

Zusammenfassung

Lukas Hanebutte

Dr. med. (bzw. „Dr. med. dent.“ oder „Dr. sc. hum.“)

Electron microscopic imaging and reconstruction of the spiral scaffold underlying knobs in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes

Fach/Einrichtung: Parasitologie

Doktorvater: Prof. Dr. Michael Lanzer

In dieser Arbeit wurden räumliche Parameter von Vorwölbungen, „Knobs“ genannt, von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten mittels dreidimensionaler (3D) Rekonstruktionen ermittelt, die auf mit einem Elektronenmikroskop aufgenommenen Kippreihen basierten. Das Ziel war es mit Hilfe von Antikörpern gegen das parasiteneigene Knob-assoziierte Histidinreiche Protein (KAHRP) und Erythrozyten-spezifische Proteine Informationen zu Eigenschaften der Spirale unterhalb der Vorwölbungen zu gewinnen und ein Protokoll zur Aufreinigung des Knob-Spiral Komplexes unter der Verwendung von Detergentien zu entwerfen.

Während der Entwicklung in den roten Blutkörperchen wird deren Form durch den an den Menschen angepassten Parasiten verändert, wobei die dabei entstehenden Knobs mit dem Endothel oder anderen Erythrozyten durch Zytoadhäsion interagieren. Knobs verursachen schwere Symptome der Malariaerkrankung und sind dadurch mit höherer Mortalität verbunden. Unter Knobs befindet sich eine Spirale, wobei Funktion und Bestandteile der Spirale ungeklärt sind. Eine Theorie besagt, dass KAHRP ein Bestandteil der Spirale oder mit ihr assoziiert ist. Mit Antikörpern, welche bis zu 4 nm präzise sind, sollte diese Theorie verifiziert werden. Um Zugänglichkeit der Antikörper für Proteinmarkierung zu gewährleisten, wurden verschiedene Detergentien verwendet, um den Knob-Spiral Komplex aufzureinigen. Tomogramme wurden mit dem Elektronenmikroskop FEI Tecnai F20 aufgenommen. Sie wurden anschließend analysiert, um die Sichtbarkeit der Spiralfragmente zu bewerten, und auf eine 3D Spirale adjustiert, die mit den passenden Parametern in AMIRA erstellt wurde.

Der Entwurf der Spirale wurde anhand von bereits bekannten Parametern erstellt: Aus einer Spirale mit 3,5 Umdrehungen wurde eine mit 5,5 Umdrehungen generiert, da jenseits der 4. Umdrehung Markierungen erkannt werden konnten. Der Winkel von 30° und die Abstände von Windung zu Windung von 7-8 nm wurden berücksichtigt. Die für KAHRP Markierungen erhobenen Messungen bezüglich der Abstände der Goldpartikel zur Mittelachse der Spirale, der Abstände zueinander, der Winkelverhältnisse zur Spiralspitze und der Position bezogen zur Spirale wurden anhand von Tomogrammen von

Erythrozyten, welche mit Nonidet P40-Substitut (NP-40 S) behandelt wurden, erstellt. Die gemessenen Koordinaten der Goldpartikel wurden auf das Koordinatensystem des Spiralmodells übertragen. Die Goldpartikel mit einem Durchmesser von 5 nm, die an die Abschnitte von KAHRP mit 6 oder mehr Histidinen binden, zierte die Spiralblätter von oben nach unten. Simulationen der Bindungsabstände der Goldpartikel zu den Spiralblättern im Vergleich zu den experimentellen Daten ergaben mit dem Abstand von 6 nm die beste Übereinstimmung zwischen beiden Daten. Dieses Ergebnis war in guter Vereinbarung mit dem Abstand zwischen dem Histidin-Tag und dem Massenschwerpunkt des Goldpartikels von 4 nm (Größe der Nanosonde) und der präzisen Lokalisierung. Die zusätzliche Übereinstimmung im Neigungswinkel der experimentellen und simulierten Bindungsprofile unterstützte die Hypothese, dass die Goldpartikel an der Spirale gebunden waren und KAHRP ein Bestandteil der Spirale oder mit ihr assoziiert war.

Die Markierungen von Goldpartikel für Aktin waren vor allem im mittleren Teil der Spirale zu erkennen, zudem war die Anzahl dieser auch innerhalb der angepassten rekonstruierten Spirale hoch. Die Hypothese wurde aufgestellt, dass Aktinfilamente als Bestandteil des durch den *P. falciparum* reorganisierten Erythrozyten-Zytoskeletts in Verbindung mit der Spirale stehen. Da bekannt ist, dass diese mit Knobs verbunden sind, könnte Aktin als Anker der Spirale dienen und während der Zytoadhäsion den Scherkräften ausgesetzt sein. Im Vergleich zur Markierung von KAHRP, wurden die Erythrozyten mit einem hypotonischen Puffer lysiert.

Die Markierungen für Ankyrin, Tropomyosin, Tropomodulin, Protein 4.1, Adducin und Aktin sowie KAHRP mit primären und sekundären Antikörpern zeigten keine spezifischen Ergebnisse, da vermutlich die Zugänglichkeit zur antigenen Bindungsstelle nicht gewährleistet war.

Zur Untersuchung des Knob-Spiral Komplexes wurden infizierte Erythrozyten mit verschiedenen Detergentien behandelt. Tomogramme mit anschließender Auswertung der Nachweisbarkeit der Spirale wurden aufgezeichnet. Digitonin 0,3 %, CHAPSO 3 mM Pellet oder NP-40 S zeigten Ergebnisse mit sichtbaren spiralförmigen Fragmenten oder ringförmigen Strukturen. Diese beiden Strukturen sahen jedoch nicht vergleichbar aus, so dass die Interpretation mit Fehlern behaftet sein kann.

Die erzeugte 3D Spirale und die Verwendung von Detergentien zur Erstellung eines Aufreinigungsprotokolls sind als neue Methode für zukünftige Ansätze vorteilhaft. Die Bestimmung der optimalen Konzentration der Detergentien und ihrer Wirkung auf den Knob-Spiral Komplex sind unerlässlich, um mehr Informationen über die Parameter der Spirale zu erhalten und um endgültig beantworten zu können, ob KAHRP ein Bestandteil der Spirale ist. Zudem kann

der Analyseansatz genutzt werden, um Wechselwirkungen anderer Zytoskelettproteine mit der Spirale zu verstehen, wobei die Zugänglichkeit für Antikörper gewährleistet ist.