 $\alpha$ -Domäne binden, konnten RT-PCR-Produkte amplifiziert werden. Kontrollreaktionen in Abwesenheit von reverser Transkriptase

lieferten keine PCR-Produkte, was darauf schließen lässt, daß die RNA-Präparationen keine kontaminierende DNA enthielten. TA-Klonierung der RT-PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 und anschließende Sequenzierung lieferten Ergebnisse über die transkribierten *var* Gene.

### 3.3.5.1.1 Charakterisierung der DBL1 $\alpha$ -Domänen von 3D7<sup>745</sup>

```

tag A      GCACGAAGTTTTGCAGATATAGGTGATATCGTTAGAGGAAGAGATCTATATAGAGGTAAT
tag B      GCACGAAGTTTTGCAGACATAGGTGATATTATAAGAGGAAGAGATCTATACAGTGGTAAT
tag C      GCACGAAGTTTTGCAGATATAGGTGATATTGTAAGAGGAAAAGATCTTTTCCTTGGTGCT
tag D      GCACGAAGTTTTGCAGATATAGGTGATATTGTCAGAGGAAAAGATCTTTTCCTTGGTCAT
          ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *

tag A      AAGAAAGAAAACAAACAAAGAGAAAAATTAGAAGAAAATTTGAGAAAAATTTTCGAGAAT
tag B      AAGGTGAAAAA-----AAAAAATTAGATGATAGTTTGAAAACAATTTTCGGGAAA
tag C      CCTAATAAAGAGAA-----AATAAAATTAGAAGAAAATCTGAAAAAATATTTGATAA-
tag D      AATCAAAGAAA-----AAAAAATTAGAAGAAAGATTAGAACAATGTTTAAGAA-
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

tag A      ATATATGAAGGATTGTCGAACAATGGTGTAAGGCTCGCTACGAAGGTGATAAAGAAAAAT
tag B      ATATATGAAGGATTGACAGG---TGGTGTAAAAGAACGCTACACAAATGACGGTGGAGAT
tag C      ---CATTAAGAATGAAAATGCA-GAACTTAGTAAATTATCACTT-----GAAAA-
tag D      ---CATTACGCATAGTAATG---CGGC-TAACTAAGTGTACTTTCA---AGCAAAGA-
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

tag A      TTTTATCAATTACGAGAAGATTGGTGGGCTCTTAATAGAGACCAAGTATGGAAAGCATTA
tag B      TTCTTTCAATTACGAGAAGATTGGTGGACTGCGAATCGAGAAACAGTATGGAAAGCCATG
tag C      -----AGTTA-GGGAATATTGGTGGGCAATTCATAGAAAAGAGCTATGGGAAGCATTA
tag D      -----AATTA-GGGAATATTGGTGGGCTCTTAATAGAGACCAAGTATGGAAAGCACTA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

tag A      ACATGTAGCGACGAC-----CTAAAAGATGCTTCATATTTTCGACCAACGTGCAGTGAT
tag B      ACATGTAGCGAGCAC-----CTAAAAAATTCTGCATATTTTCGTGTAACATGCAGTGA-
tag C      ACATGCAATGCA-----CCAAAAGGTGCTAATTATTT-----GTATA-----
tag D      ACATGTGACGAAGAGAACAAAGCTAGGGGTAATGCATATTTTCATGCAACGTGCAGTGAA
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

tag A      CGTAAAGGAAGTTGTTCTCAAAGCTAAGGATAACTGCCGGT-----GTGACGGC
tag B      --TAAACAAGGTGAATCTATAGCTAATCACAATGTCGATGTCATGCAAGTGCAGTGGC
tag C      --TAAATTAGATGGACCTAAATTTCTAGTGA---TAGGT-----GTGGACAT
tag D      CGTAATGGAGGTTGTTCTCAAGCTCATGAAAATGCAGGTGTCCCATGACAAGTGCAGTGGC
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

tag A      TCAAATACCGACCAGGTCCCCACATATTTGACTATGTGCCACAGTTTCTTCGCTGGTTC
tag B      AAGCCCAACGACCAAGTCCCCACATATTTGACTATGTGCCGAGTATCTTCGGTGGTTC
tag C      AATTATAACGGTGATCCTCTTACGAATTTAGATTATGTTCTCAATATTTACGTTGGTTC
tag D      AAGCCCAATGACCAAGTCCCCACGTAATTTGACTACGTGCCGAGTATCTTCGCTGGTTC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

tag A      GAGGAATGGGC
tag B      GASGAATGGGC
tag C      GACGAATGGGC
tag D      GAGGAATGGGC
          ** * * * * *

```

**Abb. 3.28: Alignment der mittels RT-PCR und Sequenzierung identifizierten Sequenzen der DBL1 $\alpha$ -Domänen von 3D7<sup>745</sup>**

RT-PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert und mit dem Primer M13 Reverse sequenziert. Das Alignment wurde mit Hilfe von <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/> und <http://clustalw.genome.ad.jp/> hergestellt. Für 3D7<sup>745</sup> konnten vier verschiedene DBL1 $\alpha$ -Domänen identifiziert werden, die mit tag A-D bezeichnet wurden. In rot sind die Primer markiert, die für die Herstellung der Sonden für die Northern Blot-Analyse verwendet wurden.

Für die Parasitenpopulation 3D7<sup>745</sup> konnten vier verschiedene DBL1 $\alpha$ -Domänen identifiziert werden. Sie wurden mit tag A, tag B, tag C und tag D bezeichnet. Ein Vergleich der Sequenzen zeigt, daß in den verschiedenen DBL1 $\alpha$ -Domänen viele homologe Bereiche existieren (Abb. 3.28).

### 3.3.5.1.2 Charakterisierung der DBL1 $\alpha$ -Domänen von FCR3<sup>745</sup>

```

tag 1      GCACGAAGTTTTCAGATATAGGAGATATGTAAGAGGAATAGATATGTTTCTTGGTAGT
tag 42     GCACGAAGTTTTCGCGATATTGGAGATATCGTACGCGGCAAAGATCTATATAGTGGTAAT
tag 53     GCACGAAGTTTTCAGATATAGGTGATATGTAAGAGGAATAGATATGTTTAAACCAAAT
*****
tag 1      AATAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAACAATTAGAAAATAATTTGAAAGAAATTTTCGGGGAT
tag 42     ACCAAAAGAAAAAACCGAAGAGATCAATTAGAAAAGAAATTTGAAAGAAATTTTCGGGGAT
tag 53     GTCCATGACAAAG-----TAGAAACGGGTCTCCGAGAGGTTTTCAGAA
          * * * * *                * * * * * * *
tag 1      ATATATAATGACGTCGACGTCAGCGGCAATAATAAGGAGGTGCTAAAAGCACGCTACAAT
tag 42     ATATATAATGACGTCGACGTCAGCGGCAATAATAAGGAGGTGCTAAAAGCACGCTACAAT
tag 53     ATACATGATGGAATGG-----AAGATGAAGTAAAAAATGATTACAATCCT
          * * * * *                * * * * * * *
tag 1      GATCCTAAAGGAAATTTTAAATTAAGGGAGGATTGGTGGACTGCAAAATCGGCACACC
tag 42     GGTGATACTGATAATTATATAAACTAAGAGAAGATTGGTGGACTGCTAATAGAGAAACA
tag 53     GATGGATCTGGAAATTATATAAATTAAGAGAAGCATGGTGGAAATGTGAATAGAAATAAA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
tag 1      GTGTGGAAGCCATGCATGCAGCGACAAGCTAGCAAATGCTTCATATTTTCATGCAACG
tag 42     GTATGGAAGCCATCACGTGCGGTGC---GCCAGAACATGCTTCATATTTTCGTGTAACA
tag 53     GTATGGGAAGCTATAACATGTGATGC---ATCATATAAATCTGGATATTTT-----A
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
tag 1      TGTATTGATCTTAATGGAAGTGGAGCCCAAGCTAATCACTACTGCGGTGTAACGGCGAC
tag 42     TGCAGTGAT--GAACAAGGTGGAGCCGAAGCTAATCACAATGCGCTGTCCC-----
tag 53     TGCAATCA-----GAAAGTAATAC-----ACCAATTATTTTCA-----
          * * * * *                * * * * * * * * * * *
tag 1      AAACCAGGTGACGACAAGGCAAATATCGATCCCCAACCTATTTGATTATGTGCCGACG
tag 42     AAGTCAAGAGACAACAAGTCCAATGACCAAGTCCCACATATTTGATTATGTGCCCTCAA
tag 53     AATCCTAAATGCGGCCATAAACAAGGAAAGGTTCTACCAATTTAGATTATGTCCCTCAA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
tag 1      TATCTTCGCTGGTTCGAGGAATGGGC
tag 42     TATTTGAGATGGTTCGAGGAATGGGC
tag 53     TATTTACGTTGGTTCGACGAATGGGC
          * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Abb. 3.29: Alignment der mittels RT-PCR und Sequenzierung identifizierten Sequenzen der DBL1 $\alpha$ -Domänen von FCR3<sup>745</sup>**

RT-PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert und mit dem Primer M13 Reverse sequenziert. Das Alignment wurde mit Hilfe von <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/> und <http://clustalw.genome.ad.jp/> hergestellt. Für FCR3<sup>745</sup> konnten drei verschiedene DBL1 $\alpha$ -Domänen identifiziert werden, die mit tag 1, tag 42 und tag 53 bezeichnet wurden. In rot sind die Primer markiert, die für die Herstellung der Sonden für die Northern Blot-Analyse verwendet wurden.

Für die Parasitenpopulation FCR3<sup>745</sup> konnten drei verschiedene DBL1 $\alpha$ -Domänen identifiziert werden. Sie wurden nach der Klonnummer mit tag 1, tag 42 und tag 53 bezeichnet. In den Sequenzen von tag 1 und tag 42 findet man viele homologe Sequenzen, aber auch die Homologie zu tag 53 ist relativ groß (Abb. 3.29).

### 3.3.5.1.3 Bestimmung der Häufigkeiten der Klone und der Homologien der identifizierten DBL1 $\alpha$ -Domänen

Die Plasmide, die durch Klonierung der RT-PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 erhalten wurden, wurden zusätzlich zur Sequenzierung auch mittels PCR und anschließender Restriktionsanalyse untersucht. Die mit Hilfe der Primer M13 Forward (-20) und M13 Reverse amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *Sau3A I* geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand des Bandenmusters konnten die Häufigkeiten der Klone bestimmt werden.

#### A

tag	Anzahl sequenzierter Klone	Klone nach Restriktionsanalyse	Homologie zu (Genbank Accession no.)	Homologie
3D7-tag A	6	7	PFD0995c PFD1000c	100%
3D7-tag B	4	4	PFL1960w	100%
3D7-tag C	5	19	PFE1640w	100%
3D7-tag D	3	4	PF10_0001	100%
	$\Sigma = 18$	$\Sigma = 34$		

#### B

tag	Anzahl sequenzierter Klone	Klone nach Restriktionsanalyse	Homologie zu (Genbank Accession no.)	Homologie
FCR3-tag 1	17	40	FCR3S1.2var11 (AF039283)	96%
FCR3-tag 42	3	3	A4AFBR6 (AJ319684)	97%
FCR3-tag 53	2	2	FCR3varCSA (AJ133811)	100%
	$\Sigma = 22$	$\Sigma = 45$		

#### Abb. 3.30: Darstellung der Häufigkeiten und Homologien der mittels RT-PCR identifizierten DBL1 $\alpha$ -Domänen

Die Plasmide, die durch Klonierung der RT-PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 erhalten wurden, wurden zusätzlich zur Sequenzierung mittels PCR und anschließender Restriktionsanalyse untersucht. Die mit Hilfe der Primer M13 Forward (-20) und M13 Reverse amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *Sau3A I* geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand des Bandenmusters konnten die Häufigkeiten der Klone bestimmt werden. Für die durch Sequenzierung ermittelten DBL1 $\alpha$ -tags wurden verschiedene Datenbanken nach bereits publizierten homologen Sequenzen durchsucht.

**A:** Homologe Sequenzen zu den DBL1 $\alpha$ -Domänen der 3D7<sup>745</sup> Parasiten wurden in der Datenbank PlasmoDB identifiziert.

**B:** Um die Homologien der DBL1 $\alpha$ -Domänen der FCR3<sup>745</sup> Parasiten zu bestimmen, wurden homologe DNA-Sequenzen unter Verwendung der Datenbank von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/> identifiziert.

Für die Parasitenpopulation 3D7<sup>745</sup> wurden Klone, die 3D7-tag C enthielten durch Restriktionsanalyse am häufigsten identifiziert, Klone mit 3D7-tag A am zweithäufigsten (Abb. 3.30A). Durch Sequenzierung wurden am meisten Klone mit 3D7-tag A gefunden. Der häufigste Klon in der Parasitenpopulation FCR3<sup>745</sup> war FCR3-tag 1, sowohl nach Sequenzierung als auch nach Restriktionsanalyse (Abb. 3.30B).

Um die Homologien der identifizierten DBL1 $\alpha$ -Domänen zu bereits publizierten *var* Genen bzw. DBL1 $\alpha$ -Domänen bestimmen zu können, wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Für die identifizierten DBL1 $\alpha$ -Domänen der 3D7<sup>745</sup> Parasiten wurden die zugehörigen vollständigen *var* Gene in der Datenbank PlasmoDB ermittelt, da sie das vollständige 3D7-Genom enthält (Bahl et al., 2003; Gardner et al., 2002). Die DBL1 $\alpha$ -Domänen von tag B, tag C und tag D wiesen jeweils nur Homologien zu einem *var* Gen auf. Für tag A konnten zwei verschiedene *var* Gene mit Homologie in der DBL1 $\alpha$ -Domäne ermittelt werden, da Sequenzen dieser beiden Gene am 5'-Ende des Gen vollständig übereinstimmen und sich nur am 3'-Ende unterscheiden (Abb. 3.30A). Sowohl die identifizierten *var* Gene für tag A, tag B (PFL1960w) als auch für tag D (PF10\_0001) weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf. Die Domänenstrukturen dieser *var* Gene wurden von J. Smith bestimmt (Smith et al., 2000b). Sie setzen sich zusammen aus einem N-terminalen Segment, einer DBL1 $\alpha$  Domäne, einer CIDR1 Domäne, einer DBL2 $\delta$  Domäne, einer CIDR2 Domäne und einer ATS. Die Homologie der DBL1 $\alpha$  Domänen der tags A, B und D ist relativ hoch, die DBL1 $\alpha$  Domäne von tag C unterscheidet sich etwas mehr von den DBL1 $\alpha$  Domänen der anderen tags. Die vorhergesagten Proteine für die zu tag A, B und D zugehörigen Genen sind zwischen 2150 und 2360 Aminosäuren lang und weisen auf Proteinebene vor allem am N-Terminus sowie in der ATS homologe Bereiche auf.

Um die Homologien der DBL1 $\alpha$ -Domänen der FCR3<sup>745</sup> Parasiten zu bestimmen, wurden homologe DNA-Sequenzen unter Verwendung der Datenbank von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/> identifiziert. Für jede der drei DBL1 $\alpha$ -Domänen konnten bereits publizierte homologe *var*DBL1 $\alpha$  tags gefunden werden, die auf Nucleotid-Ebene 96 – 100% Homologie aufwiesen (Abb. 3.30B).

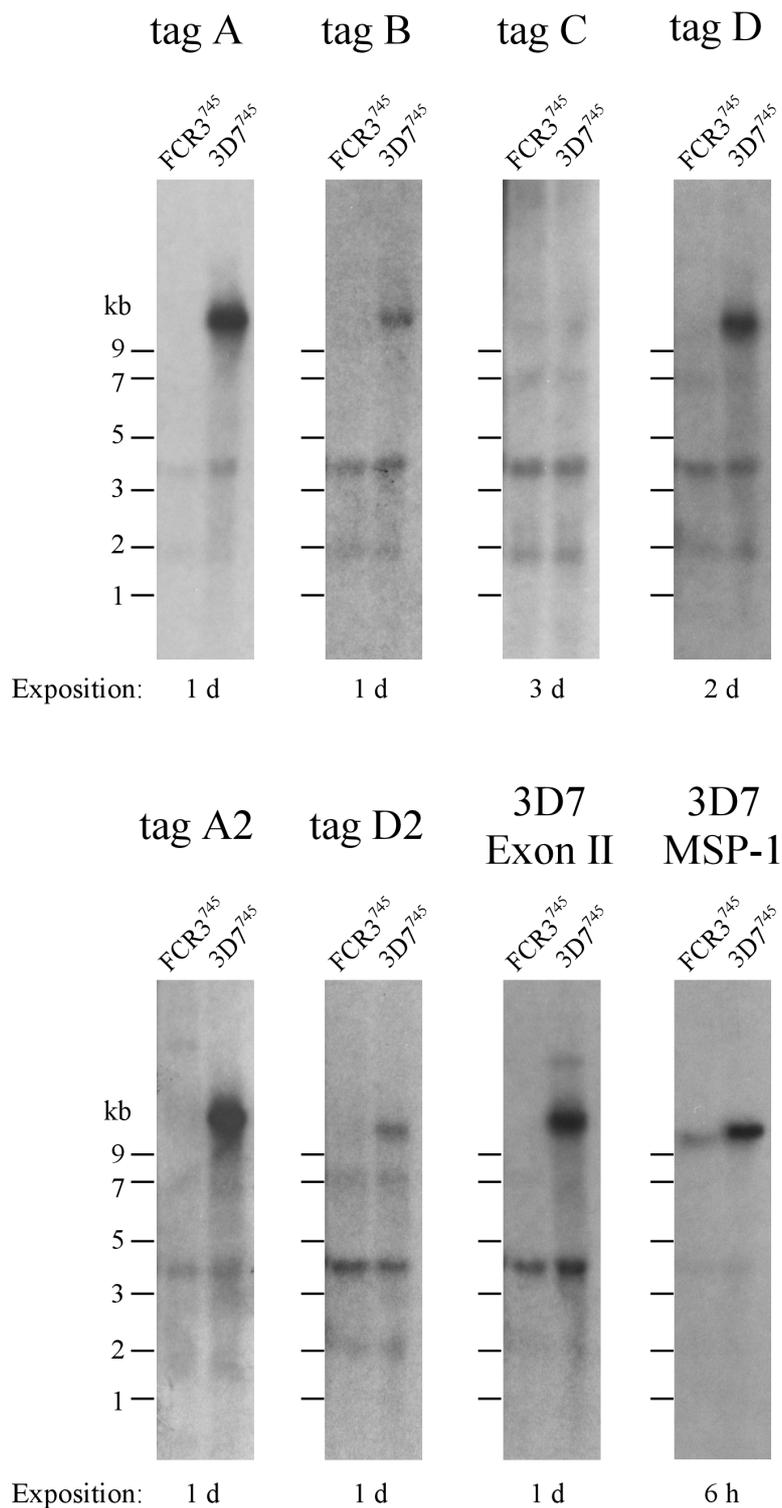
### 3.3.5.2 Northern Blot-Analyse zur Identifizierung vollständig transkribierter *var* Gene

Um zu untersuchen, welches die hauptsächlich transkribierten *var* Gene in den Parasitenpopulationen 3D7<sup>745</sup> und FCR3<sup>745</sup> sind, wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Mit dieser Methode können vollständige stabile Transkripte der *var* Gene detektiert werden.

#### 3.3.5.2.1 Charakterisierung der *var* Gen Transkription der Parasitenpopulation 3D7<sup>745</sup>

Gesamt-RNA wurde aus Ringstadien isoliert, elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und mit Sonden hybridisiert, die spezifisch waren für die mittels RT-PCR identifizierten DBL1 $\alpha$ -Domänen (tag A-D), weitere Domänen der zu tag A und tag D zugehörigen Gene (tag A2 und tag D2), die semi-konservierte Exon II-Domäne von 3D7 (3D7 Exon II) und das „Merozoite Surface Protein 1“ von 3D7 (3D7 MSP1) (Abb. 3.31). Um die Ergebnisse vergleichen zu können wurde der Blot nach dem Hybridisieren „gestripped“ und anschließend mit anderen Sonden erneut hybridisiert.

In 3D7<sup>745</sup> konnten die DBL1 $\alpha$ -spezifischen Sonden für tag A, tag B sowie für tag D eine RNA von ~11 kb detektieren. RNA der gleichen Größe wurde auch von der 3D7 Exon II-Sonde erkannt, d.h. daß die Parasiten mindestens ein vollständiges *var* Gen transkribierten. Um zu unterscheiden, ob verschiedene *var* Gene der gleichen Größe transkribiert wurden, oder ob die Sonden für tag A, tag B und tag D aufgrund ihrer hohen Homologie mit der gleichen RNA kreuzreaktiv waren, wurden weitere Sonden hergestellt. Deshalb wurden andere Bereiche aus den vollständigen Sequenzen der zugehörigen *var* Gene PFD0995c/PFD1000c (tag A) und PF10\_0001 (tag D) ausgewählt. Mittels PCR konnten diese Fragmente aus genomischer DNA amplifiziert, radioaktiv markiert und als Sonden eingesetzt werden. Diese Sonden wurden mit tag A2 und tag D2 bezeichnet. Auch diese beiden Sonden detektierten eine RNA von ~11 kb. Allerdings waren die Signale sowohl für tag A als auch für tag A2 deutlich stärker als die Signale für tag B, tag D und tag D2.



**Abb. 3.31: Northern Blot-Analyse der Parasitenpopulationen 3D7<sup>745</sup> und FCR3<sup>745</sup> mit 3D7-spezifischen Sonden**

Gesamt-RNA von Ringstadien wurde elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt und mit Sonden hybridisiert, die spezifisch waren für die mittels RT-PCR identifizierte DBL1 $\alpha$ -Domänen (tag A-D), weitere Domänen der zu tag A und tag D zugehörigen Gene (tag A2 und tag D2), die semi-konservierte Exon II-Domäne von 3D7 (3D7 Exon II) und das Merozoite Surface Protein 1 von 3D7 (3D7 MSP1). Alle Sonden wurden unter hoch stringenten Bedingungen hybridisiert. Ein RNA-Größenmarker ist in Kilobasen (kb) angegeben.

Eine tag C-spezifische Sonde konnte keine RNA detektieren. Die Sonden, die spezifisch gegen die vier verschiedenen DBL1 $\alpha$ -Domänen der 3D7<sup>745</sup> Parasiten gerichtet waren, hybridisierten nicht mit RNA aus FCR3<sup>745</sup> Parasiten. Alle DBL1 $\alpha$ -spezifischen Sonden, sowie die Exon II-Sonde hybridisierten mit ribosomaler RNA und detektierten RNAs mit einer Größe von 2 bzw. 4 kb. Die 3D7 Exon II-Sonde detektierte zusätzlich noch eine RNA bei 15 kb. Die Hybridisierung mit der MSP-1-spezifischen Sonde wurde durchgeführt, um die Qualität der RNA zu überprüfen. Die Sonde 3D7-MSP-1 detektierte ein Transkript von ~10 kb Größe in der Parasitenpopulation 3D7<sup>745</sup> und viel schwächer ein Transkript von ~9 – 9,5 kb Größe in FCR3<sup>745</sup> Parasiten (Abb. 3.31).

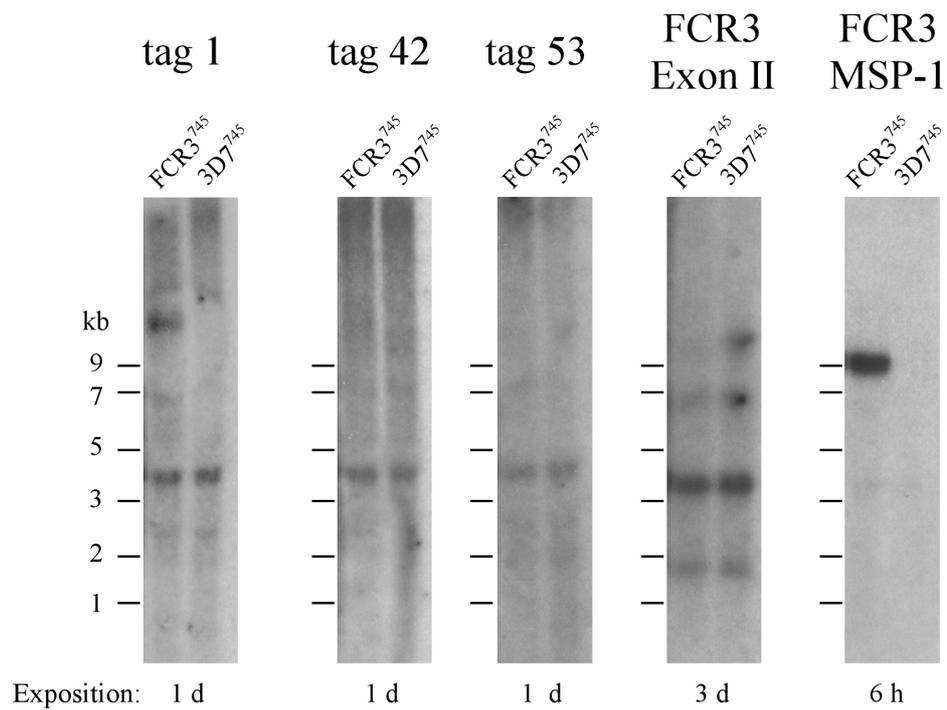
Die Parasiten der Population 3D7<sup>745</sup> transkribieren mindestens ein vollständiges *var* Gen mit einer Größe von ~11 kb.

### 3.3.5.2.2 Charakterisierung der *var* Gen Transkription der Parasitenpopulation FCR3<sup>745</sup>

Gesamt-RNA aus Ringstadien wurde mit Sonden hybridisiert, die spezifisch waren für die mittels RT-PCR identifizierten DBL1 $\alpha$ -Domänen (tag 1, tag 42, tag 53), die semi-konservierte Exon II-Domäne von FCR3 (FCR3 Exon II) und das Merozoite Surface Protein 1 von FCR3 (FCR3 MSP1).

In FCR3<sup>745</sup> konnten die DBL1 $\alpha$ -spezifischen Sonden für tag 42 und tag 53 keine RNA detektieren. Nur die tag 1-spezifische Sonde hybridisierte mit einer RNA von einer Größe von ~11-12 kb. Die FCR3 Exon II-Sonde detektierte keine RNA in der Parasitenpopulation FCR3<sup>745</sup>. In 3D7<sup>745</sup> Parasiten konnte keine dieser Sonden eine spezifische RNA detektieren (Abb. 3.32). Unter weniger stringenten Bedingungen konnte die FCR3 Exon II-Sonde in 3D7<sup>745</sup> Parasiten RNAs von ~11 bzw. 15 kb detektieren, in FCR3<sup>745</sup> Parasiten hybridisierte die Sonde nicht (ohne Abbildung).

Die Sonde 3D7-MSP-1 detektierte nur ein Transkript von ~9 – 9,5 kb Größe in FCR3<sup>745</sup> Parasiten. Alle DBL1 $\alpha$ -spezifische Sonden, sowie die FCR3 Exon II-Sonde hybridisierten mit ribosomaler RNA aus FCR3<sup>745</sup> sowie aus 3D7<sup>745</sup> (Abb. 3.32).



**Abb. 3.32: Northern Blot-Analyse der Parasitenpopulationen 3D7<sup>745</sup> und FCR3<sup>745</sup> mit FCR3-spezifischen Sonden**

Gesamt-RNA von Ringstadien wurde elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt und mit Sonden hybridisiert, die spezifisch waren für die mittels RT-PCR identifizierte DBL1 $\alpha$ -Domänen (tag 1, tag 42, tag 53), die semi-konservierte Exon II-Domäne von FCR3 (FCR3 Exon II) und das Merozoite Surface Protein 1 von FCR3 (FCR3 MSP1). Alle Sonden wurden unter hoch stringenten Bedingungen hybridisiert. Ein RNA-Größenmarker ist in Kilobasen (kb) angegeben.

In Parasiten der Population FCR3<sup>745</sup> ist ein *var* Gen transkribiert, dessen DBL1 $\alpha$ -Domäne Homologie zu der bereits publizierten Domäne von FCR3S1.2*var*11 besitzt.

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Aktivierung primärer humaner Endothelzellen durch *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrocyten *in vitro*

Während einer Malariainfektion befinden sich die vaskulären Endothelzellen des Patienten in ständigem Kontakt mit infizierten Erythrocyten. Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an das vaskuläre Endothel ist ein wichtiger Prozeß in der Pathogenese der Malaria tropica. Einige der beschriebenen Adhäsionsrezeptoren u.a. ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin werden jedoch erst nach Stimulation der Endothelzellen z.B. mit inflammatorischen Cytokinen oder durch Interaktion mit Pathogenen exprimiert (Bevilacqua, 1993) und können deshalb als Aktivierungsmarker für Endothelzellen angesehen werden. Es stellt sich die Frage, ob die Parasiten während ihrer Entwicklung nicht nur Veränderungen in den Erythrocyten bewirken, sondern auch durch initiale Interaktion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten mit den Endothelzellen Veränderungen im Mikromilieu der Blutgefäße hervorgerufen werden können. Dies könnte zu einem proadhäsiven Phänotyp der Endothelzellen führen, der durch verstärkte Adhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten die Überlebenschancen der Parasiten im Wirt erhöht, indem die Chancen einer Eliminierung durch die Milz verringert werden.

Im Laufe dieser Arbeit konnte die Aktivierung primärer humaner Nabelschnur-Endothelzellen durch die direkte Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten *in vitro* nachgewiesen und charakterisiert werden. HUVECs reagieren auf die Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit einer verstärkten Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche, sowie mit der Sekretion des multifunktionellen Cytokins IL-6. Während die ICAM-1 Expression auf TNF $\alpha$ -aktivierten HUVECs deutlich höher ist als auf HUVECs, die mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten stimuliert wurden, so sezernieren diese mehr IL-6 als die TNF $\alpha$ -aktivierten. Im Gegensatz zu einer Aktivierung der primären Endothelzellen mit TNF $\alpha$  oder mit GPI-Ankern der Malariaparasiten (Schofield et al., 1996) wird durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten die Expression von VCAM-1 und E-Selektin nicht erhöht. Die Expression von PECAM-1, das im Bereich interzellulärer Verbindungen lokalisiert ist, wird weder durch parasitierte Erythrocyten noch durch TNF $\alpha$  verändert. Bei einem Vergleich des zeitlichen Ablaufs der ICAM-1 Expression sowie der IL-6 Sekretion in Endothelzellen, die durch TNF $\alpha$  bzw. *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten stimuliert

wurden, werden deutliche Unterschiede sichtbar. Während TNF $\alpha$  innerhalb von 6 h die Expression von ICAM-1 auf der Oberfläche der Endothelzellen erhöht, fördert die Stimulation der HUVECs durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten hauptsächlich die Sekretion von IL-6. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse auf die Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signaltransduktionswege in den Endothelzellen durch TNF $\alpha$  und durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten schließen. Die Hochregulierung der ICAM-1 Expression auf HUVECs durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten ist TNF $\alpha$ -unabhängig (Esslinger et al., 1994).

Für eine Aktivierung der Endothelzellen ist der direkte Kontakt mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten erforderlich, lösliche Mediatoren sind nicht ausreichend. Diese Ergebnisse aus Experimenten mit Transwell-Systemen werden durch frühere Veröffentlichungen bestätigt (Pino et al., 2003; Udeinya and Akogyeram, 1993). Keine Unterschiede in der Aktivierung primärer Endothelzellen wurden bei Verwendung verschiedener *P. falciparum*-Klone beobachtet. Erythrocyten, die mit Plasmodien der klonalen Linien FCR3, 3D7 sowie den ICAM-1 bindenden Parasiten A4 und ItG infiziert waren, zeigten die gleichen Fähigkeiten zur Aktivierung der HUVECs. Da die Aktivierung der HUVECs unabhängig vom Adhäsionsphänotyp der Plasmodien war, ist zu vermuten, daß die Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten im klassischen Sinn keine Rolle bei der Aktivierung spielt. Obwohl die direkte Interaktion erforderlich ist, konnte die Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an die HUVECs mikroskopisch nicht beobachtet werden (ohne Abbildung). Im Gegensatz dazu erfolgt die Inhibition der Reifung Dendritischer Zellen durch Adhäsion parasitierter Erythrocyten an CD36 und Thrombospondin, ein Kontakt ohne Adhäsion ist nicht ausreichend (Urban et al., 1999). Es bleibt zu klären welche Moleküle oder Proteine der *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten die Aktivierung der Endothelzellen induzieren.

Das Ausmaß der Aktivierung der HUVECs ist abhängig von der Parasitämie und der Anzahl verwendeter *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten. Je mehr infizierte Erythrocyten in die Experimente eingesetzt wurden, um so stärker war die Aktivierung der Endothelzellen. Vermutlich erhöht eine größere Parasitendichte die Chancen einer Interaktion der infizierten Erythrocyten mit den Endothelzellen.

Interessanterweise reicht eine Coinkubationszeit von 30 min aus, um die Aktivierung der HUVECs zu induzieren, wenn auch die Aktivierung der Endothelzellen mit längerer Coinkubationszeit zunahm. Da sich die vaskulären Endothelzellen während einer Malariainfektion in ständigem Kontakt mit infizierten Erythrocyten befinden, könnte eine

Aktivierung der Endothelzellen durch die kontinuierliche Interaktion mit den *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten stattfinden, ohne daß *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten cytoadhären müssen. Auch eine Inhibition der Reifung Dendritischer Zellen wurde *in vitro* bereits nach 3 h Coinkubationszeit mit infizierten Erythrocyten induziert (Urban et al., 1999). Nicht nur humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) werden durch die Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten aktiviert. Während die Aktivierung humaner arterieller Endothelzellen der Lunge (HPAEC) auf ähnliche Weise erfolgt, konnten *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) nicht aktivieren. Da jedoch nur HDMECs eines einzigen Spenders verwendet wurden, ist es nicht auszuschließen, daß die Aktivierung der Zellen eines anderen Isolats vergleichbare Ergebnisse zu HUVECs oder HPAECs liefern könnte. Allerdings ist es durchaus möglich, daß sich mikrovaskuläre HDMECs und makrovaskuläre HUVECs in ihrer Aktivierbarkeit durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten unterscheiden.

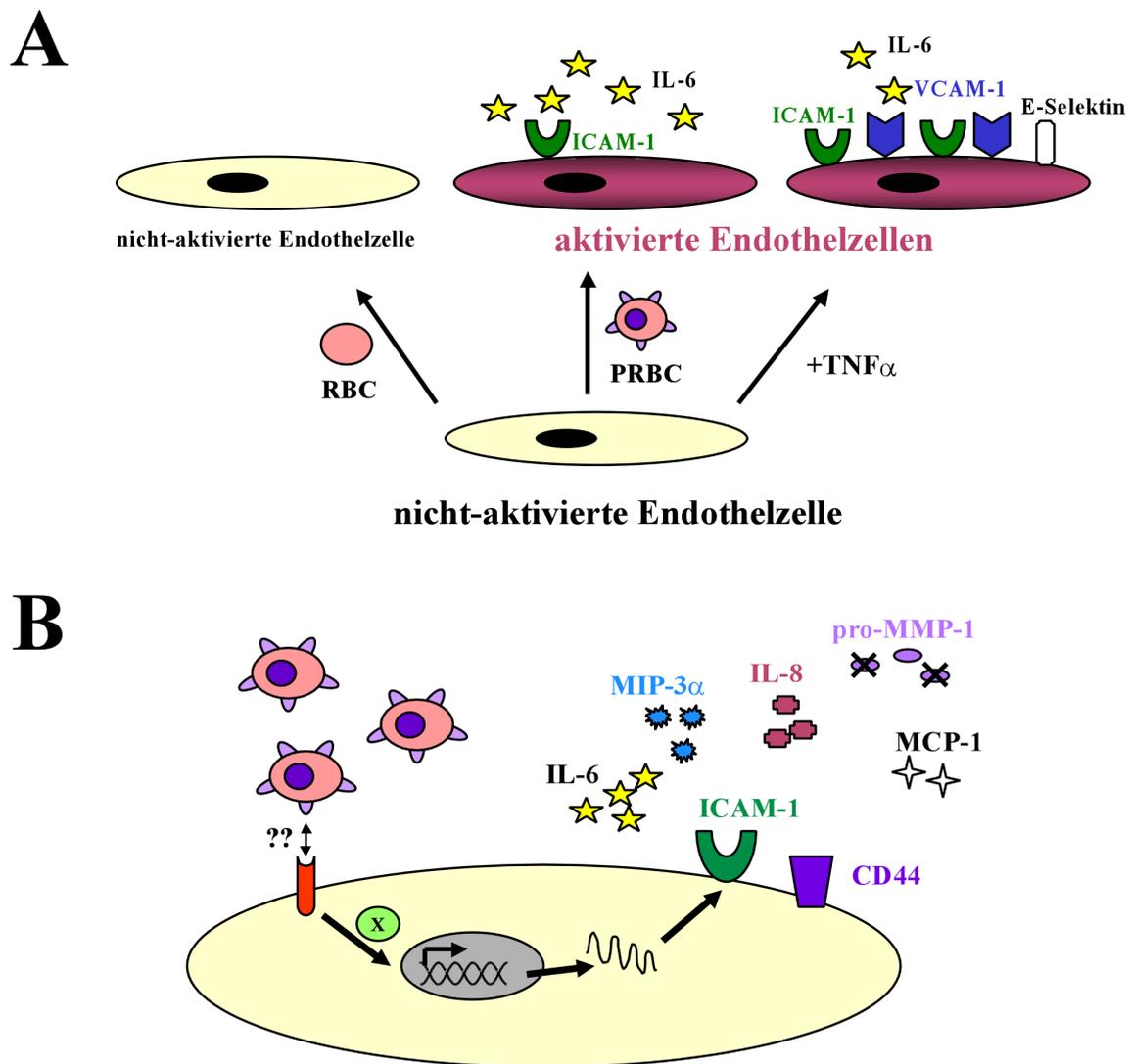
Die Interaktion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten mit Endothelzellen resultiert u.a. in einer erhöhten Expression des Adhäsionsrezeptors ICAM-1 auf der Zelloberfläche. Es bleibt zu klären, ob Erythrocyten, die mit ICAM-1 bindenden Plasmodien infiziert sind, eine erhöhte Cytoadhäsion an diese aktivierten Endothelzellen zeigen. Es wurde beschrieben, daß durch Cokultivierung *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten mit HUVECs deren Fähigkeit zur Cytoadhäsion gesteigert wird (Udeinya and Akogyeram, 1993). Auch GPI-Anker der Plasmodien, sowie ein rekombinantes CD36-bindendes PfEMP-1 Peptid konnten Endothelzellen stimulieren und eine verstärkte Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an diese aktivierten Endothelzellen bewirken (Schofield et al., 1996; Yipp et al., 2003).

Um Hinweise auf mögliche Signaltransduktionswege zu erhalten, die in den Endothelzellen durch Kontakt mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten aktiviert werden, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt. Es konnten 35 Gene identifiziert werden, deren Transkription in HUVECs durch Coinkubation mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten verstärkt wurde, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit Erythrocyten kokultiviert wurden. Unter diesen überexprimierten Genen befanden sich u.a. Gene für Chemokine, Metalloproteinasen der ADAM (A disintegrin and metalloproteinase)-Familie, sowie für Adhäsionsmoleküle. Die größten Veränderungen im Verhältnis der mRNA-Konzentrationen waren für die Chemokine MIP-3 $\alpha$ , IL-8 und MCP-1 zu beobachten, geringere Veränderungen für das Adhäsionsmolekül CD44. Außerdem wurde eine erhöhte mRNA-Konzentration für

das BCL2-related Protein A1 (BCL2A1) detektiert, das ein Mitglied der BCL2-Familie ist und antiapoptotische Aktivität aufweist (Lin et al., 1996). Andererseits wurden erhöhte mRNA-Konzentrationen für TNF receptor-associated factor 1, 3 und 6, Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie und der TNF-Liganden-Superfamilie detektiert, die teilweise Apoptose-fördernde Eigenschaften besitzen (Mosialos et al., 1995). Pino et al. (Pino et al., 2003) konnten mittels Macroarray-Analyse auf HLEC, die mit 3D7-infizierten Erythrocyten cokultiviert wurden, ebenfalls erhöhte mRNA-Konzentrationen für Apoptose-verwandte Gene und Cytokine detektieren, sowie die Induktion der Apoptose durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten in den HLEC nachweisen. Urban et al. (Urban et al., 1999) konnten im Gegensatz dazu keine erhöhte Apoptose-Häufigkeit der Dendritischen Zellen durch Kontakt mit parasitierten Erythrocyten detektieren.

Zur Verifizierung der Ergebnisse des Microarrays wurde die Proteinexpression von MIP-3 $\alpha$ , IL-8, MCP-1 und CD44, sowie von pro-MMP-1 und CD36 untersucht. Die Konzentrationen der mRNAs von pro-MMP-1 und CD36 zeigten in der Microarray-Analyse keine Veränderungen. In Übereinstimmung mit den Daten der Microarrays wurde die Sekretion der Chemokine MIP-3 $\alpha$ , IL-8 und MCP-1 durch Interaktion der HUVECs mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten induziert. Im Gegensatz dazu konnte weniger ungebundenes pro-MMP-1 im Medienüberstand der HUVECs, die mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten aktiviert waren, mittels ELISA nachgewiesen werden. Mögliche Erklärungen sind zum einen die verstärkte proteolytische Aktivierung des Zymogens pro-MMP-1, zum anderen eine verringerte Sekretion von pro-MMP-1. Über die aktive Form von MMP-1 kann keine Aussage gemacht werden. Die Expression des Zelloberflächenmoleküls CD44 konnte durch die Interaktion der Endothelzellen mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten gesteigert werden. CD36 wurde auf HUVECs nicht nachgewiesen.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden in den Endothelzellen durch direkte Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten erfolgt. Eine Regulation der Genexpression findet bereits auf Transkriptionsebene statt. Eine erhöhte Expression der Proteine ICAM-1, CD44, MIP-3 $\alpha$ , MCP-1, IL-8 und IL-6 ist als Resultat zu beobachten.



**Abb. 4.1:** Schematische Darstellung der Ergebnisse der Aktivierung von Endothelzellen durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten *in vitro*

**A:** Schematische Darstellung der Aktivierung der Endothelzellen durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten und TNF $\alpha$  im Vergleich zu der Erythrocytenkontrolle.

**B:** Schematische Zusammenfassung der Aktivierung der Endothelzellen durch direkte Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten. Intrazelluläre Signalkaskaden werden aktiviert und es erfolgt eine Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene. Eine erhöhte Expression der Proteine ICAM-1, CD44, MIP-3 $\alpha$ , MCP-1, IL-8 und IL-6 ist als Resultat zu beobachten, die detektierte Menge an pro-MMP-1 ist geringer als in den Kontrollen.

Wie lassen sich diese *in vitro* Ergebnisse mit der *in vivo* Situation im Malariapatienten in Verbindung bringen? Welche Relevanz haben diese Adhäsionsrezeptoren und Cytokine im Krankheitsverlauf der Malaria? Zwar ist die Situation im Patienten komplexer und beobachtete Effekte werden durch vielfältige Zell-Zell-Interaktionen, verschiedene Zelltypen und viele unterschiedliche lösliche Mediatoren, z.B. Cytokine, Chemokine, Malariatoxine ausgelöst. Dennoch ist die Expression einiger Proteine, die in dieser Arbeit *in vitro* identifiziert wurden, in Feldstudien in Malariapatienten bereits untersucht worden.

Cytokine sind kleine Proteine (~25 kDa), die von verschiedenen Zellen als Antwort auf einen aktivierenden Stimulus freigesetzt werden. Sie wirken meist autokrin oder parakrin, seltener in endokriner Weise (Janeway et al., 2001). Chemokine sind eine Klasse chemotaktischer Cytokine, die sich in zwei große Familien einteilen lassen: die CXC- oder  $\alpha$ -Chemokine (z.B. IL-8), die hauptsächlich polymorphkernige Leukocyten (Neutrophile) anlocken und die CC- oder  $\beta$ -Chemokine (z.B. MCP-1, MIP-3 $\alpha$ ), die vor allem auf Monocyten, Makrophagen und Lymphocyten wirken (Matsukawa et al., 2000).

Das multifunktionelle Cytokin **IL-6** wird von verschiedenen Zellen, einschließlich Endothelzellen, sezerniert (Marin et al., 2001). Es besitzt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften und spielt eine wichtige Rolle in der „akuten Phaseantwort“ sowie in der T- und B-Zell-vermittelten Immunantwort (Marin et al., 2001). In Malariapatienten wurde eine erhöhte Plasmakonzentration von IL-6 in verschiedenen Studien beschrieben (Wenisch et al., 1999). In Patienten mit komplizierter Malaria wurde eine höhere IL-6 Konzentration im Plasma detektiert als in Patienten mit unkomplizierter Malaria (el-Nashar et al., 2002; Kremsner et al., 1995). Zusätzlich wurden erhöhte Konzentration des löslichen IL-6 Rezeptors  $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ) gefunden (Wenisch et al., 1999). Zusammen mit gp130, das auf fast allen Zellen exprimiert ist, bildet sIL-6R $\alpha$  den komplexen IL-6 Rezeptor. Der sIL-6R $\alpha$  wird nur von wenigen Zellen exprimiert, u.a. von Hepatocyten und Neutrophilen (Bauer et al., 1989). Die Bindung von sIL-6R $\alpha$  an IL-6 verhindert die enzymatische Inaktivierung von IL-6 und ermöglicht die Interaktion mit gp130 (Marin et al., 2001; Peters et al., 1996). Ein proinflammatorischer Phänotyp in gp130 exprimierenden Endothelzellen kann dadurch induziert werden (Modur et al., 1997).

Auch eine erhöhte **IL-8** Konzentration konnte in Patienten mit einer *P. falciparum*-Infektion sowohl im Plasma des peripheren Bluts als auch aus der Plazenta nachgewiesen werden (Burgmann et al., 1995; Kremsner et al., 1995). IL-8 ist ein primäres inflammatorisches Cytokin, das von vielen Zellen u.a. von Monocyten, Makrophagen, T-Zellen, Neutrophilen und Endothelzellen als Antwort auf proinflammatorische Stimuli produziert wird (Janeway et al., 2001). Es bindet an die beiden G-Protein-gekoppelten IL-8 Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, sowie an das Duffy-Antigen, das nicht an der Signaltransduktion beteiligt ist (Lee et al., 2003; Palter et al., 2001). Seine Funktion ist die Anlockung von Neutrophilen an den Ort der Entzündung bzw. Infektion (Modi et al., 1990).

Das Chemokin **MCP-1** wird u.a. von Endothelzellen sezerniert und bewirkt eine chemotaktische Anlockung der Monocyten, die den Chemokinrezeptor CCR2 exprimieren (Mack et al., 2001). In der Plazenta *P. falciparum*-infizierter Frauen mit maternaler Malaria

konnte eine erhöhte MCP-1 mRNA Konzentration gemessen werden, eine erhöhte MCP-1 Konzentration im Plasma wurde nicht nachgewiesen (Abrams et al., 2003). Maternale Monocyten und Macrophagen, die aus der Plazenta *P. falciparum*-infizierten Frauen isoliert wurden, sezernierten *in vitro* gesteigerte Mengen an MCP-1 (Suguitan et al., 2003). Obwohl eine gesteigerte MCP-1 mRNA Expression in Mäusen bei einer *P. berghei* ANKA-Infektion in verschiedenen Organen festgestellt werden konnte (Hanum et al., 2003), wurde im Mausmodell gezeigt, daß der Chemokinrezeptor CCR2 für die Ausbildung einer cerebralen Malaria nicht essentiell ist (Belnoue et al., 2003). Die Rolle von MCP-1 in der Malaria bleibt daher noch ungeklärt. Sowohl IL-8 als auch MCP-1 sind Liganden für den „Duffy antigen receptor for chemokines“ (DARC), der auf Erythrocyten und auf Endothelzellen der postkapillaren Venolen exprimiert ist (Peiper et al., 1995; Rot, 2003).

**MIP-3 $\alpha$**  wird von aktivierten Zellen z.B. Endothelzellen, Monocyten und Fibroblasten sezerniert und es interagiert mit dem G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptor CCR6, der u.a. auf B-Zellen und Dendritische Zellen exprimiert ist (Hieshima et al., 1997; Hromas et al., 1997; Rossi et al., 1997). Ein Zusammenhang zwischen der MIP-3 $\alpha$  Konzentration im Plasma der Malariapatienten und dem Krankheitsverlauf ist bisher nicht beschrieben. Allerdings weist MIP-3 $\alpha$  sowohl Homologien als auch gemeinsame biologische Aktivitäten zu MIP-1 $\alpha$  auf, für das eine erhöhte Plasmakonzentration in Malariapatienten nachgewiesen wurde (Abrams et al., 2003; Burgmann et al., 1995).

Höhere Plasmakonzentrationen von **TNF** und **TNF-Rezeptor (TNFR)** wurden in Patienten vor allem mit komplizierter Malaria tropica beobachtet (Kremsner et al., 1995; Wenisch et al., 1999). Gesteigerte mRNA Konzentrationen für Mitglieder der TNF und TNF-Rezeptor Superfamilie konnten in dieser Arbeit mittels Microarray-Analyse bestimmt werden. Einige Mitglieder dieser Familie besitzen Apoptose-fördernde Eigenschaften (Mosialos et al., 1995). Die durch *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten induzierte Apoptose der Endothelzellen (Pino et al., 2003) könnte direkt an der Zerstörung der Blut-Gehirn-Schranke in der cerebralen Malaria beteiligt sein (Adams et al., 2002). **MMP-1** wird als Zymogen nach Stimulation von unterschiedlichen Zellen u.a. von Endothelzellen und Macrophagen sezerniert und durch verschiedene Proteasen aktiviert. Nach seiner Aktivierung ist es vor allem an der Degradation von Collagenfasern in der extrazellulären Matrix beteiligt (Pratta et al., 2003). Gesteigerte Konzentrationen an MMP-1 konnten immunhistochemisch im Gehirn von Patienten mit cerebraler Malaria detektiert werden, u.a. in Astrocyten, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, sowie in Makrophagen und Mikrogliazellen im Bereich der Dürck's Granuloma, d.h. von

Läsionen im Gehirn (Deininger et al., 2003). Die Konzentrationen von sezerniertem, aktiviertem MMP-1 wurde nicht bestimmt.

**CD44**, das an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist, wird von vielen verschiedenen Zellen in verschiedenen Isoformen exprimiert und ist unterschiedlich modifiziert, u.a. durch N- und O-Glykosylierung oder sulfatierte Glykosaminoglykane (z.B. CSA) (Mackay et al., 1994). Die Modifikationen mit CSA machen CD44 zu einem Adhäsionsrezeptor für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten auf humanen Endothelzellen (Pouvelle et al., 1997). Die Induktion einer erhöhten CD44 Expression durch Interaktion der Endothelzellen mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten könnte somit eine verstärkte CD44-vermittelte Cytoadhäsion ermöglichen. Ein Zusammenhang zwischen CD44 Expression und Krankheitsverlauf der Malaria wurde bisher nicht untersucht.

**ICAM-1** ist ein Cytoadhäsionsrezeptor für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten, der vor allem mit der Ausbildung einer cerebralen Malaria in Verbindung gebracht wird (Miller et al., 2002). In Patienten mit cerebraler Malaria wurde eine gesteigerte Expression von ICAM-1 auf den vaskulären Endothelzellen im Gehirn, sowie auf sequestrierten, intravaskulären Leukocyten nachgewiesen (Porta et al., 1993; Turner et al., 1994). Die Pathologie der cerebralen Malaria ist multifaktoriell und komplex und bisher nur ansatzweise verstanden. Allerdings wird vermutet, daß neben der Sequestrierung *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten auch die Sequestrierung von Leukocyten und aktivierten Blutplättchen in den Blutgefäßen des Gehirns u.a. durch Interaktion mit ICAM-1 zu der Ausbildung einer cerebralen Malaria beitragen (Hunt and Grau, 2003). Konzentrationen der verschiedenen Th1- (z.B. TNF $\alpha$  und INF- $\gamma$ ) und Th2-Cytokine (z.B. IL-10, TGF- $\beta$ ), sowie Modifikationen in der Funktion der Blut-Hirn-Schranke sind weitere wichtige Faktoren, die den Verlauf der Krankheit beeinflussen (Hunt and Grau, 2003). Eine erhöhte Expression von ICAM-1 wurde in der Plazenta nur auf Monocyten und Makrophagen detektiert, nicht jedoch auf Endothelzellen der Villi oder Syncytiotrophoblasten (Sugiyama et al., 2001). Vermutlich bewirkt die Sequestrierung *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten in der Plazenta die Sekretion einiger CC-Chemokine z.B. MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  durch mononucleäre Zellen (Monocyten und Lymphocyten). Diese Chemokine rekrutieren weitere Makrophagen in die Plazenta, die Parasiten bzw. Hämozoen phagozytieren und TNF $\alpha$  freisetzen und somit zu einer Kontrolle der Infektion beitragen (Suguitan et al., 2003). Eine exzessive Akkumulation mononucleärer Zellen in der Plazenta ist mit einem geringen Geburtsgewicht assoziiert (Menendez et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß intrazelluläre Signaltransduktionswege in Endothelzellen der Mikrovaskulatur unterschiedlicher Organe durch physikalische Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten aktiviert werden. Die Endothelzellen reagieren mit einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen z.B. ICAM-1 und mit der Sekretion von Cytokinen und Chemokinen. Durch die veränderte Genexpression entsteht ein proadhäsiver Phänotyp der Endothelzellen, der in einer verstärkten Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten resultieren kann. Dadurch kann demonstriert werden, daß Endothelzellen durch Kontakt mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten stimuliert werden können, ohne daß eine vorhergehende Aktivierung der Makrophagen oder Monocyten erfolgen muß. Diese Beobachtung ist von wesentlicher Bedeutung für das Verständnis pathogenetischer Vorgänge im Malariapatienten. Durch die Expression der unterschiedlichen Chemokine durch die stimulierten Endothelzellen werden Monocyten und Makrophagen angezogen, infiltrieren die Organe z.B. die Plazenta oder das Gehirn. Dort erfolgt eine Aktivierung der Leukocyten, die ebenfalls mit der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Sekretion von Chemokinen antworten. Auch eine chemotaktische Anlockung von Erythrocyten ist nicht auszuschließen, da sie den „Duffy antigen receptor for chemokines“ auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Sequestrierung von Monocyten, Makrophagen, Blutplättchen und *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten bewirken u.a. den Verschluss der Blutgefäße sowie eine weitere Sekretion von Cytokinen, die zur Entstehung einer komplizierten Malaria beitragen und damit zum Tod des Patienten führen können.

Da für viele der *in vitro* identifizierten Proteine auch im Malariapatienten eine erhöhte Proteinexpression nachgewiesen wurde, stellt dieses *in vitro*-Modellsystem ein wertvolles Werkzeug dar. Es kann zur Charakterisierung weiterer Faktoren, die an der Pathogenese der Malaria beteiligt sind, eingesetzt werden und somit zum besseren Verständnis des Krankheitsverlaufs beitragen.

## **4.2 L-SIGN und seine Funktion in der Pathogenese der Malaria**

L-SIGN ist ein C-Typ Lektin, das hauptsächlich in der Leber und in Lymphknoten exprimiert ist (Bashirova et al., 2001). Es weist große strukturelle und funktionelle Homologie zu DC-SIGN auf, das auf Dendritischen Zellen exprimiert ist. DC-SIGN ist an der Aufnahme exogener Antigene beteiligt, die nach Prozessierung auf MHC-Molekülen an T-Zellen

präsentiert werden (Engering et al., 2002). Ziel dieser Arbeit war es zum einen den Zelltyp in der Leber zu identifizieren, der L-SIGN exprimiert, sowie die Funktion von L-SIGN bei der Antigenaufnahme und -präsentation zu bestimmen und zum anderen die mögliche Funktion von L-SIGN in der Pathogenese der Malaria zu untersuchen. Durch initiale Adhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an einen leberspezifischen Rezeptor auf sinusoidalen Endothelzellen könnte die anti-parasitäre Immunantwort so verändert werden, daß die Plasmodien einen Überlebensvorteil im Wirt erhalten, z.B. durch Entstehung von Immuntoleranz in der Leber.

#### **4.2.1 Expression verschiedener Isoformen von L-SIGN auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber**

Im Laufe dieser Arbeit gelang es die Expression von L-SIGN auf sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) nachzuweisen. Im Gegensatz zu den anderen hepatischen Zellen, besitzen LSEC die Fähigkeit fluorochrom-markiertes Ovalbumin zu binden und zu internalisieren und lassen sich dadurch von den anderen in der Leber ansässigen Zellen unterscheiden (Knolle and Gerken, 2000). Die L-SIGN Expression konnte mit polyklonalen  $\alpha$ -L-SIGN Antikörpern nur auf Ovalbumin-positiven Zellen, d.h. auf LSEC nachgewiesen werden.

Bashirova et al. (Bashirova et al., 2001) konnten die L-SIGN Expression in Immunhistochemischen Analysen in humaner Leber ebenfalls auf den Zellen nachweisen, die die Sinusoide auskleiden, d.h. den LSEC. Wie sein Homolog DC-SIGN ist auch L-SIGN in der Lage mit ICAM-3 zu interagieren, sowie HIV-1 zu binden und die Infektion von T-Zellen in *trans* zu verstärken (Bashirova et al., 2001). Da Interaktionen von LSEC mit Leukocyten eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der peripheren Immunkontrolle in der Leber spielen (Knolle and Gerken, 2000), könnte eine mögliche physiologische Funktion von L-SIGN in der Adhäsion von Leukocyten an LSEC, sowie in der Eliminierung von Antigenen liegen. L-SIGN exprimierende Zellen in der Leber könnten auch an der Elimination von apoptotischen Zellen beteiligt sein, da diese große Mengen an ICAM-3 exprimieren (Bashirova et al., 2001; Moffatt et al., 1999).

Zusätzlich werden unterschiedliche Isoformen von L-SIGN in der Leber transkribiert. Drei verschiedene Isoformen sowie eine Mutante konnten mittels PCR aus einer cDNA-Bank aus humaner Leber amplifiziert werden. Detektiert wurden eine Form von L-SIGN mit sieben Repeatregionen sowie eine mit fünf Repeatregionen. Diese beiden Allele sind die am häufigsten bzw. zweithäufigsten in der kaukasischen Bevölkerung identifizierten Allele

(Bashirova et al., 2001). Zusätzlich wurde eine Transkript amplifiziert, das keine Sequenz für die Transmembrandomäne enthält und somit eine lösliche Form von L-SIGN darstellt. Lösliche und membranständige Formen von L-SIGN entstehen durch alternatives Splicing (Mummidi et al., 2001). Weitere Heterogenität wird erreicht, indem L-SIGN sowie DC-SIGN Homo- und Heterotetramere bilden (Mitchell et al., 2001). Durch Expression dieser großen Anzahl verschiedener löslicher und membranständiger Isoformen der beiden Proteine, entstehen Variationen in den gebildeten L-SIGN und DC-SIGN Tetrameren, die sich von Mensch zu Mensch unterscheiden und somit z.B. eine große Rolle in der Pathogenese der HIV-Infektion spielen können oder in der Ausbildung der komplexen Interaktion von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) mit T-Zellen, der sogenannten immunologischen Synapse (Anton van der Merwe et al., 2000; Mummidi et al., 2001; Steinman, 2000). Obwohl in mit L-SIGN transfizierten Tumorzelllinien kein Unterschied zwischen L-SIGN6 und L-SIGN7 in der Interaktion mit HIV-1 festgestellt werden konnte (M. Carrington, persönliche Mitteilung), sollten Versuchsergebnisse aufgrund des Polymorphismus von L-SIGN kritisch betrachtet werden. Der Polymorphismus der Allele für L-SIGN und DC-SIGN in der afrikanischen Bevölkerung, sowie ein möglicher Einfluß der Pathogene, z.B. HIV auf die Evolution der Gene wurde bisher nicht untersucht.

#### 4.2.2 Der endocytotische Rezeptor L-SIGN

L-SIGN besitzt wie sein Homolog DC-SIGN Internalisierungssignale und ist in der Lage Liganden zu binden und in endosomale Kompartimente zu internalisieren.

In der cytoplasmatischen Domäne von DC-SIGN befinden sich folgende Internalisierungs- und Targetingmotive: ein Dileucinmotiv (LL), ein Cluster aus drei aufeinanderfolgenden sauren Aminosäuren (EEE) und ein unvollständiges „Immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (YKSL) das als ITAM bezeichnet wird (Engering et al., 2002). Im Vergleich zu DC-SIGN findet man in der cytoplasmatischen Domäne von L-SIGN das Dileucinmotiv sowie ein Cluster saurer Aminosäuren, das sich jedoch von der Sequenz in DC-SIGN unterscheidet, da es aus zwei Glutaminsäuren und einer Asparaginsäure (EED) besteht. Ein Tyrosin-basiertes Motiv fehlt in L-SIGN (HKSS). Das Tyrosin-basierte Motiv (YXXΦ) ist eine Erkennungssequenz für Adaptorproteine, die am intrazellulären Targeting beteiligt sind (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999). Es scheint für die Internalisierung von DC-SIGN keine Funktion zu besitzen (Engering et al., 2002), in L-SIGN ist es nicht vorhanden. Dileucinmotive sind zuständig für das Targeting in endosomale bzw. lysosomale

Kompartimente (Shen et al., 2000) und es spielt eine wichtige Rolle bei der Internalisierung von DC-SIGN und gebundenen Liganden (Engering et al., 2002). Die drei aufeinanderfolgenden sauren Aminosäuren vermitteln das Targeting in Organellen, die an der Antigenprozessierung und der Beladung der MHC II-Moleküle mit Peptiden beteiligt sind (Mahnke et al., 2000). Obwohl internalisiertes DC-SIGN in diesen Organellen zu finden ist, ist die Funktion dieser drei sauren Aminosäuren noch nicht geklärt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß L-SIGN auf ähnliche Weise wie DC-SIGN internalisiert wird. Alle funktionellen Untersuchungen wurden mit L-SIGN7 durchgeführt, da beschrieben wurde, daß dieses Allel von L-SIGN das häufigste in der kaukasischen Bevölkerung darstellt (Bashirova et al., 2001). L-SIGN7 cDNA wurde mit Hilfe des retroviralen Gentransfers stabil in CHO-K1 Zellen eingebracht und L-SIGN exprimierende Klone mit unterschiedlichen Expressionsleveln generiert. Um die Funktion des Lektins L-SIGN7 bei der Endocytose bestimmen zu können, wurden die Zellen mit fluorochrom-markiertem Dextran inkubiert und die Bindung sowie die Lokalisierung des Substrats in den L-SIGN Transfektanten im Vergleich zu den nicht-transfizierten Kontrollzellen untersucht. Die Internalisierung des Substrats war abhängig von der L-SIGN Expression. Die Spezifität dieser Substrat-Internalisierung konnte nachgewiesen werden, da  $\alpha$ -SIGN spezifische Antikörper die Bindung des Dextrans vollständig inhibierten. Mannan wirkte als kompetitiver Inhibitor. Sowohl  $\alpha$ -SIGN Antikörper als auch Mannan sind in der Lage die Interaktion von DC-SIGN mit HIV-1 zu inhibieren (Geijtenbeek et al., 2000b).

Der Komplex aus L-SIGN und Liganden wurde internalisiert und das Fluorochrom-markierte Dextran war in der Zelle in vesikulären Strukturen, vermutlich in endosomalen Kompartimenten, zu finden. Eine ähnliche subzelluläre Verteilung konnte in der Immunfluoreszenz-Analyse auch für L-SIGN mit  $\alpha$ -SIGN Antikörper nachgewiesen werden, L-SIGN ist auch an der Zelloberfläche zu finden. Für DC-SIGN konnte kürzlich gezeigt werden, daß der Komplex aus DC-SIGN und Liganden in späte Endosomen und Lysosomen transportiert wird. Dort dissoziieren die Liganden und werden degradiert. Es folgt die Antigenprozessierung für die Präsentation auf MHC II-Molekülen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Engering et al., 2002). Es ist nicht bekannt, ob eine DC-SIGN-vermittelte Internalisierung von Antigenen ihre Präsentation auf MHC I-Molekülen ermöglicht (Engering et al., 2002). Rezeptor-vermittelte Endocytose von Dextran-FITC konnte auch für SIGN-R1 nachgewiesen werden, ein SIGN Homolog in der Maus, das auf Makrophagen in den Lymphknoten und der Milz exprimiert wird (Kang et al., 2003).

L-SIGN wird auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber exprimiert und ist sowohl Adhäsionsrezeptor als auch endocytotischer Rezeptor. Wie auch DC-SIGN besitzt L-SIGN die Fähigkeit an ICAM-3 zu binden und dadurch mit T-Zellen zu interagieren (Bashirova et al., 2001; Geijtenbeek et al., 2000c). Zusätzlich ist L-SIGN an der Aufnahme von Antigenen beteiligt. Die Komplexe aus L-SIGN und gebundenen Liganden werden vermutlich für die nachfolgende Antigenprozessierung in endosomale und lysosomale Kompartimente transportiert. Die Antigene werden den T-Zellen auf MHC-Molekülen präsentiert. Da LSEC antigenpräsentierende Zellen sind, die Toleranz von CD4- und CD8-T-Zellen induzieren (Limmer et al., 2000), ist es möglich, daß die L-SIGN-vermittelte Endocytose von Pathogenen oder deren Antigenen zu der Entstehung von Toleranz führt. Die Pathogene könnten dadurch eine Pathogen-spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort umgehen.

#### **4.2.3 L-SIGN interagiert nicht mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten und mit *P. berghei* Sporozoiten**

Eine Funktion von L-SIGN in der Pathogenese der Malaria konnte nicht nachgewiesen werden. Das auf sinusoidalen Leberendothelzellen exprimierte L-SIGN spielt weder eine Rolle in der Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten in der Leber, noch in dem Hepatotropismus der Sporozoiten zu Beginn der Infektion.

Da *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten in der Leber sequestrieren (Miller et al., 2002) und L-SIGN auf sinusoidalen Leberendothelzellen exprimiert ist, wäre eine Interaktion von L-SIGN mit parasitierten Erythrocyten möglich. Die Herstellung der CHO<sup>L-SIGN2</sup> Transfektanten, die funktionelles L-SIGN exprimierten, ermöglichte die Untersuchung dieser Interaktion. Da eine Parasitenpopulation Plasmodien mit unterschiedlichen Bindungsphänotypen enthält, ist eine Selektion auf Parasiten mit bestimmten Adhäsionseigenschaften erforderlich. Parasitierte Erythrocyten, die mit dem *P. falciparum*-Klon FCR3 infiziert waren, ließen sich jedoch nicht auf einen L-SIGN-spezifischen Adhäsionsphänotyp selektionieren, obwohl FCR3 für seine Bindungsfähigkeit an die unterschiedlichsten Rezeptoren bekannt ist (Scherf et al., 1998). Es ist nicht auszuschließen, daß Plasmodien anderer Isolate und Herkunft die Fähigkeit besitzen mit L-SIGN zu interagieren, da Parasiten mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund ein nur minimal überlappendes *var* Genrepertoire besitzen (Freitas-Junior et al., 2000). Cytoadhäsionsstudien müssten mit Plasmodien anderer Laborstämme sowie mit Feldisolaten durchgeführt werden,

um die Interaktion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten mit L-SIGN ausschließen zu können.

Den ersten Schritt einer Infektion mit *Plasmodium spp.* stellt jedoch die Invasion der Hepatocyten und die anschließende ungeschlechtliche Vermehrung in den Hepatocyten dar. Die Erkennung der Leber durch die Sporozoiten und die Invasion der Hepatocyten sind sehr effiziente und schnelle Vorgänge. Da die sinusoidalen Leberendothelzellen eine Barriere zwischen Hepatocyten und Blutstrom bilden (Limmer et al., 1998), könnte eine Interaktion von *Plasmodium*-Sporozoiten und L-SIGN ein Austreten der Parasiten aus dem Blutstrom in der Leber und nachfolgende Passage zu den Hepatocyten ermöglichen. Inkubation von CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen mit Sporozoiten des Mausemalariaerregers *P. berghei* zeigte weder eine verstärkte Adhäsion noch eine erhöhte Invasion im Vergleich zu den Kontrollexperimenten mit nicht-transfizierten CHO Zellen. Obwohl die Aussage dieser Daten eingeschränkt ist, da die Interaktion der Sporozoiten des Mausemalariaerregers *P. berghei* mit dem humanen L-SIGN untersucht wurde, lässt die große Homologie der humanen und murinen SIGN Proteine durchaus Interpretationen zu. Außerdem ist *P. berghei* ein etabliertes Modellsystem zur Untersuchung von Adhäsion und Invasion in der Leber, da *P. berghei* in der Lage ist *in vitro* in viele verschiedene Zelllinien einzudringen, u.a. in humane HepG2 (Hollingdale et al., 1983) und CHO Zellen (Frevort et al., 1996).

Da L-SIGN und DC-SIGN eine Rolle im Infektionsprozeß verschiedener Pathogene spielen, ist es bemerkenswert, daß *Plasmodium spp.*, eines der wichtigsten Pathogene, das im Blutstrom zirkuliert, nicht mit einem Endothel-spezifischen Pattern-Recognition-Rezeptor interagiert. Erklärt werden könnte dies durch die Tatsache, daß die Bindung durch L-SIGN und DC-SIGN eine Glykosylierung der Liganden, vorzugsweise mit Mannose-reichen Oligosacchariden, erfordert (Feinberg et al., 2001). Interaktionen der meisten Pathogene mit L-SIGN bzw. DC-SIGN erfolgen über Zuckerstrukturen der Pathogene. So konnten Applemelk et al. (Applemelk et al., 2003) zeigen, daß *Helicobacter pylori*, *Leishmania mexicana*, *Schistosoma mansoni* und *Mycobacterium tuberculosis* über glykosylierte Oberflächenmoleküle mit DC-SIGN interagieren.

Erythrocytäre Stadien von *P. falciparum* besitzen jedoch nur ein geringes Vermögen zur N-Glykosylierung und O-Glykosylierung fehlt oder ist in diesem Parasiten nur in geringem Maße zu finden (Gowda and Davidson, 1999). *Plasmodium*-Sporozoiten und Merozoiten besitzen keine N- und O-glykosylierten Proteine (Davidson and Gowda, 2001). Aufgrund der fehlenden N- und O-Glykosylierung der Proteine von *Plasmodium spp.* ist eine Interaktion der parasitierten Erythrocyten als auch der Sporozoiten mit L-SIGN nicht sehr wahrscheinlich,

obwohl auch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit DC-SIGN stattfinden können, wie z.B. für das HIV-1 gp120 gezeigt werden konnte (Geijtenbeek et al., 2002).

Glykosylierung findet man in *Plasmodium spp.* vor allem in Form von Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankern, die die meisten, wenn nicht alle Oberflächenproteine der Parasiten stabilisieren (Braun Breton et al., 1990; Gowda et al., 1997). Die GPI-Anker der Plasmodien unterscheiden sich von denen der Mammalia, da sie einen vierten Mannosylrest enthalten und andere Fettsäuren an das Phosphatidylinositol angehängt haben (Davidson and Gowda, 2001). Menschen in Malariaendemiegebieten sind in der Lage Antikörper gegen die GPI-Anker der Parasiten auszubilden (Naik et al., 2000). Nicht auszuschließen ist, daß L-SIGN mit GPI-Ankern der Plasmodien interagieren kann, da L-SIGN wie auch der Mannoserezeptor zur Elimination mannosylierter Liganden aus dem Serum beiträgt (Engering et al., 2002). Allerdings bindet der Mannoserezeptor einzelne Mannosereste, für die Interaktion mit L-SIGN und DC-SIGN sind komplexe Mannose-haltige Strukturen erforderlich (Engering et al., 2002; Feinberg et al., 2001). Eine Interaktion der Malaria-GPI-Anker mit L-SIGN müsste untersucht werden. Erst kürzlich konnte jedoch *in vitro* eine Interaktion von *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit dem Mannose-Binding Lektin (MBL), das an Mannose- und N-Acetylglucosamin-reiche Oligosaccharide bindet, nachgewiesen werden (Garred et al., 2003). Der zugrunde liegende Mechanismus sowie die Funktion in der Pathogenese der Malaria bleibt ungeklärt.

Diese Ergebnisse lassen die Aussage zu, daß der Oberflächenrezeptor L-SIGN die Endocytose von Liganden vermittelt, was vermutlich zu der Präsentation von Antigenen auf MHC-Molekülen an T-Lymphocyten führt. Fehlende Bindung von *P. falciparum* an L-SIGN könnte verhindern, daß Antigene der Parasiten in sinusoidale Leberendothelzellen gelangen, die gute antigenpräsentierende Zellen sind und Toleranz von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen induzieren (Limmer et al., 2000). Indem die LSEC-vermittelte Präsentation von Antigenen umgangen wird, hat das Immunsystem die Möglichkeit eine Parasiten-spezifische T-Zell-Immunreaktivität aufrechtzuerhalten.

### 4.3 Charakterisierung der Interaktion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten mit CHO-745 Zellen

CHO-K1 und CHO-745 Zellen besitzen mindestens einen weiteren bisher uncharakterisierten Adhäsionsrezeptor für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten. *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten, die auf Chondroitinase ABC-behandelten CHO<sup>L-SIGN2</sup> Zellen und in Anwesenheit von löslichem CSA selektioniert wurden, zeigten weder eine CSA-spezifische (ohne Abbildung) noch eine L-SIGN-spezifische Cytoadhäsion. Allerdings hatten sie die Fähigkeit erworben in großer Anzahl an CHO-745 Zellen zu adhären. Ähnliche Beobachtungen wurden auch unter anderen Versuchsbedingungen gemacht (K. Andrews, persönliche Mitteilung). CHO-K1 Zellen exprimieren CSA auf der Zelloberfläche (Rogerson et al., 1995), wohingegen CHO-745 Zellen aufgrund einer Mutation in der Xyloysl-Transferase keine Proteoglykane wie z.B. CSA oder Heparansulfat synthetisieren (Esko et al., 1987; Franco et al., 2001). Alle bisher identifizierten Adhäsionsrezeptoren für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten sind auf CHO-745 Zellen nicht exprimiert.

In früheren Studien wurden sowohl CHO-K1 Zellen als auch CHO-745 Zellen mit unterschiedlichen humanen Zelloberflächenrezeptoren wie z.B. CD36 und ICAM-1 transfiziert (Hasler et al., 1993), um die strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Rezeptoren für die Cytoadhäsion parasitierter Erythrocyten zu untersuchen. Die Interpretation dieser erhaltenen Daten ist jedoch schwierig, da CHO-K1 und CHO-745 Zellen mindestens einen weiteren, bisher uncharakterisierten Adhäsionsrezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren. Aus diesem Grund ist die Verwendung der CHO Zellen in Transfektions- und Cytoadhäsionsstudien limitiert. Geeigneter für diese Studien wären Zelllinien, die außer CSA keinen weiteren Adhäsionsrezeptor exprimieren, z.B. Saimiri brain endothelial cells (Sc1707) (Gay et al., 1995) oder eine humane Schwannomazelllinie (HMS-97) (Andrews et al., 2003b). Allerdings war es aufgrund der langsamen Wachstumsrate der Sc1707 Zellen nicht möglich L-SIGN7 stabil in diesen Zellen zu exprimieren. Alle bisher charakterisierten Adhäsionsrezeptoren für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten sind auf CHO-745 Zellen nicht exprimiert (ohne Abbildung).

Um die Interaktionen *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten mit CHO-745 Zellen charakterisieren zu können, wurden parasitierte Erythrocyten, die mit den *P. falciparum*-Klonen FCR3 bzw. 3D7 infiziert waren, mehrfach auf CHO-745 Zellen selektioniert. *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten lassen sich gut auf eine Bindung an CHO-745 Zellen

anreichern. Parasitierte Erythrocyten der beiden selektierten Populationen FCR3<sup>745</sup> und 3D7<sup>745</sup> konnten im Gegensatz zu den unselektierten Parasiten sowohl an CHO-K1 als auch an CHO-745 Zellen cytoadhärieren. Eine Ausnahme sind unselektierte FCR3-infizierte Erythrocyten. Sie besitzen einen CSA-spezifischen Bindungsphänotyp und können deshalb an CHO-K1 Zellen adhären, nicht aber an CHO-745 Zellen. Diese Parasiten wurden vor längerer Zeit auf CSA selektiert, danach jedoch kontinuierlich in Kultur gehalten. Parasitierte Erythrocyten des Stammes FCR3<sup>CSA</sup>, die auf CHO-K1 Zellen auf einen CSA-spezifischem Adhäsionsphänotyp selektiert wurden, wurden als Kontrolle verwendet (Andrews et al., 2003b). Interessanterweise können parasitierte Erythrocyten, die mit FCR3<sup>CSA</sup> infiziert waren, nicht an CHO-745 Zellen cytoadhärieren. Es scheint, daß die Expression von CSA auf der Zelloberfläche die Bindung der parasitierten Erythrocyten an den uncharakterisierten Rezeptor sterisch behindert oder daß die Affinität der Bindung an CSA so hoch ist, daß andere Bindungen nicht zugelassen werden.

### 4.3.1 Ansätze zur Charakterisierung des Adhäsionsrezeptors auf CHO-745 Zellen

Aufschluß über die Natur eines Adhäsionsrezeptors kann man erhalten, indem man verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit testet, die Interaktion von *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten mit CHO-745 Zellen zu inhibieren. In den durchgeführten Versuchen war keine der Substanzen in der Lage die Interaktion von FCR3<sup>745</sup>- oder 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten mit CHO-745 Zellen zu inhibieren. Um die Cytoadhäsion an CSA zu verhindern, wurden die CHO Zellen entweder mit Chondroitinase ABC vorbehandelt oder es wurde lösliches CSA als kompetitiver Inhibitor zu der Bindungsreaktion zugegeben (Andrews et al., 2003a). Heparin ist ein löslicher kompetitiver Inhibitor, der die Bindung an Heparin und Heparansulfat unterbindet (Barragan et al., 2000; Chen et al., 2000). Neuraminidase entfernt enzymatisch die Sialinsäurereste der zellulären Oberflächenmoleküle. Ein  $\alpha_v\beta_5$ -Intergrin-spezifischer Antikörper wurde auf Adhäsion-blockierende Fähigkeiten überprüft, da dieses Integrin auf CHO Zellen exprimiert ist. Im Gegensatz dazu konnte das  $\alpha_v\beta_3$ -Intergrin, das ein Adhäsionsrezeptor für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten ist (Siano et al., 1998), nicht auf CHO Zellen nachgewiesen werden.

Die Adhäsion der FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten an CHO-745 und CHO-K1 Zellen konnte mit keiner der getesteten Substanzen inhibiert werden. Stattdessen erhöhte eine

Vorbehandlung der Zellen mit Neuraminidase die Adhäsion der FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten an CHO-K1 Zellen, sowie die Adhäsion der FCR3<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten an CHO-745 Zellen. Möglicherweise werden durch die Behandlung der Zellen mit Neuraminidase Epitope freigelegt, die normalerweise verborgen sind, aber an die parasitierte Erythrocyten adhären können. Vermutlich aus dem gleichen Grund wurde die Bindung der FCR3<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten an CHO-745 Zellen, die mit Chondroitinase ABC vorbehandelt wurden, erhöht. Interessanterweise wird die Cytoadhäsion 3D7<sup>745</sup>-infizierter Erythrocyten an CHO-745 Zellen durch Zugabe von löslichem Heparin leicht erhöht. Heparin und Heparansulfat sind Adhäsion-vermittelnde Rezeptoren für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten, die auf den meisten Zellen exprimiert und die vor allem am Rosetting beteiligt sind (Barragan et al., 2000). Es ist möglich, daß 3D7<sup>745</sup>-infizierte Erythrocyten das lösliche Heparin binden können, um über das Heparin als Brückenmolekül mit CHO-745 Zellen zu interagieren. Die Bindung von löslichem Heparin bzw. Heparansulfat an die Oberfläche *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten wurde beschrieben (Vogt et al., 2003). Da es die Bindung 3D7<sup>745</sup>-infizierte Erythrocyten verstärkt, sollte die Bindung an Heparin eine zusätzliche und nicht die hauptsächliche Bindung darstellen, da sonst die Cytoadhäsion inhibiert werden würde.

Da eine Vorinkubation der Zellen mit  $\alpha$ - $\alpha_v\beta_5$ -Integrin Antikörpern keinen Unterschied in der Adhäsion infizierter Erythrocyten im Vergleich zu den Kontrollen ergab, kann daraus geschlossen werden, daß das auf CHO Zellen exprimierte  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin kein Adhäsionsrezeptor für *P. falciparum*-infizierte Erythrocyten ist. Die Bindung der FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten ist nicht Chondroitinsulfat-spezifisch, da weder lösliches CSA noch die Vorbehandlung der CHO Zellen mit Chondroitinase ABC die Adhäsion inhibiert.

Als Kontrolle wurde die Adhäsion der FCR3<sup>CSA</sup>-infizierten Erythrocyten, die einen CSA-spezifischen Bindungsphänotyp besitzen, untersucht. Wie erwartet inhibierten sowohl das lösliche CSA als auch die Vorbehandlung der Zellen mit Chondroitinase ABC die Cytoadhäsion der FCR3<sup>CSA</sup>-infizierten Erythrocyten an CHO-K1 Zellen (Robert et al., 1995). Auch Zugabe von Heparin zu der Bindungsreaktion verhinderte die Adhäsion der FCR3<sup>CSA</sup>-infizierten Erythrocyten (Vogt et al., 2003). Vorbehandlung der CHO Zellen mit Neuraminidase sowie mit  $\alpha$ - $\alpha_v\beta_5$ -Integrin Antikörpern hatte keinen Einfluß auf die Cytoadhäsion. Es konnte keine Adhäsion an CHO-745 Zellen, die kein CSA exprimieren, nachgewiesen werden.

Zusammenfassend bestätigen diese Daten, daß die selektionierten Parasitenpopulationen FCR3<sup>745</sup> und 3D7<sup>745</sup> einen CSA-unabhängigen Adhäsionsphänotyp besitzen. Eine Aussage über den Adhäsionsrezeptor auf CHO Zellen kann nicht gemacht werden.

Eine weitere Methode mit der Adhäsionsrezeptoren identifiziert werden können ist der Zell-Overlay oder das Cell-Blotting (O'Sullivan et al., 1997; Seshi, 1994). Dabei werden Proteinextrakte der Zellen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und in diesem Fall mit intakten radioaktiv-markierten *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten detektiert.

In der Literatur sind vielfältige Abwandlungen der Overlay-Techniken beschrieben. Zur Detektion der auf die Membranen transferierten Proteine werden z.B. Viren (Bass et al., 1991; Gershoni et al., 1986), Bakterien (Prakobphol et al., 1987), Zellen (Seshi, 1994) und Lektine (De Maio et al., 1986; Virtanen et al., 1984) verwendet. Es ist zwar möglich, daß Proteine bei dem Transfer auf die Membran renaturieren und so ihre Bindungsfähigkeit wiedererlangen (Seshi, 1994), trotzdem ist diese Technik am besten geeignet, um Zuckerstrukturen zu detektieren. Membranen können außerdem vor der Detektion mit Enzymen, z.B. Glykosidasen behandelt werden, um Aufschluß über die Natur eines Adhäsionsrezeptors zu erhalten (Bass et al., 1991; De Maio et al., 1986).

Da viele Interaktionen der *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten über Zuckerstrukturen der Adhäsionsrezeptoren auf den Wirtszellen erfolgen, z.B. CSA (Robert et al., 1995; Rogerson et al., 1995), Heparansulfat (Carlson et al., 1992), Blutgruppenantigene A und B (Carlson and Wahlgren, 1992), wäre es denkbar, daß der Zell-Overlay ein wichtige Methode zur Charakterisierung dieser Interaktionen darstellen könnte. Parasitierte Erythrocyten detektieren im Zell-Overlay ein 100 kDa-Protein in den Zellextrakten. Allerdings sind sowohl FCR3<sup>745</sup>- und 3D7<sup>745</sup>-infizierten Erythrocyten als auch FCR3<sup>CSA</sup>-infizierten Erythrocyten in der Lage an dieses Protein zu adhären, das zusätzlich in Proteinextrakten von CHO-K1, CHO-745 sowie in HLEC Zellen zu finden ist. Eine Aussage über die Bindung nicht-infizierte Erythrocyten ist schwierig, da es aufgrund des geringen Stoffwechsels nicht möglich ist die Erythrocyten metabolisch zu markieren. Um zu untersuchen ob das 100 kDa-Protein ein Transmembranprotein ist, wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt und die Proteine aus der Membranfraktion sowie die löslichen Proteine untersucht. Parasitierte Erythrocyten konnten das 100 kDa-Protein nur in der Fraktion mit den löslichen Proteinen detektieren, d.h. es ist entweder ein peripheres Membranprotein, das sich leicht von der Membran ablöst oder es ist z.B. ein cytoplasmatisches oder luminales Protein. Alle Daten zusammen lassen es

jedoch unwahrscheinlich erscheinen, daß das 100 kDa-Protein der gesuchte Adhäsionsrezeptor auf CHO Zellen ist. Außerdem besitzen die Parasiten, die auf CHO-745 Zellen selektioniert wurden einen anderen Bindungsphänotyp als die FCR3<sup>CSA</sup>-infizierten Erythrocyten, die an CSA adhäreren. Im Zell-Overlay detektieren sie das gleiche Protein, was nur umständlich dadurch zu erklären wäre, daß dieses Epitop an der Zelloberfläche verborgen wäre.

Die Identifizierung des Adhäsionsrezeptors auf den CHO Zellen muß auf andere Weise erfolgen. Eine weitere Möglichkeit ist die Analyse der transkribierten *var* Gene der Parasitenpopulationen FCR3<sup>745</sup> und 3D7<sup>745</sup>. Sind die transkribierten *var* Gene einer Parasitenpopulation bekannt, können die unterschiedlichen PfEMP-1 Domänen in heterologen Systemen exprimiert werden. Eine Analyse auf ihre Bindungsfähigkeit an CHO-745 Zellen ermöglicht eine weitere Charakterisierung des Adhäsionsrezeptors. Diese Methode wird verwendet, um die Domänen eines PfEMP-1 Moleküls zu identifizieren, die an der Adhäsion an einen bestimmten Wirtsrezeptor beteiligt sind (Chen et al., 2000; Flick et al., 2001), kann jedoch auch zur Identifizierung des Wirtsrezeptors eingesetzt werden. Allerdings setzt dies voraus, daß die Interaktion über PfEMP-1 erfolgt, wobei auch andere Proteine der Parasiten, die in der Erythrocytenmembran lokalisiert sind, in Betracht gezogen werden müssen, z.B. RIFINS (Fernandez et al., 1999; Helmbly et al., 1993; Kyes et al., 1999).

### **4.3.2 Analyse der transkribierten *var* Gene in den Parasitenpopulationen 3D7<sup>745</sup> und FCR3<sup>745</sup>**

Um Informationen über die potentiellen Bindungseigenschaften einer Parasitenpopulation zu erhalten, werden die transkribierten *var* Gene der Population üblicherweise mittels RT-PCR und Northern Blot-Analyse untersucht (Kyes et al., 2000; Taylor et al., 2000).

Untersuchungen des Zeitpunktes der *var* Gen Transkription sowie der Anzahl der transkribierten *var* Gene in einem einzigen Parasiten führte zu gegensätzlichen Ergebnissen. Nuclear Run-on Daten zeigen, daß Parasiten mit einem speziellen Bindungsphänotyp im Trophozoitenstadium nur ein einziges *var* Gen transkribieren (Scherf et al., 1998). Reverse Transkriptase-PCR Experimente auf einzelne Zellen identifizierten Transkripte von mehreren *var* Genen in Parasiten im frühen Ringstadium, aber nur ein einziges Transkript in Trophozoiten (Chen et al., 1998). Im Gegensatz dazu identifizierten andere Einzelzell-RT-PCR Experimente mehrere Transkripte in Trophozoiten, was auf eine Transkription mehrerer *var* Gene in diesem Stadium schließen ließe (Duffy et al., 2002).

Allerdings lassen sich vollständige *var* Transkripte in der Northern Blot-Analyse nur in Parasiten im Ringstadium, d.h. 3-18 h nach der Invasion detektieren (Kyes et al., 2000) (Smith et al., 1998). Die Präsenz dieser Transkripte zu diesem Zeitpunkt lässt sich gut mit dem Auftreten der PfEMP-1 bedingten Cytoadhäsion korrelieren, die ungefähr 16 h nach der Invasion beginnt (Gardner et al., 1996). Da im RNA Blot nur ein einziges stabiles *var* Transkript detektiert werden kann, wird vermutet, daß die meisten *var* Gene in frühen Ringstadien nur in geringen Mengen und nur transient transkribiert werden, da sie möglicherweise verkürzt oder instabil sind (Taylor et al., 2000). Die unterschiedlichen Ergebnisse der RT-PCR Experimente und der Northern Blot-Analysen lassen sich auch durch die deutlich höhere Sensitivität der RT-PCR erklären. Um aussagekräftige Ergebnisse über die *var* Transkripte der Parasiten zu erhalten, sollten Parasitenpopulationen immer mit Hilfe beider Methoden analysiert werden.

Für die Parasitenpopulation 3D7<sup>745</sup> konnten in Trophozoiten mittels RT-PCR, anschließender Klonierung der Produkte, sowie Analyse der Klone, vier verschiedene DBL1 $\alpha$  Domänen (3D7-tag A-D) identifiziert werden. Homologe Gene für alle vier DBL1 $\alpha$  Domänen wurden in der Datenbank PlasmoDB (Bahl et al., 2003), die das gesamte Genom des *P. falciparum* Klons 3D7 enthält, gefunden. Für die tags B-D wurde jeweils ein *var* Gen identifiziert, für tag A zwei. Sowohl die identifizierten *var* Gene für tag A, tag B (PFL1960w) als auch für tag D (PF10\_0001) weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf. Die beiden zu tag A zugehörigen *var* Gene (PFD0995c, PFD1000c) sind auf Chromosom 4 lokalisiert und besitzen identische DNA-Sequenzen für die DBL1 $\alpha$  und CIDR1 Domänen. Die 3'-Bereiche der Gene unterscheiden sich deutlich. Diese identische Struktur im 5'-Bereich der beiden Gene lässt vermuten, daß sie durch Duplikation und/oder ektopische Rekombination entstanden sind (Freitas-Junior et al., 2000). Dabei findet die Rekombination zwischen subtelomerischen Regionen heterologer Chromosomen statt, die in Clustern nahe der Peripherie des Nucleus organisiert sind.

Um die vollständig transkribierten *var* Gene in der Parasitenpopulation 3D7<sup>745</sup> bestimmen zu können, wurden Northern Blot-Analysen auf RNA von Parasiten im Ringstadium durchgeführt. Der Blot wurde mit Sonden, die spezifisch für 3D7-tag A-D sowie für Exon II und MSP-1 hybridisiert. Sowohl die für die DBL1 $\alpha$  Domänen von tagA als auch die für tag B und D spezifischen Sonden detektierten ein Transkript von ~11 kb Größe. Dieses *var* Transkript wurde vollständig transkribiert, da eine 3D7 Exon II-spezifische Sonde eine RNA der gleichen Größe detektierte.

Es ist möglich, daß die Cytoadhäsion an einen bestimmten Rezeptor bzw. an eine Wirtszelle von verschiedenen PfEMP-1 Molekülen vermittelt wird. In diesem Fall würde eine Parasitenpopulation mehrere *var* Gene vollständig transkribieren. Um zu unterscheiden, ob in der Parasitenpopulation 3D7<sup>745</sup> mehrere vollständige stabile RNAs der gleichen Größe transkribiert wurden oder ob die Sonden aufgrund der großen Homologie der DBL1 $\alpha$  Domänen kreuzreagierten, wurden für die zu tag A und D zugehörigen Gene jeweils eine weitere Sonde hergestellt. Auch diese beiden Sonden detektierten das 11 kb-Transkript. Allerdings lieferten sowohl die spezifischen Sonden für tag A als auch für tag A2 die stärkeren Signale im Vergleich zu den Sonden für die anderen tags. Dieses Ergebnis lässt vermuten, daß das Gen PFD0995c bzw. PFD1000c in dieser Parasitenpopulation am häufigsten transkribiert wird. Aufgrund dieser Experimente ist es nicht möglich, zu unterscheiden ob es sich um mehrere Transkripte oder um eine Kreuzreaktion der verschiedenen Sonden mit einer einzigen Transkriptvariante handelt. Aufgrund der hohen Homologie der einzelnen Bereiche der vier verschiedenen *var* Gene ist es schwierig eine Sonde herzustellen, die Kreuzreaktionen mit den jeweils anderen Transkripten ausschließt. Allerdings kann nur so eine Aussage gemacht werden.

Obwohl 3D7-tag C der häufigste mittels RT-PCR Analyse detektierte Klon in der Parasitenpopulation 3D7<sup>745</sup> war, konnte für tag C in Gesamt-RNA von Ringstadium-Parasiten in der Northern Blot-Analyse kein stabiles RNA-Transkript detektiert werden. Dieses Ergebnis wurde durch kürzlich veröffentlichte Daten bestätigt. Durch Datenbanksuche in PlasmoDB konnte eine Sequenz auf Chromosom 5 (PFE1640w) identifiziert werden, die in dem homologen Bereich 100% Identität zu der DNA-Sequenz von tag C aufweist (Gardner et al., 2002; Hall et al., 2002). Diese Sequenz wird in der Datenbank als verkürztes Pseudogen für PfEMP-1 beschrieben, da es eine verkürzte DBL7 $\epsilon$ -Domäne, kein regulatorisches Intron und keine Exon II-Sequenz besitzt (Salanti et al., 2003; Vazquez-Macias et al., 2002). Aufgrund der großen Homologie zu FCR3*var*CSA (Scherf et al., 1998) wird es auch als 3D7 *var*1 Homolog (Salanti et al., 2003), als 3D7*var*CSA (Rowe et al., 2002), als 3D7*chr5var* (Khattab et al., 2003) oder als *var*<sub>COMMON</sub> (Winter et al., 2003) bezeichnet. Das von Winter et al. (2003) (Winter et al., 2003) kürzlich beschriebene *var*<sub>COMMON</sub> Gen (*var*5.2) ist das in RT-PCR Experimenten mit degenerierten DBL1 $\alpha$ -Primern (Taylor et al., 2000) hauptsächlich amplifizierte *var*-Transkript in Trophozoiten eines 3D7-Klons. Das zugehörige Protein *var*<sub>COMMON</sub> PfEMP-1 konnte nicht auf der Oberfläche *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten nachgewiesen werden. Es scheint als würde die Transkription dieser verkürzten *var* Gene nicht den gleichen strengen Kontrollmechanismen unterliegen wie sie für andere *var* Gene

gefunden wurden, da diese verkürzten *var* Genen kein Intron und keine Exon II Domäne besitzen. Kontrollelemente die erforderlich sind um die Transkription eines bestimmten *var* Gens zu unterdrücken sind im *var* Intron lokalisiert. Die konstitutive Expression von *var*<sub>COMMON</sub> und verwandter Gene lässt sich auf das Fehlen des Introns zurückführen (Winter et al., 2003).

Problematisch ist auch die Verwendung der degenerierten Primer  $\alpha$ AF und  $\alpha$ BR zur Amplifikation der DBL1 $\alpha$  Domänen der *var* Gene für die Analyse der Transkripte mittels RT-PCR, da es *var* Gene gibt, die keine DBL1 $\alpha$  Domäne besitzen und somit mit Hilfe dieser Primer nicht detektiert werden können, so z.B. *3D7var2csa* (Salanti et al., 2003).

Für die Parasitenpopulation FCR3<sup>745</sup> konnten in Trophozoiten mittels RT-PCR drei verschiedene DBL1 $\alpha$  Domänen identifiziert werden. FCR3-tag 1 war der häufigste Klon. Für alle drei identifizierten DBL1 $\alpha$  Domänen konnten homologe DBL1 $\alpha$  Domänen in der NCBI-Datenbank ermittelt werden. Tag 1 weist Homologie zu FCR3S1.2*var*11 (AF039283) auf, tag 42 besitzt Homologie zu A4AFBR6 (AJ319684). tag 53 ist zu 100% homolog zu der DBL1 $\alpha$  Domäne von FCR3*var*CSA (Buffet et al., 1999). Die DBL1 $\alpha$  Domänen von tag 1 und 42 sind in großen Bereichen homolog, unterscheiden sich jedoch deutlicher von der DBL1 $\alpha$  Domäne von FCR3*var*CSA.

Das hauptsächlich transkribierte *var* Gen in der Parasitenpopulation FCR3<sup>745</sup> wurde mittels Northern Blot-Analyse bestimmt. Nur die Sonde, die spezifisch für die DBL1 $\alpha$  Domäne von FCR3-tag 1 war, detektierte ein ~11-12 kb großes Transkript. Sowohl die Sonden, die spezifisch für die FCR3-tags 42 und 53 als auch die FCR3 Exon II-Sonde detektierten kein *var* Transkript. Es ist möglich, daß die FCR3 Exon II-Sonde nicht mit einem *var* Transkript hybridisiert, obwohl es eine Exon II Sequenz besitzt. Obwohl die Exon II Sequenzen der unterschiedlichen *var* Gene semi-konserviert sind (Rubio et al., 1996), können nicht alle Exon II Domänen der *var* Gene mit den gleichen Primern amplifiziert werden (Kyes et al., 2003; Rowe et al., 1997). Da sich die Exon II Domänen der *var* Gene mehr als zunächst angenommen wurde unterscheiden, ist es möglich, daß die „gemischte“ FCR3 Exon II-Sonde keine spezifische Sonde für das mit FCR3-tag 1 detektierte *var* Transkript enthält und keine der anderen Sonden kreuzreagieren kann. Zusätzlich sind Exon II-spezifische Sonden oft weniger sensitiv, da sie eine Mischung verschiedener Sonden enthalten. Dadurch ist es möglich, daß aufgrund der zu geringen Sensitivität kein Transkript in der Northern Blot-Analyse detektiert wird. Obwohl die tag 42-spezifische Sonde kein *var* Transkript detektierte,

ist es nicht auszuschließen, daß diese *var* Transkripte in der Population in geringer, nicht detektierbarer Menge vorhanden sind oder die Transkripte nicht stabil sind. FCR3-tag 53 ist spezifisch für die DBL1 $\alpha$  Domäne von FCR3*var*CSA. FCR3*var*CSA besitzt mit 0,23 kb ein ungewöhnlich kleines Intron (Buffet et al., 1999), das nicht in der Lage zu sein scheint, die Transkription des Gens zu unterdrücken. Dieses konservierte *var* Gen zeigt dadurch ein ungewöhnliches Stadien-spezifisches Transkriptionsmuster und wird vermutlich in vielen Parasitenpopulationen in der zweiten Hälfte des Lebenszyklus unabhängig vom Bindungsphänotyp transkribiert (Kyes et al., 2003). Ein Signal im Northern Blot mit RNA aus Ringstadien ist nicht zu erwarten.

Für die Parasitenpopulation FCR3<sup>745</sup> korrelieren die RT-PCR Ergebnisse und die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse, d.h. die häufigste mittels RT-PCR identifizierte DBL1 $\alpha$  Domäne (FCR3-tag 1) hybridisierte mit einem ~11-12 kb großem Transkript im Northern Blot. Die in der Literatur gemachten Aussagen, daß ein einziger Parasit nur eine begrenzte Anzahl, wahrscheinlich nur eine *var* Gen-Variante aus dem ganzen Repertoire zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribiert und somit exprimiert (Scherf et al., 1998), scheint hier zuzutreffen. Da verschiedene PfEMP-1 Moleküle unterschiedliche Rezeptorspezifitäten besitzen, führt ein klonaler Wechsel zwischen *var* Genen zu der Expression zahlreicher PfEMP-1 Moleküle in gegenseitig ausschließender Weise (Chen et al., 1998; Scherf et al., 1998). Dies erlaubt dem Parasiten seine Adhäsionseigenschaften zu modifizieren (Smith et al., 1995) und erhöht die Überlebenschancen des Parasiten im Wirt.

Werden diese Daten zusammengefasst, wird deutlich, daß CHO Zellen einen weiteren, bisher uncharakterisierten Cytoadhäsion-vermittelnden Rezeptor exprimieren. Erythrocyten, die mit den *P. falciparum*-Klonen FCR3 und 3D7 infiziert waren, ließen sich auf einen CHO-745 spezifischen Bindungsphänotyp selektionieren (3D7<sup>745</sup> und FCR3<sup>745</sup>). Diese Cytoadhäsion wurde von keinem bekannten *P. falciparum*-Adhäsionsrezeptor vermittelt und konnte durch Verwendung verschiedener inhibitorischer Substanzen nicht charakterisiert werden. In einem Zell-Overlay wurde ein 100 kDa Protein als möglicher Rezeptor identifiziert, weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um zu klären ob dieses Protein der Ligand für die Adhäsion infizierter Erythrocyten an CHO-745 Zellen ist. Eine Charakterisierung der PfEMP-1 codierenden Transkripte (*var*) in diesen Parasitenpopulationen lieferten vier stabile vollständige *var* Transkripte für den *P. falciparum* Klon 3D7 und ein stabiles vollständiges *var* Transkript für FCR3. Dies lässt darauf schließen, daß die Interaktion parasitierter Erythrocyten mit den CHO-745 Zellen durch PfEMP-1 vermittelt wird.

## 5 Zusammenfassung

Während einer Infektion mit dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* treten oft schwerwiegende Komplikationen auf, da parasitierte Erythrocyten an Endothelzellen adhären und in der Mikrovaskulatur akkumulieren. Cytoadhäsion wird vermittelt durch die Interaktion von *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP-1) auf der Oberfläche der Erythrocyten mit Wirtsrezeptoren auf den Endothelzellen. Die Expression einiger Adhäsionsrezeptoren des Wirts u.a. von ICAM-1 und VCAM-1 erfolgt nur in einer entzündlichen Umgebung und erfordert eine Aktivierung der Endothelzellen.

In einem *in vitro*-Modellsystem konnte die Aktivierung primärer humaner Endothelzellen durch direkte Interaktion mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten nachgewiesen werden, lösliche Mediatoren sind für eine Aktivierung nicht ausreichend. Die Fähigkeit zur Stimulation der Endothelzellen ist abhängig von der Parasitämie, der Parasitenanzahl und der Expositionsdauer, jedoch unabhängig vom Adhäsionsphänotyp der Plasmodien. Die Endothelzellen reagieren auf den Stimulus mit einer veränderten Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene, wie durch Microarray-Analysen gezeigt werden konnte. Es entsteht ein proadhäsiver Phänotyp der Endothelzellen, der u.a. durch die verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und CD44, sowie durch die Sekretion der Cytokine und Chemokine MIP-3 $\alpha$ , IL-8, MCP-1 und IL-6 gekennzeichnet ist. Somit kann eine Aktivierung der Endothelzellen durch Kontakt mit *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten erfolgen, ohne daß eine Aktivierung der Makrophagen oder Monocyten vorausgehen muß. Durch die Expression der unterschiedlichen Chemokine durch die stimulierten Endothelzellen könnten Leukocyten angelockt werden, die die Organe infiltrieren und ebenfalls aktiviert werden. Sequestrierung von Monocyten, Makrophagen, Blutplättchen und *P. falciparum*-infizierten Erythrocyten bewirken u.a. den Verschuß der Blutgefäße sowie eine weitere Sekretion von Cytokinen, die zur Entstehung einer komplizierten Malaria beitragen und damit zum Tod des Patienten führen können. Eine verstärkte Sequestrierung *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten, sowie von Leukocyten an die aktivierten Endothelzellen bleibt allerdings zu untersuchen.

Cytoadhäsion-vermittelnde Moleküle auf humanen Endothelzellen konnten bisher nur in einigen Organen identifiziert werden, ein spezifischer Rezeptor auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber wurde bisher noch nicht charakterisiert. Durch initiale Adhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an einen leberspezifischen Rezeptor auf sinusoidalen Endothelzellen könnte die anti-parasitäre Immunantwort so verändert werden, daß die

Plasmodien einen Überlebensvorteil im Wirt erhalten, z.B. durch Entstehung von Immuntoleranz in der Leber. Liver/lymph node specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (L-SIGN), ein Homolog zu dem C-Typ Lektin Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN), wird in der Leber auf sinusoidalen Endothelzellen exprimiert. Der Oberflächenrezeptor L-SIGN vermittelt die Endocytose von mannosehaltigen Liganden, was vermutlich zu der Präsentation von Antigenen auf MHC-Molekülen an T-Lymphocyten führt. Es konnte weder eine L-SIGN-spezifische Invasion der CHO<sup>L-SIGN</sup> Zellen durch *P. berghei* Sporozoiten, noch eine Cytoadhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrocyten an das auf CHO Zellen exprimierte L-SIGN, nachgewiesen werden. Fehlende Bindung der Plasmodien an L-SIGN lässt sich durch das geringe Glykosylierungsvermögen der Plasmodien erklären. Dadurch könnte verhindert werden, daß Antigene der Parasiten in sinusoidalen Leberendothelzellen gelangen, die gute antigenpräsentierende Zellen sind und Toleranz von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen induzieren. Indem die LSEC-vermittelte Präsentation von Antigenen umgangen wird, hat das Immunsystem die Möglichkeit eine Parasiten-spezifische T-Zell-Immunreaktivität aufrechtzuerhalten.

Obwohl eine L-SIGN-spezifische Cytoadhäsion der selektierten *P. falciparum*-Klone nicht nachgewiesen werden konnte, so hatten diese Parasiten die Fähigkeit erworben Chondroitinsulfat-unabhängig an CHO Zellen zu cytoadhäreren. Da CHO-745 Zellen keinen der bisher bekannten Adhäsionsrezeptoren exprimieren, muß noch mindestens ein weiterer Cytoadhäsion-vermittelnder Rezeptor auf CHO Zellen zu finden sein. Erythrocyten, die mit den *P. falciparum*-Klonen FCR3 und 3D7 infiziert waren, ließen sich auf einen CHO-745 spezifischen Bindungsphänotyp selektionieren (3D7<sup>745</sup> und FCR3<sup>745</sup>). Der *P. falciparum*-Adhäsionsrezeptor konnte durch Verwendung verschiedener inhibitorischer Substanzen nicht charakterisiert werden, allerdings wurde in einem Zell-Overlay ein 100 kDa Protein als potentieller Rezeptor identifiziert. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären ob dieses Protein der Ligand für die Adhäsion infizierter Erythrocyten an CHO-745 Zellen ist. Eine Charakterisierung der PfEMP-1 codierenden Transkripte (*var*) in diesen Parasitenpopulationen lieferten vier stabile vollständige *var* Transkripte für den *P. falciparum* Klon 3D7 und ein stabiles vollständiges *var* Transkript für FCR3. Dies lässt darauf schließen, daß die Interaktion parasitierter Erythrocyten mit den CHO-745 Zellen durch PfEMP-1 vermittelt wird.

## 6 Summary

During infection with the human malarial pathogen *Plasmodium falciparum*, severe complications may ensue due to parasitised red blood cells adhering to endothelial cells and accumulating in the microvasculature. Adhesion is mediated by a parasite derived variant antigen expressed on the infected erythrocyte surface, *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP-1*), with host receptors on endothelial cells. The expression of some host adhesion receptors, e.g. ICAM-1 and VCAM-1 only occurs in an inflammatory environment and requires activation of endothelial cells.

The activation of human primary endothelial cells by interaction with *P. falciparum*-infected erythrocytes was shown using an *in vitro* model system. Direct contact of parasitised erythrocytes with endothelial cells is necessary for activation, while soluble factors secreted by the parasite are not sufficient to activate the endothelial cells. The ability to stimulate endothelial cells is independent of the adhesion phenotype of the *Plasmodium* parasites, but dependent on parasitaemia, parasite numbers and time of exposure. The endothelial cells respond to the stimulus with regulation of gene expression at the transcriptional level, as determined by microarray analysis. The result is a proadhesive endothelial phenotype, indicated e.g. by an increased expression of the adhesion molecules ICAM-1 and CD44, as well as of the cytokines and chemokines MIP-3 $\alpha$ , IL-8, MCP-1 and IL-6. The activation of endothelial cells is mediated by interaction with *P. falciparum*-infected erythrocytes and requires no preceding activation of macrophages and monocytes. Expression of various chemokines by the activated endothelial cells may recruit leukocytes, that infiltrate the organs and subsequently will be activated. Sequestration of monocytes, macrophages, platelets and *P. falciparum*-infected erythrocytes may cause the occlusion of the microvessels and induce further secretion of chemokines, which leads to the development of a severe malaria and possibly to the death of the patient. Further investigations are required to determine whether parasitised erythrocytes or leukocytes show an increased sequestration to the activated endothelial cells.

Cytoadhesion mediating molecules on human endothelial cells are only identified in some organs and to date a specific receptor on liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) has not been characterised. Initial adhesion of *P. falciparum*-infected erythrocytes to a liver specific receptor expressed on LSEC might alter the parasite-specific immune response and result in the induction of immune tolerance in the liver. Liver/lymph node specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (L-SIGN), a close homologue to the C-type lectin Dendritic cell specific ICAM-3

grabbing nonintegrin (DC-SIGN), is expressed on sinusoidal endothelial cells in the liver. The cell surface receptor L-SIGN mediates endocytosis of mannosylated ligands, which presumably leads to MHC-restricted presentation to T-lymphocytes. L-SIGN is not involved in the hepatotropism of sporozoites as evidenced by the lack of L-SIGN specific invasion of *P. berghei* sporozoites. Blood stage *P. falciparum*-infected erythrocytes, which undergo adhesive interactions *in vitro* and *in vivo* did not bind to L-SIGN expressing CHO cells, even after repeated rounds of selection. This may be due to the low glycosylation capability of *Plasmodium* parasites. Failure of *P. falciparum* binding to L-SIGN may prevent access of parasite antigens to liver sinusoidal endothelial cells which are potent antigen presenting cells inducing CD4 and CD8 T cell tolerance. Evasion of LSEC-mediated presentation of parasite antigens may thus allow the immune system to maintain a parasite-specific T cell immune reactivity.

Although no L-SIGN specific cytoadhesion of the selected *P. falciparum* clone could be detected, the parasites gained the ability to adhere chondroitinsulfate independent to CHO cells. As CHO-745 cells express none of the known *P. falciparum* adhesion receptors, at least one other, hitherto uncharacterised adhesion receptor must be expressed on their surface. Erythrocytes infected with the laboratory clones FCR3 and 3D7 can be selected for a CHO-745 specific adhesion phenotype (3D7<sup>745</sup> and FCR3<sup>745</sup>). This adhesive phenotype was unable to be characterised using various substances as inhibitors. Using a cell overlay technique a 100 kDa protein was identified, and further studies are currently underway to determine whether this protein is the CHO-745 ligand for infected erythrocyte adhesion. Characterisation of the PfEMP-1 encoding gene transcripts (*var*) expressed in these parasite populations revealed four stable full-length *var* transcripts for *P. falciparum* clone 3D7 and one stable full-length *var* transcript for clone FCR3. These findings suggest a PfEMP-1 mediated interaction of parasitised erythrocytes with CHO-745 cells.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abrams, E.T., Brown, H., Chensue, S.W., Turner, G.D., Tadesse, E., Lema, V.M., Molyneux, M.E., Rochford, R., Meshnick, S.R. and Rogerson, S.J. (2003) Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression. *J Immunol*, **170**, 2759-2764.
- Achur, R.N., Valiyaveetil, M., Alkhalil, A., Ockenhouse, C.F. and Gowda, D.C. (2000) Characterization of proteoglycans of human placenta and identification of unique chondroitin sulfate proteoglycans of the intervillous spaces that mediate the adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the placenta. *J Biol Chem*, **275**, 40344-40356.
- Adams, S., Brown, H. and Turner, G. (2002) Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? *Trends Parasitol*, **18**, 360-366.
- Aikawa, M., Iseki, M., Barnwell, J.W., Taylor, D., Oo, M.M. and Howard, R.J. (1990) The pathology of human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*, **43**, 30-37.
- Albelda, S.M. and Buck, C.A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J*, **4**, 2868-2880.
- Albelda, S.M. and Sheppard, D. (2000) Functional genomics and expression profiling: be there or be square. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **23**, 265-269.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1995) *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- Alvarez, C.P., Lasala, F., Carrillo, J., Muniz, O., Corbi, A.L. and Delgado, R. (2002) C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in *cis* and in *trans*. *J Virol*, **76**, 6841-6844.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., Parker, B.A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G.R. and Wahl, G.M. (1979) Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods Enzymol*, **68**, 220-242.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R. (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5350-5354.
- Andrews, K.T. and Lanzer, M. (2002) Maternal malaria: *Plasmodium falciparum* sequestration in the placenta. *Parasitol Res*, **88**, 715-723.
- Andrews, K.T., Pirrit, L.A., Przyborski, J.M., Sanchez, C.P., Sterkers, Y., Ricken, S., Wickert, H., Lepolard, C., Avril, M., Scherf, A., Gysin, J. and Lanzer, M. (2003a) Recovery of adhesion to chondroitin-4-sulphate in *Plasmodium falciparum* var CSA disruption mutants by antigenically similar PfEMP1 variants. *Mol Microbiol*, **49**, 655-669.
- Andrews, K.T., Viebig, N.K., Wissing, F., Klatt, N., Oster, N., Wickert, H., Knolle, P. and Lanzer, M. (2003b) A human schwannoma cell line supports the in vitro adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate. *Parasitol Res*, **89**, 188-193.
- Anton van der Merwe, P., Davis, S.J., Shaw, A.S. and Dustin, M.L. (2000) Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol*, **12**, 5-21.
- Appelmelk, B.J., Van Die, I., Van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Geijtenbeek, T.B. and Van Kooyk, Y. (2003) Cutting Edge: Carbohydrate Profiling Identifies New Pathogens That Interact with Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells. *J Immunol*, **170**, 1635-1639.
- Bahl, A., Brunk, B., Crabtree, J., Fraunholz, M.J., Gajria, B., Grant, G.R., Ginsburg, H., Gupta, D., Kissinger, J.C., Labo, P., Li, L., Mailman, M.D., Milgram, A.J., Pearson, D.S., Roos, D.S., Schug, J., Stoeckert, C.J., Jr. and Whetzel, P. (2003) PlasmoDB: the *Plasmodium* genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic Acids Res*, **31**, 212-215.
- Balmer, P., Phillips, H.M., Maestre, A.E., McMonagle, F.A. and Phillips, R.S. (2000) The effect of nitric oxide on the growth of *Plasmodium falciparum*, *P. chabaudi* and *P. berghei* in vitro. *Parasite Immunol*, **22**, 97-106.
- Baribaud, F., Pohlmann, S., Sparwasser, T., Kimata, M.T., Choi, Y.K., Haggarty, B.S., Ahmad, N., Macfarlan, T., Edwards, T.G., Leslie, G.J., Arnason, J., Reinhart, T.A., Kimata, J.T., Littman, D.R., Hoxie, J.A. and Doms, R.W. (2001) Functional and antigenic characterization of human, rhesus macaque, pigtailed macaque, and murine DC-SIGN. *J Virol*, **75**, 10281-10289.
- Barragan, A., Fernandez, V., Chen, Q., von Euler, A., Wahlgren, M. and Spillmann, D. (2000) The duffy-binding-like domain 1 of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) is a heparan sulfate ligand that requires 12 mers for binding. *Blood*, **95**, 3594-3599.
- Baruch, D.I., Ma, X.C., Singh, H.B., Bi, X., Pasloske, B.L. and Howard, R.J. (1997) Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. *Blood*, **90**, 3766-3775.

- Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F. and Howard, R.J. (1995) Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, **82**, 77-87.
- Bashirova, A.A., Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Eilering, J.B., Martin, M.P., Wu, L., Martin, T.D., Viebig, N., Knolle, P.A., KewalRamani, V.N., van Kooyk, Y. and Carrington, M. (2001) A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med*, **193**, 671-678.
- Bashirova, A.A., Wu, L., Cheng, J., Martin, T.D., Martin, M.P., Benveniste, R.E., Lifson, J.D., KewalRamani, V.N., Hughes, A. and Carrington, M. (2003) Novel member of the CD209 (DC-SIGN) gene family in primates. *J Virol*, **77**, 217-227.
- Bass, D.M., Mackow, E.R. and Greenberg, H.B. (1991) Identification and partial characterization of a rhesus rotavirus binding glycoprotein on murine enterocytes. *Virology*, **183**, 602-610.
- Bauer, J., Bauer, T.M., Kalb, T., Taga, T., Lengyel, G., Hirano, T., Kishimoto, T., Acs, G., Mayer, L. and Gerok, W. (1989) Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression in human hepatocytes. *J Exp Med*, **170**, 1537-1549.
- Beeson, J.G., Rogerson, S.J., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Chai, W., Lawson, A.M., Molyneux, M.E. and Brown, G.V. (2000) Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat Med*, **6**, 86-90.
- Belnoue, E., Costa, F.T., Vigario, A.M., Voza, T., Gonnet, F., Landau, I., Van Rooijen, N., Mack, M., Kuziel, W.A. and Renia, L. (2003) Chemokine receptor CCR2 is not essential for the development of experimental cerebral malaria. *Infect Immun*, **71**, 3648-3651.
- Berendt, A.R., Ferguson, D.J., Gardner, J., Turner, G., Rowe, A., McCormick, C., Roberts, D., Craig, A., Pinches, R., Elford, B.C. and et al. (1994) Molecular mechanisms of sequestration in malaria. *Parasitology*, **108 Suppl**, S19-28.
- Berendt, A.R., Simmons, D.L., Tansey, J., Newbold, C.I. and Marsh, K. (1989) Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **341**, 57-59.
- Bevilacqua, M.P. (1993) Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*, **11**, 767-804.
- Bevilacqua, M.P. and Nelson, R.M. (1993) Selectins. *J Clin Invest*, **91**, 379-387.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S. and Gimbrone, M.A., Jr. (1987) Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 9238-9242.
- Bonifacino, J.S. and Dell'Angelica, E.C. (1999) Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol*, **145**, 923-926.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Braun Breton, C., Rosenberry, T.L. and Pereira da Silva, L.H. (1990) Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens. *Res Immunol*, **141**, 743-755.
- Buckley, C.D., Doyonnas, R., Newton, J.P., Blystone, S.D., Brown, E.J., Watt, S.M. and Simmons, D.L. (1996) Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. *J Cell Sci*, **109 ( Pt 2)**, 437-445.
- Buffet, P.A., Gamain, B., Scheidig, C., Baruch, D., Smith, J.D., Hernandez-Rivas, R., Pouvelle, B., Oishi, S., Fujii, N., Fusai, T., Parzy, D., Miller, L.H., Gysin, J. and Scherf, A. (1999) *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12743-12748.
- Burgmann, H., Hollenstein, U., Wenisch, C., Thalhammer, F., Looreesuwan, S. and Graninger, W. (1995) Serum concentrations of MIP-1 alpha and interleukin-8 in patients suffering from acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol Immunopathol*, **76**, 32-36.
- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, **112**, 195-203.
- Carlson, J., Ekre, H.P., Helmby, H., Gysin, J., Greenwood, B.M. and Wahlgren, M. (1992) Disruption of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosettes by standard heparin and heparin devoid of anticoagulant activity. *Am J Trop Med Hyg*, **46**, 595-602.
- Carlson, J., Helmby, H., Hill, A.V., Brewster, D., Greenwood, B.M. and Wahlgren, M. (1990) Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet*, **336**, 1457-1460.
- Carlson, J. and Wahlgren, M. (1992) *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. *J Exp Med*, **176**, 1311-1317.
- Cassidy, J.T., Jourdan, G.W. and Roseman, S. (1965) The sialic acids. VI. Purification and properties of sialidase from *Clostridium perfringens*. *J Biol Chem*, **240**, 3501-3506.

- Chen, Q., Fernandez, V., Sundstrom, A., Schlichtherle, M., Datta, S., Hagblom, P. and Wahlgren, M. (1998) Developmental selection of *var* gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **394**, 392-395.
- Chen, Q., Heddini, A., Barragan, A., Fernandez, V., Pearce, S.F. and Wahlgren, M. (2000) The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. *J Exp Med*, **192**, 1-10.
- Chu, G., Narasimhan, B., Tibshirani, R. and Tusher, V. SAM "Significance Analysis of Microarrays" Users guide and technical document.
- Clark, I.A. and Cowden, W.B. (1999) Why is the pathology of falciparum worse than that of vivax malaria? *Parasitol Today*, **15**, 458-461.
- Colden-Stanfield, M., Ratcliffe, D., Cramer, E.B. and Gallin, E.K. (1993) Characterization of influenza virus-induced leukocyte adherence to human umbilical vein endothelial cell monolayers. *J Immunol*, **151**, 310-321.
- Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O.M., Corbi, A.L. and Rivas, L. (2002) Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J Biol Chem*, **277**, 36766-36769.
- Cosloy, S.D. and Oishi, M. (1973) The nature of the transformation process in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*, **124**, 1-10.
- Cranston, H.A., Boylan, C.W., Carroll, G.L., Sutura, S.P., Williamson, J.R., Gluzman, I.Y. and Krogstad, D.J. (1984) *Plasmodium falciparum* maturation abolishes physiologic red cell deformability. *Science*, **223**, 400-403.
- Darai, G., Handermann, M., Erhard, H. and Sonntag, H.-G. (1997) *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Davidson, E.A. and Gowda, D.C. (2001) Glycobiology of *Plasmodium falciparum*. *Biochimie*, **83**, 601-604.
- De Maio, A., Lis, H., Gershoni, J.M. and Sharon, N. (1986) Identification of peanut agglutinin-binding glycoproteins on immature human thymocytes. *Cell Immunol*, **99**, 345-353.
- Deininger, M.H., Winkler, S., Kremsner, P.G., Meyermann, R. and Schluesener, H.J. (2003) Angiogenic proteins in brains of patients who died with cerebral malaria. *J Neuroimmunol*, **142**, 101-111.
- Deitsch, K.W., Calderwood, M.S. and Wellems, T.E. (2001) Malaria. Cooperative silencing elements in *var* genes. *Nature*, **412**, 875-876.
- Deitsch, K.W., del Pinal, A. and Wellems, T.E. (1999) Intra-cluster recombination and *var* transcription switches in the antigenic variation of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **101**, 107-116.
- DeLisser, H.M., Newman, P.J. and Albelda, S.M. (1994) Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today*, **15**, 490-495.
- Duffy, M.F., Brown, G.V., Basuki, W., Krejany, E.O., Noviyanti, R., Cowman, A.F. and Reeder, J.C. (2002) Transcription of multiple *var* genes by individual, trophozoite-stage *Plasmodium falciparum* cells expressing a chondroitin sulphate A binding phenotype. *Mol Microbiol*, **43**, 1285-1293.
- Dustin, M.L. and Springer, T.A. (1991) Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol*, **9**, 27-66.
- el-Nashar, T.M., el-Kholy, H.M., el-Shiety, A.G. and Al-Zahaby, A.A. (2002) Correlation of plasma levels of tumor necrosis factor, interleukin-6 and nitric oxide with the severity of human malaria. *J Egypt Soc Parasitol*, **32**, 525-535.
- Engering, A., Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Wijers, M., van Liempt, E., Demareux, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C.G., Piguët, V. and van Kooyk, Y. (2002) The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*, **168**, 2118-2126.
- Engvall, E. and Perlman, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
- Esko, J.D., Weinke, J.L., Taylor, W.H., Ekborg, G., Roden, L., Anantharamaiah, G. and Gawish, A. (1987) Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in Chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I. *J Biol Chem*, **262**, 12189-12195.
- Esslinger, C.W., Picot, S. and Ambroise-Thomas, P. (1994) Intra-erythrocytic *Plasmodium falciparum* induces up-regulation of inter-cellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells *in vitro*. *Scand J Immunol*, **39**, 229-232.
- Febbraio, M., Hajjar, D.P. and Silverstein, R.L. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, **108**, 785-791.
- Feinberg, H., Mitchell, D.A., Drickamer, K. and Weis, W.I. (2001) Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science*, **294**, 2163-2166.
- Fernandez, V., Hommel, M., Chen, Q., Hagblom, P. and Wahlgren, M. (1999) Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte are encoded by the *rif* gene family and are the target of human immune responses. *J Exp Med*, **190**, 1393-1404.

- Fischer, K., Horrocks, P., Preuss, M., Wiesner, J., Wunsch, S., Camargo, A.A. and Lanzer, M. (1997) Expression of *var* genes located within polymorphic subtelomeric domains of *Plasmodium falciparum* chromosomes. *Mol Cell Biol*, **17**, 3679-3686.
- Flick, K., Scholander, C., Chen, Q., Fernandez, V., Pouvelle, B., Gysin, J. and Wahlgren, M. (2001) Role of nonimmune IgG bound to PfEMP1 in placental malaria. *Science*, **293**, 2098-2100.
- Fontanet, A.L., Johnston, D.B., Walker, A.M., Rooney, W., Thimasarn, K., Sturchler, D., Macdonald, M., Hours, M. and Wirth, D.F. (1993) High prevalence of mefloquine-resistant falciparum malaria in eastern Thailand. *Bull World Health Organ*, **71**, 377-383.
- Fowler, E.V., Peters, J.M., Gatton, M.L., Chen, N. and Cheng, Q. (2002) Genetic diversity of the DBLalpha region in *Plasmodium falciparum var* genes among Asia-Pacific isolates. *Mol Biochem Parasitol*, **120**, 117-126.
- Franco, C.R., Rocha, H.A., Trindade, E.S., Santos, I.A., Leite, E.L., Veiga, S.S., Nader, H.B. and Dietrich, C.P. (2001) Heparan sulfate and control of cell division: adhesion and proliferation of mutant CHO-745 cells lacking xylosyl transferase. *Braz J Med Biol Res*, **34**, 971-975.
- Freitas-Junior, L.H., Bottius, E., Pirrit, L.A., Deitsch, K.W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrass, U., Wellems, T.E. and Scherf, A. (2000) Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature*, **407**, 1018-1022.
- Frevert, U., Sinnis, P., Esko, J.D. and Nussenzweig, V. (1996) Cell surface glycosaminoglycans are not obligatory for *Plasmodium berghei* sporozoite invasion in vitro. *Mol Biochem Parasitol*, **76**, 257-266.
- Fried, M. and Duffy, P.E. (1996) Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*, **272**, 1502-1504.
- Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T. and Olson, W.C. (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4498-4503.
- Gardner, J.P., Pinches, R.A., Roberts, D.J. and Newbold, C.I. (1996) Variant antigens and endothelial receptor adhesion in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3503-3508.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M. and Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419**, 498-511.
- Garred, P., Nielsen, M.A., Kurtzhals, J.A., Malhotra, R., Madsen, H.O., Goka, B.Q., Akanmori, B.D., Sim, R.B. and Hviid, L. (2003) Mannose-binding lectin is a disease modifier in clinical malaria and may function as opsonin for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect Immun*, **71**, 5245-5253.
- Gassen, H.G. and Schimpf, G. (1999) *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Gay, F., Robert, C., Pouvelle, B., Peyrol, S., Scherf, A. and Gysin, J. (1995) Isolation and characterization of brain microvascular endothelial cells from Saimiri monkeys. An *in vitro* model for sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol Methods*, **184**, 15-28.
- Geijtenbeek, T.B., Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C.G. and van Kooyk, Y. (2000a) DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol*, **1**, 353-357.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G. and van Kooyk, Y. (2000b) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances *trans*-infection of T cells. *Cell*, **100**, 587-597.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y. and Figdor, C.G. (2000c) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, **100**, 575-585.
- Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Krieger, E., Vriend, G., Figdor, C.G. and van Kooyk, Y. (2002) Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem*, **277**, 11314-11320.
- Geijtenbeek, T.B., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B. and Van Kooyk, Y. (2003) Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*, **197**, 7-17.
- Geng, J.G., Bevilacqua, M.P., Moore, K.L., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Kim, J.M., Bliss, G.A., Zimmerman, G.A. and McEver, R.P. (1990) Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*, **343**, 757-760.

- Gershoni, J.M., Lapidot, M., Zakai, N. and Loyter, A. (1986) Protein blot analysis of virus receptors: identification and characterization of the Sendai virus receptor. *Biochim Biophys Acta*, **856**, 19-26.
- Good, M.F. (1999) Malaria. Tying the conductor's arms. *Nature*, **400**, 25-26.
- Good, M.F., Kaslow, D.C. and Miller, L.H. (1998) Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol*, **16**, 57-87.
- Gowda, D.C. and Davidson, E.A. (1999) Protein glycosylation in the malaria parasite. *Parasitol Today*, **15**, 147-152.
- Gowda, D.C., Gupta, P. and Davidson, E.A. (1997) Glycosylphosphatidylinositol anchors represent the major carbohydrate modification in proteins of intraerythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, **272**, 6428-6439.
- Greenwalt, D.E., Lipsky, R.H., Ockenhouse, C.F., Ikeda, H., Tandon, N.N. and Jamieson, G.A. (1992) Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*, **80**, 1105-1115.
- Haas, T.A. and Plow, E.F. (1994) Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 656-662.
- Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.F. and Dechanet-Merville, J. (2002) Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*, **17**, 653-664.
- Hall, N., Pain, A., Berriman, M., Churcher, C., Harris, B., Harris, D., Mungall, K., Bowman, S., Atkin, R., Baker, S., Barron, A., Brooks, K., Buckee, C.O., Burrows, C., Cherevach, I., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Christodoulou, Z., Clark, L., Clark, R., Corton, C., Cronin, A., Davies, R., Davis, P., Dear, P., Dearden, F., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Goodhead, I., Gwilliam, R., Hamlin, N., Hance, Z., Harper, D., Hauser, H., Hornsby, T., Holroyd, S., Horrocks, P., Humphray, S., Jagels, K., James, K.D., Johnson, D., Kerhornou, A., Knights, A., Konfortov, B., Kyes, S., Larke, N., Lawson, D., Lennard, N., Line, A., Maddison, M., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Ormond, D., Price, C., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutter, S., Rutherford, K.M., Sanders, M., Simmonds, M., Seeger, K., Sharp, S., Smith, R., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Tivey, A., Unwin, L., Whitehead, S., Woodward, J., Sulston, J.E., Craig, A., Newbold, C. and Barrell, B.G. (2002) Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3-9 and 13. *Nature*, **419**, 527-531.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanum, P.S., Hayano, M. and Kojima, S. (2003) Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. *Int Immunol*, **15**, 633-640.
- Hasler, T., Albrecht, G.R., Van Schravendijk, M.R., Aguiar, J.C., Morehead, K.E., Pasloske, B.L., Ma, C., Barnwell, J.W., Greenwood, B. and Howard, R.J. (1993) An improved microassay for *Plasmodium falciparum* cytoadherence using stable transformants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. *Am J Trop Med Hyg*, **48**, 332-347.
- Helmby, H., Cavalier, L., Pettersson, U. and Wahlgren, M. (1993) Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface. *Infect Immun*, **61**, 284-288.
- Hernandez-Rivas, R., Mattei, D., Sterkers, Y., Peterson, D.S., Wellems, T.E. and Scherf, A. (1997) Expressed var genes are found in *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions. *Mol Cell Biol*, **17**, 604-611.
- Hieshima, K., Imai, T., Opdenakker, G., Van Damme, J., Kusuda, J., Tei, H., Sakaki, Y., Takatsuki, K., Miura, R., Yoshie, O. and Nomiya, H. (1997) Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem*, **272**, 5846-5853.
- Ho, M. and White, N.J. (1999) Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol*, **276**, C1231-1242.
- Ho, M., White, N.J., Looareesuwan, S., Wattanagoon, Y., Lee, S.H., Walport, M.J., Bunnag, D. and Harinasuta, T. (1990) Splenic Fc receptor function in host defense and anemia in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, **161**, 555-561.
- Hollingdale, M.R., Leland, P. and Schwartz, A.L. (1983) *In vitro* cultivation of the exoerythrocytic stage of *Plasmodium berghei* in a hepatoma cell line. *Am J Trop Med Hyg*, **32**, 682-684.
- Hromas, R., Gray, P.W., Chantry, D., Godiska, R., Krathwohl, M., Fife, K., Bell, G.I., Takeda, J., Aronica, S., Gordon, M., Cooper, S., Broxmeyer, H.E. and Klemsz, M.J. (1997) Cloning and characterization of exodus, a novel beta-chemokine. *Blood*, **89**, 3315-3322.
- Huang, M.M., Bolen, J.B., Barnwell, J.W., Shattil, S.J. and Brugge, J.S. (1991) Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7844-7848.
- Hunt, N.H. and Grau, G.E. (2003) Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol*, **24**, 491-499.

- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Publishing, New York.
- Jensen, J.B. (1978) Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, **27**, 1274-1276.
- John, M.R., Wickert, H., Zaar, K., Jonsson, K.B., Grauer, A., Ruppertsberger, P., Schmidt-Gayk, H., Murer, H., Ziegler, R. and Blind, E. (2001) A case of neuroendocrine oncogenic osteomalacia associated with a PHEX and fibroblast growth factor-23 expressing sinusoidal malignant schwannoma. *Bone*, **29**, 393-402.
- Kang, Y.S., Yamazaki, S., Iyoda, T., Pack, M., Bruening, S.A., Kim, J.Y., Takahara, K., Inaba, K., Steinman, R.M. and Park, C.G. (2003) SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *Int Immunol*, **15**, 177-186.
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. (2001) *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Khattab, A., Kremsner, P.G. and Klinkert, M.Q. (2003) Common surface-antigen *var* genes of limited diversity expressed by *Plasmodium falciparum* placental isolates separated by time and space. *J Infect Dis*, **187**, 477-483.
- Knolle, P.A. and Gerken, G. (2000) Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, **174**, 21-34.
- Knolle, P.A. and Limmer, A. (2001) Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol*, **22**, 432-437.
- Knolle, P.A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G. and Lohse, A.W. (1999) Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology*, **116**, 1428-1440.
- Kremsner, P.G., Winkler, S., Brandts, C., Wildling, E., Jenne, L., Graninger, W., Prada, J., Bienzle, U., Juillard, P. and Grau, G.E. (1995) Prediction of accelerated cure in *Plasmodium falciparum* malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production. *Am J Trop Med Hyg*, **53**, 532-538.
- Kretschmer, H., Bienzle, U., Klauss, V. and al., e. (1996) Malaria. In Knobloch, J. (ed.), *Tropen- und Reisemedizin*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm.
- Kwiatkowski, D., Cannon, J.G., Manogue, K.R., Cerami, A., Dinarello, C.A. and Greenwood, B.M. (1989) Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol*, **77**, 361-366.
- Kyes, S., Pinches, R. and Newbold, C. (2000) A simple RNA analysis method shows *var* and *rif* multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **105**, 311-315.
- Kyes, S.A., Christodoulou, Z., Raza, A., Horrocks, P., Pinches, R., Rowe, J.A. and Newbold, C.I. (2003) A well-conserved *Plasmodium falciparum var* gene shows an unusual stage-specific transcript pattern. *Mol Microbiol*, **48**, 1339-1348.
- Kyes, S.A., Rowe, J.A., Kriek, N. and Newbold, C.I. (1999) Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9333-9338.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lambros, C. and Vanderberg, J.P. (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, **65**, 418-420.
- Lee, J.S., Frevort, C.W., Thoring, D.R., Segerer, S., Alpers, C.E., Cartron, J.P., Colin, Y., Wong, V.A., Martin, T.R. and Goodman, R.B. (2003) Enhanced expression of Duffy antigen in the lungs during suppurative pneumonia. *J Histochem Cytochem*, **51**, 159-166.
- Lertmemongkolchai, G., Cai, G., Hunter, C.A. and Bancroft, G.J. (2001) Bystander activation of CD8+ T cells contributes to the rapid production of IFN-gamma in response to bacterial pathogens. *J Immunol*, **166**, 1097-1105.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B. and Knolle, P.A. (2000) Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med*, **6**, 1348-1354.
- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schonrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B. and Hammerling, G.J. (1998) Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol*, **28**, 2395-2406.
- Lin, E.Y., Orlofsky, A., Wang, H.G., Reed, J.C. and Prystowsky, M.B. (1996) A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*, **87**, 983-992.
- Lindl, T. (2000) *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.
- Looareesuwan, S., Ho, M., Wattanagoon, Y., White, N.J., Warrell, D.A., Bunnag, D., Harinasuta, T. and Wyler, D.J. (1987) Dynamic alteration in splenic function during acute *falciparum* malaria. *N Engl J Med*, **317**, 675-679.

- Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., De Lacroix De Lavalette, A., Staropoli, I., Fong, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F. and Altmeyer, R. (2003) DC-SIGN and L-SIGN are high-affinity binding receptors for hepatitis C Virus glycoprotein E2. *J Biol Chem*, **27**, 27.
- Mack, M., Cihak, J., Simonis, C., Luckow, B., Proudfoot, A.E., Plachy, J., Bruhl, H., Frink, M., Anders, H.J., Vielhauer, V., Pfirstinger, J., Stangassinger, M. and Schlondorff, D. (2001) Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol*, **166**, 4697-4704.
- Mackay, C.R. and Imhof, B.A. (1993) Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today*, **14**, 99-102.
- Mackay, C.R., Terpe, H.J., Stauder, R., Marston, W.L., Stark, H. and Gunthert, U. (1994) Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol*, **124**, 71-82.
- MacPhee, P.J., Schmidt, E.E. and Groom, A.C. (1992) Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol*, **263**, G17-23.
- MacPhee, P.J., Schmidt, E.E. and Groom, A.C. (1995) Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol*, **269**, G692-698.
- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M. and Steinman, R.M. (2000) The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol*, **151**, 673-684.
- Marin, V., Montero-Julian, F.A., Gres, S., Boulay, V., Bongrand, P., Farnarier, C. and Kaplanski, G. (2001) The IL-6-soluble IL-6R $\alpha$  autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol*, **167**, 3435-3442.
- Matsukawa, A., Hogaboam, C.M., Lukacs, N.W. and Kunkel, S.L. (2000) Chemokines and innate immunity. *Rev Immunogenet*, **2**, 339-358.
- McCormick, C.J., Craig, A., Roberts, D., Newbold, C.I. and Berendt, A.R. (1997) Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells. *J Clin Invest*, **100**, 2521-2529.
- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L. and Bainton, D.F. (1989) GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*, **84**, 92-99.
- Menendez, C. (1995) Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. *Parasitol Today*, **11**, 178-183.
- Menendez, C., Ordi, J., Ismail, M.R., Ventura, P.J., Aponte, J.J., Kahigwa, E., Font, F. and Alonso, P.L. (2000) The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis*, **181**, 1740-1745.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. and Doumbo, O.K. (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **415**, 673-679.
- Mitchell, D.A., Fadden, A.J. and Drickamer, K. (2001) A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem*, **276**, 28939-28945.
- Mizuochi, T., Matthews, T.J., Kato, M., Hamako, J., Titani, K., Solomon, J. and Feizi, T. (1990) Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp 120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharides with bisecting N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem*, **265**, 8519-8524.
- Modi, W.S., Dean, M., Seuanez, H.N., Mukaida, N., Matsushima, K. and O'Brien, S.J. (1990) Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily. *Hum Genet*, **84**, 185-187.
- Modur, V., Li, Y., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M. and McIntyre, T.M. (1997) Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest*, **100**, 2752-2756.
- Moffatt, O.D., Devitt, A., Bell, E.D., Simmons, D.L. and Gregory, C.D. (1999) Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes. *J Immunol*, **162**, 6800-6810.
- Morgenstern, J.P. and Land, H. (1990) Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res*, **18**, 3587-3596.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C. and Kieff, E. (1995) The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, **80**, 389-399.
- Mosmann, T.R. and Fong, T.A. (1989) Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods*, **116**, 151-158.
- Muanza, K., Gay, F., Behr, C. and Scherf, A. (1996) Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadherence. *Res Immunol*, **147**, 149-163.
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X. and Phillips, D.M. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*, **178**, 449-460.

- Mummidi, S., Catano, G., Lam, L., Hoefle, A., Telles, V., Begum, K., Jimenez, F., Ahuja, S.S. and Ahuja, S.K. (2001) Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *J Biol Chem*, **276**, 33196-33212.
- Naik, R.S., Branch, O.H., Woods, A.S., Vijaykumar, M., Perkins, D.J., Nahlen, B.L., Lal, A.A., Cotter, R.J., Costello, C.E., Ockenhouse, C.F., Davidson, E.A. and Gowda, D.C. (2000) Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med*, **192**, 1563-1576.
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F. and Despres, P. (2003) Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*, **4**, 723-728.
- Ockenhouse, C.F., Tandon, N.N., Magowan, C., Jamieson, G.A. and Chulay, J.D. (1989) Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor. *Science*, **243**, 1469-1471.
- Ockenhouse, C.F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K.E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M. and Lobb, R.R. (1992) Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*, **176**, 1183-1189.
- O'Sullivan, J.M., Cannon, R.D., Sullivan, P.A. and Jenkinson, H.F. (1997) Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptors for *Candida albicans* adhesion. *Microbiology*, **143 ( Pt 2)**, 341-348.
- Palter, S.F., Mulayim, N., Senturk, L. and Arici, A. (2001) Interleukin-8 in the human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 2660-2667.
- Park, C.G., Takahara, K., Umemoto, E., Yashima, Y., Matsubara, K., Matsuda, Y., Clausen, B.E., Inaba, K. and Steinman, R.M. (2001) Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int Immunol*, **13**, 1283-1290.
- Peiper, S.C., Wang, Z.X., Neote, K., Martin, A.W., Showell, H.J., Conklyn, M.J., Ogborne, K., Hadley, T.J., Lu, Z.H., Hesselgesser, J. and et al. (1995) The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med*, **181**, 1311-1317.
- Peters, M., Jacobs, S., Ehlers, M., Vollmer, P., Mullberg, J., Wolf, E., Brem, G., Meyer zum Buschenfelde, K.H. and Rose-John, S. (1996) The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J Exp Med*, **183**, 1399-1406.
- Pino, P., Vouldoukis, I., Kolb, J.P., Mahmoudi, N., Desportes-Livage, I., Bricaire, F., Danis, M., Dugas, B. and Mazier, D. (2003) *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis*, **187**, 1283-1290.
- Playfair, J.H., Blackwell, J.M. and Miller, H.R. (1990) Modern vaccines. Parasitic diseases. *Lancet*, **335**, 1263-1266.
- Pohlmann, S., Baribaud, F., Lee, B., Leslie, G.J., Sanchez, M.D., Hiebenthal-Millow, K., Munch, J., Kirchhoff, F. and Doms, R.W. (2001) DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J Virol*, **75**, 4664-4672.
- Porta, J., Carota, A., Pizzolato, G.P., Wildi, E., Widmer, M.C., Margairaz, C. and Grau, G.E. (1993) Immunopathological changes in human cerebral malaria. *Clin Neuropathol*, **12**, 142-146.
- Pouvelle, B., Meyer, P., Robert, C., Bardel, L. and Gysin, J. (1997) Chondroitin-4-sulfate impairs in vitro and in vivo cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Med*, **3**, 508-518.
- Prakobphol, A., Murray, P.A. and Fisher, S.J. (1987) Bacterial adherence on replicas of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, **164**, 5-11.
- Pratta, M.A., Yao, W., Decicco, C., Tortorella, M.D., Liu, R.Q., Copeland, R.A., Magolda, R., Newton, R.C., Trzaskos, J.M. and Arner, E.C. (2003) Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem*.
- Reeder, J.C., Hodder, A.N., Beeson, J.G. and Brown, G.V. (2000) Identification of glycosaminoglycan binding domains in *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 of a chondroitin sulfate A-adherent parasite. *Infect Immun*, **68**, 3923-3926.
- Renia, L., Miltgen, F., Charoenvit, Y., Ponnudurai, T., Verhave, J.P., Collins, W.E. and Mazier, D. (1988) Malaria sporozoite penetration. A new approach by double staining. *J Immunol Methods*, **112**, 201-205.
- Riccio, E.K., Junior, I.N., Riccio, L.R., das Graças Alecrim, M., Corte-Real, S., Morgado, M., Daniel-Ribeiro, C.T. and de Fatima Ferreira-da-Cruz, M. (2003) Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parasitol Res*, **90**, 9-18.

- Robert, C., Pouvelle, B., Meyer, P., Muanza, K., Fujioka, H., Aikawa, M., Scherf, A. and Gysin, J. (1995) Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. *Res Immunol*, **146**, 383-393.
- Robert-Koch-Institut. (2000) Ratgeber Infektionskrankheiten, 15. Folge Malaria. *Epidem Bull*, **20/2000**, 159-162.
- Roberts, D.D., Sherwood, J.A., Spitalnik, S.L., Panton, L.J., Howard, R.J., Dixit, V.M., Frazier, W.A., Miller, L.H. and Ginsburg, V. (1985) Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature*, **318**, 64-66.
- Roberts, D.J., Craig, A.G., Berendt, A.R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K. and Newbold, C.I. (1992) Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature*, **357**, 689-692.
- Rockett, K.A., Auburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. (1991) Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun*, **59**, 3280-3283.
- Rogerson, S.J., Chaiyaroj, S.C., Ng, K., Reeder, J.C. and Brown, G.V. (1995) Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med*, **182**, 15-20.
- Rosario, V. (1981) Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*, **212**, 1037-1038.
- Rosen, S.D. and Bertozzi, C.R. (1994) The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 663-673.
- Rossi, D.L., Vicari, A.P., Franz-Bacon, K., McClanahan, T.K. and Zlotnik, A. (1997) Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J Immunol*, **158**, 1033-1036.
- Rot, A. (2003) In situ binding assay for studying chemokine interactions with endothelial cells. *J Immunol Methods*, **273**, 63-71.
- Rowe, A., Obeiro, J., Newbold, C.I. and Marsh, K. (1995) *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun*, **63**, 2323-2326.
- Rowe, J.A., Kyes, S.A., Rogerson, S.J., Babiker, H.A. and Raza, A. (2002) Identification of a conserved *Plasmodium falciparum* var gene implicated in malaria in pregnancy. *J Infect Dis*, **185**, 1207-1211.
- Rowe, J.A., Moulds, J.M., Newbold, C.I. and Miller, L.H. (1997) *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, **388**, 292-295.
- Rubio, J.P., Thompson, J.K. and Cowman, A.F. (1996) The var genes of *Plasmodium falciparum* are located in the subtelomeric region of most chromosomes. *EMBO J*, **15**, 4069-4077.
- Saeed, A.I., Bhagabati, N., Braisted, J., Sturn, A. and Quackenbush, J. (2003) TIGR MeV MultiExperiment Viewer. The Institute for Genomic Research.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Salanti, A., Staalsoe, T., Lavstsen, T., Jensen, A.T., Sowa, M.P., Arnot, D.E., Hviid, L. and Theander, T.G. (2003) Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol Microbiol*, **49**, 179-191.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Scherf, A., Hernandez-Rivas, R., Buffét, P., Bottius, E., Benatar, C., Pouvelle, B., Gysin, J. and Lanzer, M. (1998) Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J*, **17**, 5418-5426.
- Schlichtherle, M., Wahlgren, M., Perlmann, H. and Scherf, A. (2000) *Methods in Malaria Research*. MR4 / ATCC, Manassas, Virginia.
- Schofield, L. and Hackett, F. (1993) Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med*, **177**, 145-153.
- Schofield, L., Novakovic, S., Gerold, P., Schwarz, R.T., McConville, M.J. and Tachado, S.D. (1996) Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol*, **156**, 1886-1896.
- Scholander, C., Treutiger, C.J., Hultenby, K. and Wahlgren, M. (1996) Novel fibrillar structure confers adhesive property to malaria-infected erythrocytes. *Nat Med*, **2**, 204-208.
- Senczuk, A.M., Reeder, J.C., Kosmala, M.M. and Ho, M. (2001) *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 functions as a ligand for P-selectin. *Blood*, **98**, 3132-3135.
- Serirrom, S., Raharjo, W.H., Chotivanich, K., Loareesuwan, S., Kubes, P. and Ho, M. (2003) Anti-adhesive effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under flow. *Am J Pathol*, **162**, 1651-1660.

- Seshi, B. (1994) Cell adhesion to proteins separated by lithium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto a polyvinylidene difluoride membrane: a new cell-blotting technique. *J Immunol Methods*, **176**, 185-201.
- Shen, L., Lang, M.L. and Wade, W.F. (2000) The ins and outs of getting in: structures and signals that enhance BCR or Fc receptor-mediated antigen presentation. *Immunopharmacology*, **49**, 227-240.
- Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y. and Shaw, S. (1992) Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today*, **13**, 106-112.
- Siano, J.P., Grady, K.K., Millet, P. and Wick, T.M. (1998) Short report: *Plasmodium falciparum*: cytoadherence to alpha(v)beta3 on human microvascular endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg*, **59**, 77-79.
- Simmons, G., Reeves, J.D., Grogan, C.C., Vandenberghe, L.H., Baribaud, F., Whitbeck, J.C., Burke, E., Buchmeier, M.J., Soilleux, E.J., Riley, J.L., Doms, R.W., Bates, P. and Pohlmann, S. (2003) DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology*, **305**, 115-123.
- Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I. and Miller, L.H. (1995) Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*, **82**, 101-110.
- Smith, J.D., Craig, A.G., Kriek, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagan, T., Pinches, R., Baruch, D.I., Newbold, C.I. and Miller, L.H. (2000a) Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1766-1771.
- Smith, J.D., Gamain, B., Baruch, D.I. and Kyes, S. (2001) Decoding the language of var genes and *Plasmodium falciparum* sequestration. *Trends Parasitol*, **17**, 538-545.
- Smith, J.D., Kyes, S., Craig, A.G., Fagan, T., Hudson-Taylor, D., Miller, L.H., Baruch, D.I. and Newbold, C.I. (1998) Analysis of adhesive domains from the A4VAR *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 identifies a CD36 binding domain. *Mol Biochem Parasitol*, **97**, 133-148.
- Smith, J.D., Subramanian, G., Gamain, B., Baruch, D.I. and Miller, L.H. (2000b) Classification of adhesive domains in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol Biochem Parasitol*, **110**, 293-310.
- Soilleux, E.J., Barten, R. and Trowsdale, J. (2000) DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol*, **165**, 2937-2942.
- Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L. and Springer, T.A. (1988) Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*, **52**, 925-933.
- Steinman, R.M. (2000) DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell*, **100**, 491-494.
- Storch, V. and Welsch, U. (1994) *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A. and Wellems, T.E. (1995) The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*, **82**, 89-100.
- Sugiyama, T., Cuevas, L.E., Bailey, W., Makunde, R., Kawamura, K., Kobayashi, M., Masuda, H. and Hommel, M. (2001) Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in *Plasmodium falciparum*-infected placenta. *Placenta*, **22**, 573-579.
- Suguitan, A.L., Jr., Leke, R.G., Fouda, G., Zhou, A., Thuita, L., Metenou, S., Fogako, J., Megnekou, R. and Taylor, D.W. (2003) Changes in the Levels of Chemokines and Cytokines in the Placentas of Women with *Plasmodium falciparum* Malaria. *J Infect Dis*, **188**, 1074-1082.
- Tachado, S.D., Gerold, P., McConville, M.J., Baldwin, T., Quilici, D., Schwarz, R.T. and Schofield, L. (1996) Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol*, **156**, 1897-1907.
- Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L.P., Gluckman, J.C., Lagrange, P.H., Gicquel, B. and Neyrolles, O. (2003) DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*, **197**, 121-127.
- Taylor, H.M., Kyes, S.A., Harris, D., Kriek, N. and Newbold, C.I. (2000) A study of var gene transcription *in vitro* using universal var gene primers. *Mol Biochem Parasitol*, **105**, 13-23.
- Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A. and Engel, P. (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J*, **9**, 866-873.
- Thompson, J.K., Rubio, J.P., Caruana, S., Brockman, A., Wickham, M.E. and Cowman, A.F. (1997) The chromosomal organization of the *Plasmodium falciparum* var gene family is conserved. *Mol Biochem Parasitol*, **87**, 49-60.

- Torre, D., Speranza, F. and Martegani, R. (2002) Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis*, **2**, 719-720.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193**, 673-675.
- Treutiger, C.J., Heddini, A., Fernandez, V., Muller, W.A. and Wahlgren, M. (1997) PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Nat Med*, **3**, 1405-1408.
- Turner, G.D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T.M., Looareesuwan, S., Buley, I.D., Gatter, K.C., Newbold, C.I., Pukritayakamee, S., Nagachinta, B. 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. *Am J Pathol*, **145**, 1057-1069.
- Udeinya, I.J. and Akogyeram, C.O. (1993) Induction of adhesiveness in human endothelial cells by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg*, **48**, 488-495.
- Uhlemann, A.-C., Staalsoe, T., Klinkert, M.-Q. and L., H. (2000) Analysis of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *MACS&more*, **4**, 7-8.
- Urban, B.C., Ferguson, D.J., Pain, A., Willcox, N., Plebanski, M., Austyn, J.M. and Roberts, D.J. (1999) *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*, **400**, 73-77.
- van de Stolpe, A. and van der Saag, P.T. (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*, **74**, 13-33.
- Vazquez-Macias, A., Martinez-Cruz, P., Castaneda-Patlan, M.C., Scheidig, C., Gysin, J., Scherf, A. and Hernandez-Rivas, R. (2002) A distinct 5' flanking *var* gene region regulates *Plasmodium falciparum* variant erythrocyte surface antigen expression in placental malaria. *Mol Microbiol*, **45**, 155-167.
- Virtanen, I., Badley, R.A., Paasivuo, R. and Lehto, V.P. (1984) Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol*, **99**, 1083-1091.
- Vogt, A.M., Barragan, A., Chen, Q., Kironde, F., Spillmann, D. and Wahlgren, M. (2003) Heparan sulfate on endothelial cells mediates the binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes via the DBL1alpha domain of PfEMP1. *Blood*, **101**, 2405-2411.
- Warrell, D.A. and Gilles, H.M. (2002) *Essential Malariology*. Arnold Publication, London.
- Wehner, R. and Gehring, W. (1995) *Zoologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Wenisch, C., Linnau, K.F., Looareesuwan, S. and Rumpold, H. (1999) Plasma levels of the interleukin-6 cytokine family in persons with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, **179**, 747-750.
- Wernsdorfer, W.H. and Payne, D. (1991) The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther*, **50**, 95-121.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**, 141-143.
- White, N.J. (1998) Drug resistance in malaria. *Br Med Bull*, **54**, 703-715.
- Winkler, S., Willheim, M., Baier, K., Schmid, D., Aichelburg, A., Graninger, W. and Kremsner, P.G. (1998) Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*, **66**, 6040-6044.
- Winter, G., Chen, Q., Flick, K., Kremsner, P., Fernandez, V. and Wahlgren, M. (2003) The 3D7var5.2 (*var*(COMMON)) type *var* gene family is commonly expressed in non-placental *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol Biochem Parasitol*, **127**, 179-191.
- Yipp, B.G., Robbins, S.M., Resek, M.E., Baruch, D.I., Looareesuwan, S. and Ho, M. (2003) Src-family kinase signaling modulates the adhesion of *Plasmodium falciparum* on human microvascular endothelium under flow. *Blood*, **101**, 2850-2857.
- Yoshida, N., Nussenzweig, R.S., Potocnjak, P., Nussenzweig, V. and Aikawa, M. (1980) Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science*, **207**, 71-73.