

Sophia Maria Frangos  
Dr. med.

## **Investigating KAHRP export kinetics by super-resolution time-lapse microscopy in *Plasmodium falciparum* blood stages**

Fach/Einrichtung: Infektiologie

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Michael Lanzer

Ein wesentlicher Faktor der Virulenz von *P. falciparum* ist ein Phänomen, das als Zytoadäsion bezeichnet wird, d.h. die Ablagerung infizierter Erythrozyten im Gefäßsystem des Wirts. Die Zytoadäsion kann zu Entzündungen und Hypoxien und in Folge zu schweren klinischen Symptomen wie der zerebralen Malaria führen. Entscheidend für die Fähigkeit des Parasiten zur Zytoadäsion ist die Bildung knubbel-förmiger Vorwölbungen an der Oberfläche der roten Blutkörperchen. Diese Komplexe dienen als Plattform für die Präsentation von PfEMP1, einer Familie von Proteinen, die die Adhäsion an Endothelrezeptoren wie CD36 und ICAM1 vermitteln. Trotz seiner wichtigen Rolle in der Pathogenität von Malaria ist nur teilweise geklärt, wie die Komponenten des Komplexes zur Erythrozytenoberfläche transportiert werden und wie die Knubbel zusammengebaut werden. Ziel unserer Studie war es daher, ein zeitliches Modell dafür zu entwickeln, wie der Parasit den Zusammenbau des Komplexes steuert, und zu diesem Zweck eine Methode zur Darstellung und Analyse des Proteinexports über den gesamten intraerythrozytären Lebenszyklus zu entwickeln.

Ich habe das Knob-associated-histidine-rich Protein (KAHRP) gewählt, da es eine Kernkomponente der Knubbel darstellt. Um den KAHRP Export sichtbar zu machen, setzte ich die CRISPR-Cas9-Genom-Editierungstechnologie zur Erzeugung einer Parasitenlinie ein, in der das fluoreszierende Protein mEOS3.2 endogen mit KAHRP fusioniert ist. Ich nutzte dafür zwei verschiedenen Parasitenstämmen, nämlich FCR3 und NF54 (hier zwei Kopien von mEOS). Der erfolgreiche Knock-in wurde auf Gen- und Proteinebene bestätigt und die korrekte Lokalisierung des Fusionsproteins an der Erythrozytenmembran konnte nachgewiesen werden. In einer phänotypischen Untersuchung mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie konnte ich zeigen, dass die C-terminale Fusion für Veränderungen der Knubbelmorphologie in der von FCR3 abgeleiteten Mutantenlinie verantwortlich war. Die von NF54 abgeleitete Mutantenlinie zeigte einen Phänotyp ohne Knubbel. Um KAHRP::mEOS3.2 vom Parasiten bis zu seiner Ankunft an der Erythrozytenmembran in lebenden Zellen zu verfolgen, nutzte ich das konfokale Airyscan Mikroskop. Dadurch konnte ich den Weg zur Erythrozytenmembran mit hoher räumlicher Auflösung sichtbar machen. Phototoxizität ist ein limitierender Faktor bei der Bildgebung in lebenden Zellen. Um dieses Problem zu lösen, habe ich mit S. Damrich zusammengearbeitet. Wir setzten das vortrainierte neuronale Netzwerkmodell cell-

pose ein, um den Durchlichtkanal für die Segmentierung der Membran und des Parasiten zu verwenden und die Notwendigkeit eines zweiten Fluoreszenzmarkers vollständig zu eliminieren. Wir erstellten einen kleinen Trainingsdatensatz für die beiden Segmentierungsaufgaben, um cellpose weiter zu trainieren und dadurch die Segmentierungsgenauigkeit zu verbessern. Wir validierten unseren Bildsegmentierungsansatz mit Hilfe qualitativer Metriken und erreichten eine Leistungsgenauigkeit, die im Bereich früherer Studien lag. Auf diese Weise konnte ich die Akkumulation von KAHRP in drei verschiedenen Kompartimenten (Membran, Zytosol, Parasit) im Zeitverlauf mit minimaler phototoxischer Wirkung auf die Zellen quantitativ messen und erhielt jeweils unterschiedliche kinetische Profile. Ich beobachtete eine konstante Produktion von KAHRP::mEOS3.2 im Parasiten während des gesamten Lebenszyklus mit einem frühen Beginn des Exports im Ringstadium. Es reicherte sich kontinuierlich an der Membran an, ohne ein Plateau zu erreichen, und insgesamt erreichte nur etwa die Hälfte der Gesamtmenge an KAHRP::mEOS3.2 die Membran. Die kontinuierliche Anreicherung an der Membran könnte auf eine Bedeutung für die schnelle Anpassung des Knubbelphänotyps an in vivo Bedingungen hinweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ich die Kinetik des KAHRP-Exports zur Membran während der Entwicklung des Blutstadiums charakterisiert und die zeitliche Beziehung zur Knubbelbildung entschlüsseln konnte. In zukünftigen Arbeiten können die Ergebnisse in mathematische Modelle integriert werden, um ein ganzheitliches Verständnis davon zu erlangen, wie der Parasit den Aufbau des Komplexes kontrolliert. Die Etablierung der Einzelzell-Zeitraffer-Mikroskopie in Kombination mit Deep-Learning-Bildsegmentierung ebnet den Weg für weitere kinetische Studien zu dynamischen zellulären Prozessen in *P. falciparum*-Blutstadien.