



BERNHARD NOCHT INSTITUTE
FOR TROPICAL MEDICINE



**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
und Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin**

Charakterisierung eines Oberflächenproteins *Plasmodium falciparum*
infizierter Erythrozyten (*PfEMP1_IT4_var16*), welches die Bindung an
verschiedene Endothelrezeptoren vermittelt

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Florian Kieferle, XXXXXXXXXX

Hamburg, 26. Juli 2023

Diese Arbeit wurde im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Iris Bruchhaus unter Betreuung von Johannes Allweier erstellt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie
Ulmenliet 20, 21033 Hamburg
2. Gutachter: Prof. Dr. Iris Bruchhaus
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Arbeitsgruppe Wirt-Parasit-Interaktion
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

Kurzzusammenfassung

Die *Plasmodium*-Arten sind die Erreger der Malaria. Vor allem *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) ist für die schweren Verläufe der Malaria verantwortlich. Dieser besitzt die Fähigkeit, einen von ihm infizierten Erythrozyten umzubauen und verschiedene Strukturen auszubilden. So werden auf der Oberfläche eines infizierten Erythrozyten *knobs* ausgebildet. In diesen *knobs* befinden sich spezielle Proteine aus der *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* (*PfEMP1*) -Familie, mit denen sich der infizierte Erythrozyt an Endothelzellen anhaften kann. Dies wird Zytoadhärenz genannt. Dabei kann es zu den schweren Symptomen der Malaria wie beispielsweise Organversagen oder der zerebralen Malaria kommen. Das geschieht, weil der Blutfluss in den kleinsten Blutgefäßen durch die Zytoadhärenz erheblich gestört werden kann. Die Zytoadhärenz ist eine Strategie des Parasiten, den Durchgang durch die Milz zu vermeiden. Dort würde dieser vom Immunsystem erkannt und zerstört werden. Über *PfEMP1* erfolgt die Bindung an Endothelrezeptoren, die sich auf den Endothelzellen befinden. Für das Verständnis der Pathogenität von *P. falciparum* ist es von Wichtigkeit, diese Bindungen zwischen den *PfEMP1*-Proteinen und den Endothelrezeptoren zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurde mit einer IT4-SLI-*var16*-Transfektante gearbeitet. Die Kultur einer solchen Transfektante exprimiert fast ausschließlich das *var16*-Gen. Die *var*-Gene kodieren für die unterschiedlichen *PfEMP1*s, von denen es pro Isolat etwa 60 verschiedene gibt. Normalerweise wechselt die Expression der *var*-Gene zu einem kleinen Teil nach jedem Durchlauf des asexuellen Lebenszyklus von *P. falciparum*. Mit der *selection-linked integration*-Methode (SLI) wird an das gewünschte *var*-Gen ein Resistenzgen über homologe Rekombination angefügt. Unter einem erzeugten Selektionsdruck können nur die Parasiten überleben, die das gewünschte *var*-Gen exprimieren. Es wurde die Bindung von *var16_PfEMP1* an verschiedene Endothelrezeptoren in statischen Bindungs-Assays mit Hilfe von transgenen CHO-745-Zellen untersucht, die den jeweiligen Rezeptor auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dabei wurden die Rezeptoren CD36, ICAM-1, TNFR2 und VCAM-1 als bekannte Bindungspartner von *var16_PfEMP1* verifiziert. Für MDR1, EPCR, TNFR1, CD9, CD37 und CD81 konnte keine signifikante Bindung festgestellt werden. Ein neuer Bindungspartner mit CD55 wurde für *var16_PfEMP1* gefunden. In einem Inhibitions-Assay wurde versucht, die Bindung zwischen *var16_PfEMP1* und dem Endothelrezeptor ICAM-1 zu hemmen. Dazu wurde ein ICAM-1-Antikörper eingesetzt. Die Hemmung war jedoch nicht erfolgreich. Grund hierfür könnte sein, dass der eingesetzte Antikörper ein monoklonaler Antikörper war. Dieser bindet an nur ein Epitop von ICAM-1. Hier wäre für zukünftige Experimente ein polyklonaler Antikörper wahrscheinlich besser geeignet.

Abstract

Plasmodium species are the causative agents of malaria. *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) in particular is responsible for the severe courses of malaria. The latter has the ability to remodel an erythrocyte infected by it and to form various structures. Knobs are formed on the surface of an infected erythrocyte. These knobs contain special proteins from the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP1*) family, which allows the infected erythrocyte to attach to endothelial cells. This process is called cytoadherence. It can lead to the severe symptoms of malaria such as organ failure or cerebral malaria. These symptoms appear as blood flow in the smallest blood vessels can be significantly disrupted by cytoadherence. Attachment to endothelial cells is a strategy of the parasite to avoid passing through the spleen, as it would be recognized and destroyed by the immune system. Via *PfEMP1*, binding occurs to endothelial receptors located on endothelial cells. To understand the pathogenicity of *P. falciparum*, it is important to characterize these bindings between *PfEMP1* proteins and endothelial receptors. In this work, an IT4-SLI-*var16* transfectant has been used. The culture of such a transfectant expresses almost exclusively the *var16* gene. The *var* genes encode the different *PfEMP1*s, of which there are about 60 different ones per isolate. Usually, the expression of the *var* genes switches to a small extent after each run of the asexual life cycle of *P. falciparum*. Using the selection-linked integration method (SLI), a resistance gene is added to the desired *var*-gene via homologous recombination. Under a generated selection pressure, only parasites expressing the desired *var*-gene can survive. The binding of *var16_PfEMP1* to different endothelial receptors has been investigated in static binding assays using transgenic CHO-745 cells presenting the respective receptor on their surface. The receptors CD36, ICAM-1, TNFR2, and VCAM-1 were verified as known binding partners of *var16_PfEMP1*. No significant binding was detected for MDR1, EPCR, TNFR1, CD9, CD37 and CD81. A new binding partner with CD55 has been found for *var16_PfEMP1*. An inhibition assay was performed in an attempt to inhibit binding between *var16_PfEMP1* and the endothelial receptor ICAM-1. An ICAM-1 antibody has been used for this purpose. However, the inhibition was not successful. Using a monoclonal antibody could be the reason for this result. A polyclonal antibody would probably be more suitable for future experiments.

Inhaltsverzeichnis

KURZZUSAMMENFASSUNG	III
ABSTRACT	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
TABELLENVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
1 EINLEITUNG	5
1.1 HINTERGRÜNDE UND FORSCHUNGSMOTIVATION.....	5
1.2 <i>P. FALCIPARUM</i> : DER LEBENSZYKLUS.....	6
1.3 UMBAU DES ERYTHROZYTEN DURCH <i>P. FALCIPARUM</i>	7
1.4 ZYTOADHÄRENZ.....	8
1.5 DIE VAR-GEN-FAMILIE UND <i>PfEMP1</i>	8
1.6 MECHANISMUS DER ZYTOADHÄRENZ.....	10
1.7 RELEVANTE HUMANE ENDOTHELREZEPTOREN.....	11
1.7.1 CD36.....	11
1.7.2 ICAM-1.....	11
1.7.3 VCAM-1 (<i>VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE 1</i>).....	12
1.7.4 TNFR1, TNFR2 (<i>TUMORNEKROSEFAKTOR-REZEPTOR 1 UND 2</i>).....	12
1.7.5 CD55.....	12
1.7.6 MDR1 (<i>MULTI-DRUG RESISTANCE PROTEIN 1</i>).....	13
1.7.7 EPCR.....	13
1.7.8 CD9, CD37 UND CD81.....	13
1.8 ZUSAMMENFASSUNG DER EINLEITUNG.....	14
2 PROJEKTIDEE	14
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 MATERIALIEN.....	16
3.1.1 LABOREQUIPMENT.....	16
3.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	17
3.1.3 BIOLOGISCHE UND CHEMISCHE SUBSTANZEN.....	18
3.1.4 VERWENDETE SOFTWARE.....	19
3.1.5 PLASMIDE.....	20
3.1.6 ANTIKÖRPER.....	20
3.1.7 PUFFER, MEDIEN UND ANDERE LÖSUNGEN.....	21
3.1.8 VERWENDETE ZELLINIEN.....	23
3.2 METHODEN ZUR KULTIVIERUNG VON CHO-ZELLEN UND <i>P. FALCIPARUM</i>	24
3.2.1 <i>IN VITRO</i> -KULTIVIERUNG VON CHO-ZELLEN.....	24
3.2.2 EINFRIEREN VON CHO-ZELLEN.....	25
3.2.3 AUFTAUEN VON CHO-ZELLEN.....	25
3.2.4 <i>IN VITRO</i> -KULTIVIERUNG VON <i>P. FALCIPARUM</i>	25

3.2.5	GIEMSA-FÄRBUNG	26
3.2.6	SYNCHRONISIERUNG DER <i>P. FALCIPARUM</i> -KULTUR MITTELS D-SORBITOL	26
3.2.7	EINFRIEREN EINER <i>P. FALCIPARUM</i> -KULTUR	26
3.2.8	AUFTAUEN EINER <i>P. FALCIPARUM</i> -KULTUR.....	27
3.2.9	<i>KNOB-ENRICHMENT</i>	27
3.3	METHODEN ZUR EXPRESSIONSANALYSE	28
3.3.1	IMMUNFLUORESCENZ-ASSAY	28
3.3.2	RNA-ISOLIERUNG FÜR TRANSKRIPTOMANALYSE	28
3.3.3	ÜBERPRÜFUNG DER QUALITÄT DER RNA-ISOLIERUNG	29
3.3.4	<i>NEXT GENERATION SEQUENCING</i> (NGS)	29
3.4	METHODEN ZUR ANALYSE DES BINDUNGSVERHALTENS VON IES.....	30
3.4.1	STATISCHES BINDUNGS-ASSAY	30
3.4.2	INHIBITIONS-ASSAY	31
3.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	31
4	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>32</u>
4.1	ÜBERPRÜFUNG DER IT4-SLI- <i>VAR16</i> -TRANSFEKTANTE.....	32
4.2	STATISCHE BINDUNGS-ASSAYS.....	34
4.3	INHIBITIONS-ASSAY	38
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>40</u>
5.1	ÜBERPRÜFUNG DER IT4-SLI- <i>VAR16</i> -TRANSFEKTANTE.....	40
5.2	STATISCHE BINDUNGS-ASSAYS.....	41
5.2.1	MÖGLICHE AUSWIRKUNG DER BINDUNG AN DEN JEWEILIGEN REZEPTOR	43
5.3	INHIBITIONS-ASSAY	43
6	<u>AUSBLICK</u>	<u>46</u>
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>49</u>
	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>56</u>
	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u>	<u>57</u>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltkarte, die die Malariafälle der Länder zeigt	5
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	6
Abbildung 3: <i>Maurer's clefts</i> in einem infizierten Erythrozyten.....	7
Abbildung 4: <i>Knob</i> -Struktur auf der Membran von iEs.....	8
Abbildung 5: Klassifizierung der Domänen und der <i>PfEMP1s</i>	9
Abbildung 6: Vergleich der Adhäsion an Endothelzellen von Leukozyten und <i>P. falciparum</i> iEs	10
Abbildung 7: Schematische Darstellung des IT4_ <i>var16</i> _ <i>PfEMP1</i>	15
Abbildung 8: Bilder des Immunfluoreszenz-Assay	32
Abbildung 9: Ergebnis der NGS-Analyse der IT4-Wildtyp (WT) -Population	33
Abbildung 10: Ergebnis der NGS-Analyse der IT4-SLI- <i>var16</i> -Transfektante	33
Abbildung 11: Bilder der Bindungs-Assays für die verwendeten ERs	36
Abbildung 12: Ergebnisse der Bindungs-Assays von <i>var16</i> _ <i>PfEMP1</i> mit den verschiedenen ERs	37
Abbildung 13: Ergebnisse des Inhibitions-Assays.....	39
Abbildung 14: NGS-Analyse einer IT4-SLI- <i>var22</i> -Transfektante	41
Abbildung 15: Oberflächenstruktur von ICAM-1	44
Abbildung 16: Oberflächenstruktur von ICAM-1 mit dem IB-Peptid und weiteren modifizierten Peptiden.....	45
Abbildung 17: Schematische Darstellung einer Flusskammer und des Experimentes eines Bindungs-Assays unter Flussbedingungen.....	47
Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Messvorganges mit SCFS	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CHO-745-Zelllinien die in dieser Arbeit verwendet wurden	24
Tabelle 2: Vorgeschlagene Antikörper für weitere Inhibitions-Assays	46

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
antiICAM-1	ICAM-1-Antikörper
APC	Aktiviertes Protein C
ATS	<i>acidic terminal segment</i>
BM	Bindungsmedium
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
C	Celsius
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CIDR	<i>cystein-rich interdomain region</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cyt	zytoplasmatischer Anteil
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBL	<i>duffy binding like</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dest.	destilliert
EPCR	<i>endothelial protein c receptor</i>
ERs	Endothelrezeptoren
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA-tag	Humaner Influenza Hemagglutinin-tag
His-tag	Polyhistidin-tag
HRV	Rhinovirus
H ₂ O	Wasser
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>

ICAM-2	<i>intercellular adhesion molecule 2</i>
iEs	infizierte Erythrozyten
IFA	Immunfluoreszenz-Assay
KAHRP	<i>knob-associated histidine-rich protein</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
M	Mol pro Liter
MCs	<i>maurer's clefts</i>
MDR1	<i>multi-drug resistance protein 1</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MTS	<i>malaria thawing solution</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NGS	<i>next generation sequencing</i>
Ni	Nickel
nN	Nanonewton
ns	nicht signifikant
NTS	<i>n-terminal segment</i>
p	p-Wert (Statistik)
PAR1	Protease aktivierter Rezeptor 1

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PD	Photodiode
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
pH	pondus hydrogenii - Potential des Wasserstoffs
PNAd	<i>anti-peripheral node addressin</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SCFS	<i>single cell force spectroscopy</i>
SLI	<i>selection-linked integration</i>
TM	Transmembrandomäne
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
U	Enzymeinheit - Mol pro Sekunde
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Hintergründe und Forschungsmotivation

Das Krankheitsbild Malaria wird durch verschiedene *Plasmodium*-Arten verursacht. Dabei handelt es sich um eukaryotische Einzeller. Die weibliche *Anopheles*-Mücke ist in den meisten Fällen für die Übertragung der Parasiten auf den Menschen verantwortlich. Für eine Infektion des Menschen kommen folgende Arten der Gattung *Plasmodium* infrage: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi*. Schwere Malaria wird fast ausschließlich durch *P. falciparum* ausgelöst. Oft äußert sich Malaria wie eine gewöhnliche Virusinfektion. Häufige Symptome sind dabei Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Übelkeit, leichte Diarrhö und weitere Symptome. Bei einem schweren Verlauf kann es zu einer zerebralen Malaria, zu Lungenödemen, akutem Nierenversagen und zu einer Anämie und Blutungen kommen. Diese Komplikationen können innerhalb von Stunden oder Tagen zum Tod führen. Von den schweren Verläufen sind vor allem Kleinkinder bis zu einem Alter von fünf Jahren betroffen (Trampuz et al. 2003; White 2008). Weltweit gab es 2021 etwa 247 Millionen Malariafälle, 619 000 davon verliefen tödlich (WHO 2022). Abbildung 1 zeigt, welche Länder von Malaria betroffen sind. Am stärksten betroffen sind vor allem afrikanische Länder. 82 % aller Fälle und 95 % aller tödlichen Verläufe in den Jahren 2000 bis 2021 gab es in Afrika (WHO 2022).

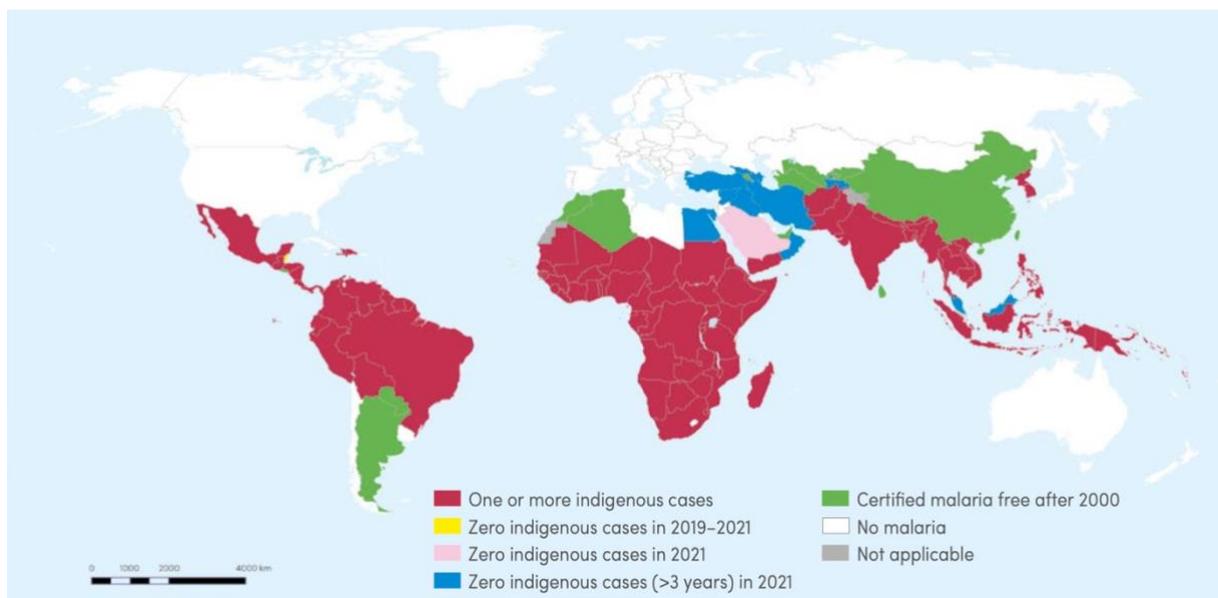


Abbildung 1: Weltkarte, die die Malariafälle der Länder zeigt

Gezeigt sind Länder mit Malariafällen im Jahr 2021 mit einem oder mehreren Fällen (rot). Weiter sind Länder gezeigt, in denen es seit drei Jahren (gelb), seit 2021 (pink), seit mehr als drei Jahren (blau) und seit 2000 (grün) keine Fälle gibt. Ebenfalls sind Länder markiert, in denen es auch vor dem Jahr 2000 keine Fälle gab (weiß) und Länder über die es keine zuverlässigen Informationen gibt (grau) (WHO 2022).

1.2 *P. falciparum*: der Lebenszyklus

Als Sporozoiten werden die Parasiten durch eine weibliche *Anopheles*-Mücke auf den Menschen übertragen, indem die Parasiten in das subkutane Gewebe oder auch direkt in den Blutkreislauf beim Stechen injiziert werden (Abb. 2). Die Sporozoiten wandern zur Leber und dringen in die Hepatozyten ein. Aus jedem Sporozoit entwickeln sich bis zu 30 000 Merozoiten, welche in der Lage sind, in die roten Blutkörperchen einzudringen. Das Krankheitsbild der Malaria beginnt an dieser Stelle bei der ungeschlechtlichen Vermehrung des Parasiten in den roten Blutkörperchen. Im Erythrozyten durchläuft der Parasit mehrere Stadien. Es bildet sich zunächst das Ring-Stadium aus, worauf der Trophozoit folgt, der reife Schizont und neue Merozoiten. Diese sind in der Lage, weitere Erythrozyten zu befallen. Aus jedem Schizont im Erythrozyten bilden sich etwa 20-32 neue Merozoiten. Der Entwicklungszyklus im Blut ist nach ungefähr 48 Stunden einmal durchlaufen. Aus einem geringen Anteil der Merozoiten werden Gametozyten gebildet. Diese verursachen kein Krankheitsbild. Sie werden benötigt, um, nachdem sie von einer weiblichen *Anopheles*-Mücke aufgenommen wurden, sich in der Mücke geschlechtlich zu vermehren. Somit ist der Lebenszyklus des Parasiten einmal durchlaufen (Belachew 2018; Miller et al. 2002).

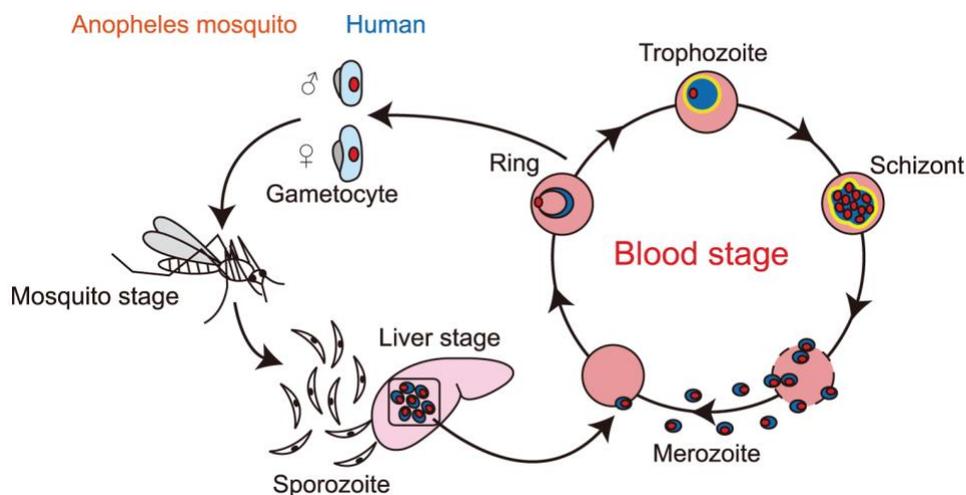


Abbildung 2: Lebenszyklus von *P. falciparum*

Die Sporozoiten werden durch die weibliche *Anopheles*-Mücke auf den Menschen übertragen. Diese wandern zur Leber und entwickeln sich zu Merozoiten. Die Merozoiten sind in der Lage in rote Blutkörperchen einzudringen. Dort durchlaufen Sie einen Zyklus von etwa 48 Stunden. Am Ende dieses Zyklus werden neue Merozoiten freigesetzt. Diese können weitere Erythrozyten befallen. Ein kleiner Anteil der Merozoiten entwickelt sich zu Gametozyten. Diese werden von einer *Anopheles*-Mücke bei ihrer Mahlzeit aufgenommen und verlassen die Blutphase. Die Gametozyten entwickeln sich in der Mücke weiter und dienen der geschlechtlichen Fortpflanzung des Parasiten in der Mücke (Enomoto et al. 2012; Belachew 2018; Miller et al. 2002).

1.3 Umbau des Erythrozyten durch *P. falciparum*

Da der Erythrozyt nichts für die Synthese oder den Transport von Proteinen und anderen Bestandteilen für den eingedrungenen Parasiten bereitstellt, muss der Eindringling die Wirtszelle umbauen, um zu überleben. Der Parasit ist im Erythrozyten in eine parasitophore Vakuole eingebettet. Eine wichtige Struktur, die sich ausbildet, sind die *maurer's clefts* (MCs) (Abb. 3). Diese werden durch den Parasiten gebildet, befinden sich im Zytosol der Wirtszelle und ähneln einer Golgi-Membranstruktur. Einige Proteine, die den Parasiten verlassen, lokalisieren sich dauerhaft in den MCs. Manche Proteine, die zur Erythrozytenmembran gelangen sollen, sind für einige Zeit in den MCs zu finden. Beispielsweise werden die *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1)-Moleküle mit Hilfe der MCs an die Oberfläche der infizierten Erythrozyten (iEs) transportiert (Mundwiler-Pachlatko and Beck 2013). Weitere wichtige Strukturen sind die *knobs*. Dabei handelt es sich um Ausstülpungen auf der Oberfläche der iEs im Trophozoiten- und Schizontenstadium. Eine der wichtigsten Komponenten für den Aufbau der *knobs* ist das *knob-associated histidine-rich protein* (KAHRP). PfEMP1 ist in diesen *knobs* auf der Oberfläche lokalisiert und wird unter anderem durch KAHRP dort verankert (Abb. 4). Die PfEMP1s führen zu einer Zytoadhärenz der iEs an die Endothelzellen. Diese Zytoadhärenz ist ein entscheidender Faktor bei den schweren Verläufen der Malaria (Prajapati and Singh 2013). Es kann dabei zu einem gestörten mikrovaskulären Blutfluss kommen, indem beispielsweise gerinnungsfördernde Prozesse ausgelöst werden (Smith et al. 2013).



Abbildung 3: Maurer's clefts in einem infizierten Erythrozyten

Die Membranstruktur der MCs (schwarzer Pfeil) ähnelt der Membranstruktur eines Golgi-Apparates. Das gezeigte Bild ist eine Elektronen-Mikroskop-Aufnahme (Mundwiler-Pachlatko and Beck 2013).

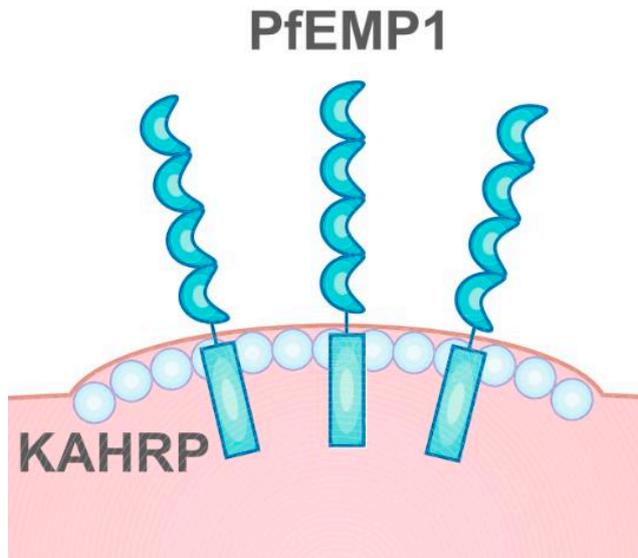


Abbildung 4: Knob-Struktur auf der Membran von iEs

PfEMP1 ist in den *knobs* lokalisiert, welche von KAHRP hauptsächlich gebildet und gestützt werden (Chan, Fowkes, and Beeson 2014; Prajapati and Singh 2013).

1.4 Zytoadhärenz

Die Milz spielt eine sehr wichtige Rolle für das Immunsystem des Menschen. Unter anderem dient sie als Filter, um Erythrozyten aus dem Blutkreislauf zu entfernen die physiologisch alt oder pathologisch in ihrer Gestalt verändert sind. Erythrozyten müssen in der Milz durch interendotheliale Schlitze wandern, die an der breitesten Stelle 4 µm dünn sind. Verformte Erythrozyten, wie die iEs bei einer *P. falciparum*-Infektion, werden zurückgehalten und von Makrophagen phagozytiert (Pivkin et al. 2016; Lee, Russell, and Rénia 2019). Aus diesem Grund versucht der Parasit den Durchgang durch die Milz zu vermeiden, indem sich die iEs an Endothelzellen anheften. Dieser Prozess wird Zytoadhärenz genannt. Für diese Zytoadhärenz sind verschiedene Gruppen von Parasiten abgeleitete variante Oberflächenantigene verantwortlich. Zu diesen Oberflächenantigenen zählen die *PfEMP1*s (Lee, Russell, and Rénia 2019).

1.5 Die *var*-Gen-Familie und *PfEMP1*

Die *PfEMP1*s werden von der *var*-Gen-Familie kodiert. Pro Parasitenisolat gibt es etwa 60 verschiedene *var*-Gene (Smith 2014). Im Ringstadium wird ein einzelnes *var*-Gen für eine Zeit von 10 bis 14 Stunden exprimiert. Im Schizontenstadium hört die Transkription auf. Das *var*-Gen bleibt jedoch epigenetisch markiert, um im nächsten Zyklus in den meisten Zellen wieder aktiviert zu werden. In wenigen Zellen wird das *var*-Gen deaktiviert und ein anderes Mitglied der Familie exprimiert. Dies ist eine Strategie, um das Immunsystem zu umgehen. Der Mechanismus, in dem ein Parasit immer nur ein *var*-Gen der etwa 60 verschiedenen exprimiert,

wird *mutually exclusive expression* genannt (Guizetti and Scherf 2013). Die *var*-Gene bestehen aus zwei unterschiedlichen Domänen, der *duffy binding like* (DBL) und der *cystein-rich interdomain region* (CIDR). Kombinationen dieser Domänen werden nach ihren Bindungsverhalten und Sequenzmotiven in Untergruppen eingeordnet (Abb. 5) (Montgomery et al. 2007; Gardner et al. 2002).

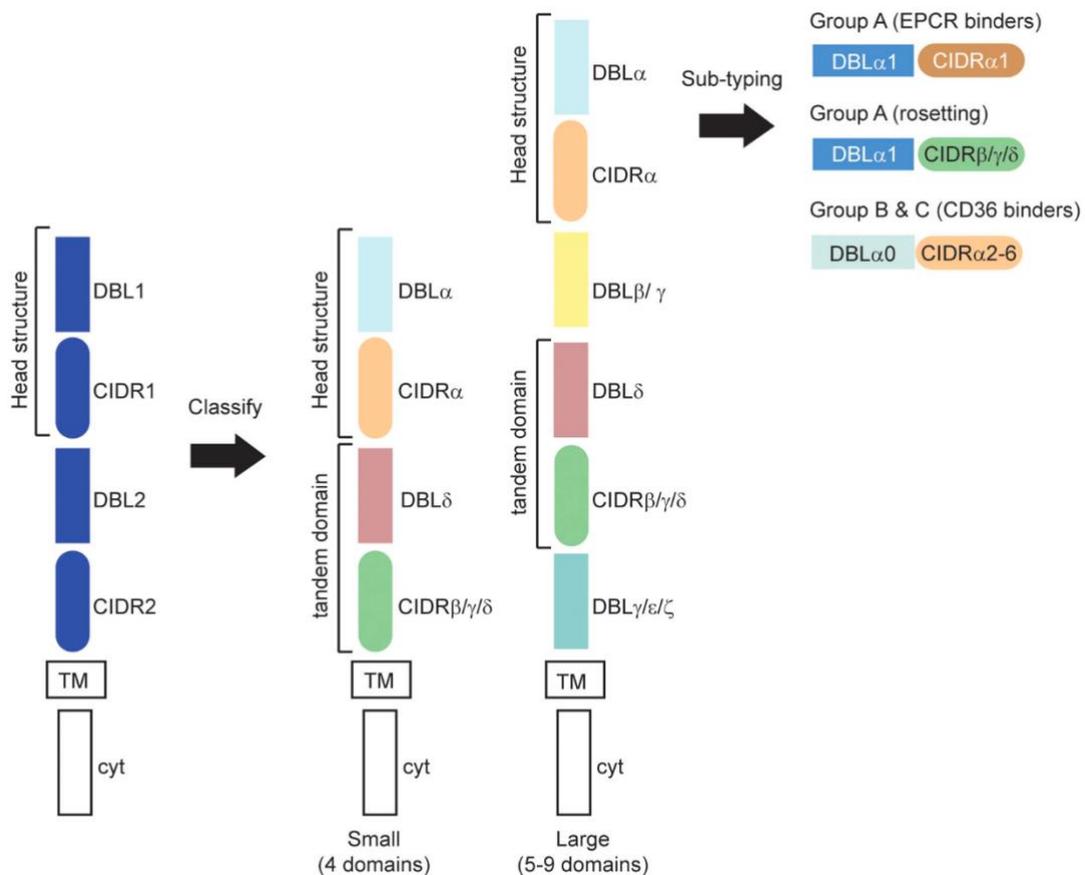


Abbildung 5: Klassifizierung der Domänen und der PfEMP1s

Das blaue PfEMP1 (ganz links) stellt eine typische Anordnung von Domänen dar. Alle PfEMP1s haben einen hochkonservierten zytoplasmatischen Anteil (cyt), gefolgt von einer Transmembrandomäne (TM). Es folgen bestimmte DBL-CIDR-Tandemdomänenanordnungen, die klassifiziert werden können in zum Beispiel CIDR β -DBL δ . Die PfEMP1s enden mit einer Kopfstruktur aus beispielsweise CIDR α und DBL α . Hier kann eine weitere Klassifizierung in Untergruppen erfolgen. Gruppe A bindet an EPCR (*endothelial protein c receptor*) und es kann in dieser Gruppe dazu kommen, dass iEs an nicht infizierte Erythrozyten binden (*rosetting*). Gruppe B und C sind unter anderem CD36-Binder (Smith 2014; Wahlgren et al. 1990).

1.6 Mechanismus der Zytoadhärenz

Die Sequestrierung der iEs an Endothelzellen ähnelt dem Adhäsionsvorgang von Leukozyten an Endothelzellen. Leukozyten fließen normalerweise passiv mit dem Blutstrom. Erfolgt ein Entzündungsreiz, können diese erst entlang des Endothels rollen und dann fest daran haften bleiben (Abb. 6). Dies geschieht über bestimmte Endothelrezeptoren (ERs). Es folgt das Eindringen in das umliegende Gewebe. Erythrozyten haften normalerweise nicht an das Endothel an. Wie schon beschrieben ändert sich dies bei iEs durch die Ausbildung von *knobs* und den darin befindlichen *PfEMP1s* (Helms et al. 2016).

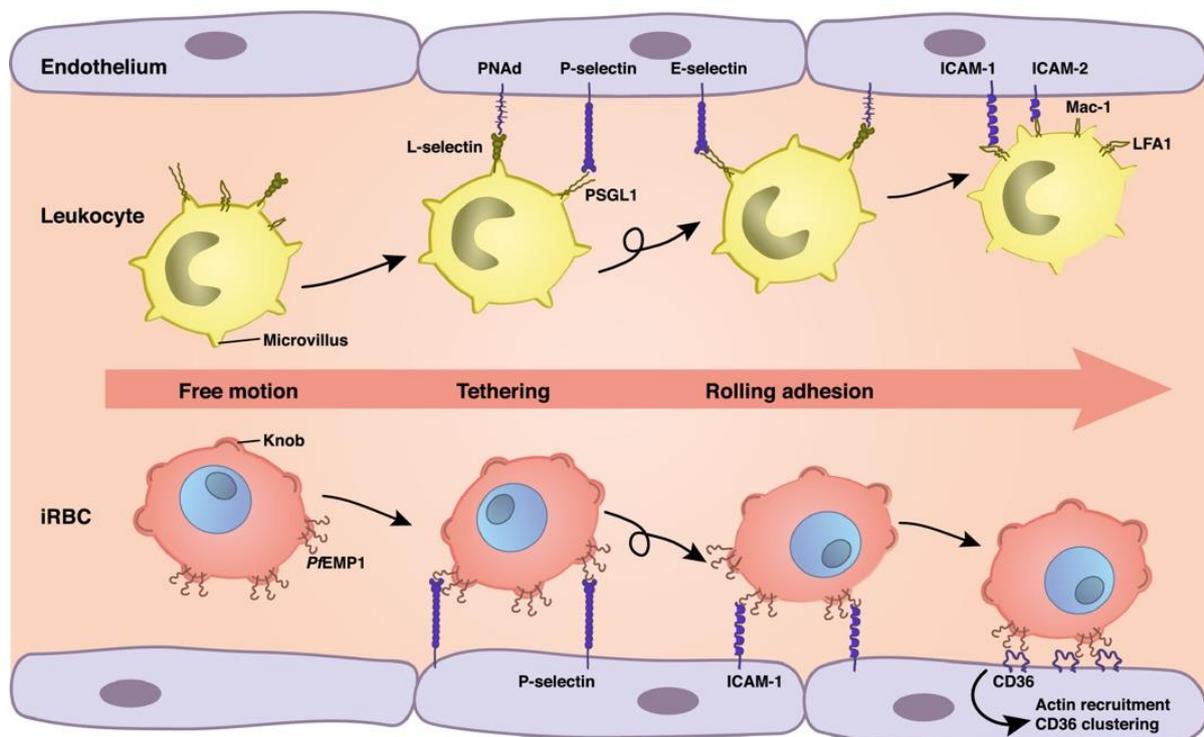


Abbildung 6: Vergleich der Adhäsion an Endothelzellen von Leukozyten und *P. falciparum* iEs

Adhäsine wie das L-Selektin, die sich auf den Spitzen der Mikro villi von Leukozyten befinden, führen zu einer Anbindung (*Tethering*) an unter anderem sulfatierte Sialyl-Lewis X-ähnliche Zucker (z. B. PNAd (*anti-peripheral node addressin*)). Es folgt das Rollen über E-Selektin, dann die feste Bindung an ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) und ICAM-2. Die iEs (hier irBC) werden mittels der *PfEMP1s* von dem P-Selektin abgefangen, rollen über ICAM-1 und haften fest an CD36 (Helms et al. 2016).

Es gibt mehrere Studien, die die Bedeutung der ERs CD36, P-Selektin und ICAM-1 für die Zytoadhärenz der iEs nachweisen (Craig, Khairul, and Patil 2012; Yipp et al. 2007). Zum gezeigten Modell in Abbildung 6 gibt es auch alternative Theorien, da beispielsweise P-Selektin nur an wenige *PfEMP1s* bindet. Außerdem findet sich das P-Selektin nur auf der Oberfläche, wenn die Zellen vorher mit entzündungsauslösenden Reagenzien stimuliert wurden. Auch die

Rolle von CD36 ist noch umstritten, da sowohl Rollverhalten als auch feste Adhäsion der iEs an diesen Rezeptor beschrieben wurde (Gotsch et al. 1994; Lubiana et al. 2020). Ein alternativer Vorschlag ist, dass das anfängliche Rollen der iEs über CD36 geschieht und danach eine feste Bindung an andere ERs stattfindet (Lubiana et al. 2020). Des Weiteren wird vorgeschlagen, dass nach anfänglicher Adhäsion und Rollen über CD36, die Endothelzellen nach einiger Zeit aktiviert werden und es zur Freisetzung von Zytokinen kommt. Durch die Zytokine erfolgt die Präsentation verschiedener ERs auf den Epithelzellen und die Bindung der *PfEMP1s* mit den unterschiedlichen Phänotypen kann stattfinden (Bachmann et al. 2022).

1.7 Relevante humane Endothelrezeptoren

In diesem Kapitel werden die Endothelrezeptoren vorgestellt, die für diese Arbeit verwendet wurden.

1.7.1 CD36

CD36 ist ein Transmembran-Glykoprotein mit einer Größe von etwa 88 kDa. Der Rezeptor befindet sich auf Blutplättchen, Adipozyten, Phagozyten, Hepatozyten, Myozyten, sowie auf mikrovaskulären Endothelzellen (Silverstein and Febbraio 2009). In den Gefäßen von Leber, Lunge, Muskeln und der Milz wird CD36 stark exprimiert, in Gefäßen des Gehirns hingegen nur sehr schwach (G. D. H. Turner et al. 1994). Zu den Liganden zählen Thrombospondin-1, langkettige Fettsäuren, Kollagene, anionische Phospholipide, Sichelerythrozyten und weitere Moleküle (Febbraio, Hajjar, and Silverstein 2001). CD36 ist einer der ersten identifizierten Rezeptoren, an die eine Bindung von iEs beobachtet wurde. Die Bindung von iEs an CD36 ist sehr häufig und findet sich vor allem bei den unkomplizierten Verläufen der Malariaerkrankung (Hviid and Jensen 2015; Ochola et al. 2011). Sowohl eine statische Bindung an CD36 als auch rollende Adhäsion wurden beschrieben (Antia, Herricks, and Rathod 2007; Lubiana et al. 2020).

1.7.2 ICAM-1

ICAM-1 ist ein Transmembran-Glykoprotein und gehört zur Immunglobulin-Superfamilie (Rowe et al. 2009). Es wird auf der Oberfläche von Immunzellen, Epithel-, Endothelzellen, Monozyten, Lymphozyten und weiteren Zelltypen in geringen Mengen exprimiert (Egal et al. 2014; Couffinhal et al. 1994). Bei der Adhäsion und Migration von Leukozyten an Endothelzellen spielt ICAM-1 eine wichtige Rolle (Barreiro et al. 2002). Die Expression kann

durch Endotoxine und Zytokine, wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) und Interleukin-1, hochreguliert werden. ICAM-1 ist bei der Zell-Zell-Adhäsion wichtig (Couffinhal et al. 1994). Während einer Malariainfektion wird die Expression von ICAM-1 stark hochreguliert, da vermehrt Zytokine ausgeschüttet werden (Hunt and Grau 2003). Bei zerebraler Malaria scheint ICAM-1 eine Bedeutung zu haben (Ochola et al. 2011; G. D. H. Turner et al. 1994). Wie bei CD36 wird auch bei ICAM-1 rollende und statische Bindung beobachtet (Antia, Herricks, and Rathod 2007; Lubiana et al. 2020).

1.7.3 VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)

VCAM-1 ist ein Sialoglykoprotein, strukturell eng mit ICAM-1 verwandt und gehört ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie (Rowe et al. 2009). Es ist auf ruhenden Zellen nicht exprimiert, die Expression wird aber durch Zytokine induziert. An der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen ist VCAM-1 beteiligt (Barreiro et al. 2002). Es wurde bereits gezeigt, dass VCAM-1 auch für die Bindung von iEs an Endothelzellen verantwortlich ist. Welche Rolle es bei den schweren Verläufen der Malaria spielt, wurde noch nicht untersucht (Rowe et al. 2009).

1.7.4 TNFR1, TNFR2 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 und 2)

Bei TNFR1 und TNFR2 handelt es sich um Transmembranproteine. Diese gehören zur TNF-Rezeptor-Superfamilie. Sie weisen cysteinreiche Domänen auf ihrer extrazellulären Seite auf. Der wichtigste Ligand ist TNF α . Dieses Zytokin beeinflusst fast jede Art von Zelltyp und stimuliert zum Beispiel die Zellproliferation und Differenzierung (Wajant and Siegmund 2019). Es konnte bereits gezeigt werden, dass *P. falciparum* iEs an diese Rezeptoren binden (Esser et al. 2014; Brehmer 2021).

1.7.5 CD55

Es handelt sich um ein Membranprotein, welches über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert ist. CD55 wird im ganzen Körper exprimiert (Ruiz-Argüelles and Llorente 2007). Auf Epithelzellen ist CD55 ein Rezeptor für bakterielle und virale Krankheitserreger. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion von *P. falciparum*-Merozoiten in die roten Blutkörperchen. Auf der Oberfläche von Erythrozyten ist dieser Rezeptor auch zu finden (Egan et al. 2015).

1.7.6 MDR1 (*multi-drug resistance protein 1*)

MDR1 ist ein glykosyliertes Transmembranprotein, welches im gesamten Körper exprimiert wird. Als Membrantransport-Protein schleußt es unter anderem toxische Substanzen aus der Zelle (Sakaeda, Nakamura, and Okumura 2003). Die Bindung von iEs an MDR1 konnte bereits beobachtet werden (Esser et al. 2014).

1.7.7 EPCR

EPCR wird auf Endothelzellen in den meisten Geweben exprimiert. Der Hauptligand Protein C bindet an EPCR und wird in aktiviertes Protein C (APC) umgewandelt. Auf Endothelzellen wird der Protease aktivierte Rezeptor 1 (PAR1) von APC gespalten. Dies führt zu einer entzündungshemmenden und zellschützenden Wirkung. Es kann dazu kommen, dass die Endothelzellen zerstört und proinflammatorische Signalwege aktiviert werden, wenn die EPCR-APC-Bindung fehlt, PAR1 aber aktiviert wurde. Verschiedene CIDR α 1-Domänen wurden als Bindungspartner für EPCR identifiziert. EPCR bindende Domänen werden häufig von Parasiten exprimiert, die aus Kindern mit schwerer und zerebraler Malaria isoliert wurden. Dies deutet darauf hin, dass EPCR und CIDR α 1 für eine schwere Malaria entscheidend sind (L. Turner et al. 2013).

1.7.8 CD9, CD37 und CD81

CD9, CD37 und CD81 gehören zur Familie der Tetraspanine. Dabei handelt es sich um Proteine mit jeweils vier Transmembrandomänen (Charrin et al. 2014). CD9 und CD81 sind in vielen Geweben exprimiert, während CD37 auf Leukozyten und hämatopoetische Zellen beschränkt ist (van Spriel et al. 2004). CD81 wird von den *P. falciparum*-Sporozoiten genutzt, um in die Leberzellen einzudringen (Silvie et al. 2003). CD9 in Kombination mit ICAM-1, VCAM-1 und CD151, einem weiteren Tetraspaninrezeptor, ist für die Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten von Bedeutung. Die Assoziation der Tetraspanine mit ICAM-1 und VCAM-1 ist dafür entscheidend. (Barreiro et al. 2005). Binden iEs an CD9, so könnte dies negative Folgen für die transendotheliale Lymphozyten-Migration haben (Barreiro et al. 2005), was einen schweren Verlauf der Malaria begünstigen könnte. CD9, CD37 und CD81 konnten als Bindungspartner bereits festgestellt werden (Esser et al. 2014; Roth 2019).

1.8 Zusammenfassung der Einleitung

Von Malaria sind weltweit viele Menschen betroffen und es gibt viele hunderttausend Todesfälle jedes Jahr. Vor allem Kleinkinder sind von den schweren Verläufen betroffen (WHO 2022). Das schwere Krankheitsbild wird hauptsächlich durch *P. falciparum* ausgelöst (Trampuz et al. 2003). Ursache dafür ist, dass sich die iEs an die Endothelzellen anheften und der mikrovaskuläre Blutfluss gestört wird (Smith et al. 2013). Diese Zytoadhärenz geschieht vor allem durch die PfEMP1s, die sich in den *knobs* auf den iEs befinden (Prajapati and Singh 2013). Die PfEMP1s sind in der Lage an verschiedene ERs zu binden (Helms et al. 2016). Dadurch entgeht der Parasit dem Durchgang durch die Milz, um zu vermeiden, dass dieser dort vom Immunsystem erkannt und eliminiert wird (Lee, Russell, and Rénia 2019).

2 Projektidee

Für die Entwicklung von Medikamenten und Vakzinen gegen eine Malariaerkrankung ist es von Bedeutung, die grundlegenden Mechanismen der Pathogenität von *P. falciparum* zu verstehen. Dazu ist es unter anderem nötig, die Bindung der unterschiedlichen PfEMP1-Proteine an die verschiedenen ERs zu charakterisieren. Bisher wurde in Experimenten versucht, eine Population an Parasiten zu erhalten, die nach Möglichkeit nur ein *var*-Gen exprimiert, indem man diese über einen bestimmten Bindungspartner (Rezeptor) angereichert hat (Scherf et al. 1998). Das Expressionsprofil solcher angereicherten Parasitenkulturen zeigt jedoch immer eine gemischte *var*-Expression, da die verschiedenen PfEMP1s zu einem spezifischen Rezeptor gleiche Bindungseigenschaften aufweisen können (Gölnitz, Albrecht, and Wunderlich 2008). Zum anderen wechselt die Expression der *var*-Gene zu einem gewissen Prozentsatz nach jedem asexuellen Zyklus (Guizetti and Scherf 2013). Auf diese Art ist es demnach nicht möglich Experimente mit nur einem bestimmten exprimierten *var*-Gen zu durchlaufen.

Mit der *selection linked integration* (SLI) -Methode ist es möglich, dass eine Parasitenpopulation immer nur ein *var*-Gen exprimiert. Das 3'-Ende des gewünschten *var*-Gens wird über homologe Rekombination mit einem HA-*tag* (Humaner Influenza Hemagglutinin-*tag*), einem T2A-Skip-Peptid und einem Neomycin-Phosphotransferase-Gen gekoppelt. Es können nur die Parasiten überleben, die das gewünschte *var*-Gen exprimieren, wenn Neomycin (G418) hinzugegeben wird. Das Skip-Peptid ist nötig, damit sich bei der Translation zwei getrennte Proteine bilden (Birnbaum et al. 2017). Der HA-*tag* kann später für einen Immunfluoreszenz-Assay (IFA) verwendet werden.

Für diese Arbeit wurde die IT4-SLI-*var16*-Transfektante eingesetzt. Damit ist es möglich, die Bindungseigenschaften des *PfEMP1*-Proteins zu untersuchen, welches von *var16* exprimiert wird (Abb. 7). Die Transfektante wurde von Jakob Cronshagen (AG Bruchhaus/Spielmann) hergestellt und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe von statischen Bindungs-Assays sollen bereits bekannte ERs, an die *var16_PfEMP1* bindet, nochmals untersucht und verifiziert werden. Aber auch neue mögliche Bindungspartner werden in dieser Arbeit untersucht.



Abbildung 7: Schematische Darstellung des IT4-*var16*-*PfEMP1*

An der ATS (*acidic terminal segment*)-Domäne befindet sich intrazellulär gekoppelt der HA-*tag*. Darauf folgt die Transmembrandomäne, an welche weitere Proteindomänen anknüpfen. Es ist bereits bekannt, dass CIDR α 5 an CD36 und die DBL β 5-Domäne an ICAM-1 bindet. NTS: *n-terminal segment* (Bachmann et al. 2022).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Laborequipment

Art des Gerätes	Spezifikation	Hersteller
Bioanalyser	Agilent 2100	Agilent Technologies
Inkubator mit CO ₂	Function Line	Heraeus Instruments
Mikroskop	ECLIPSE TS100	Nikon
Mikroskop	CX31	Olympus
Mikroskop	BZ-9000	Keyence
Mikroskop	EVOS XL	Thermo Fisher Scientific
pH-Meter	CG840	Sartorius AG
Photometer	NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank	Class II BSC	ESCO Labculture®
Waage	Sartorius BP210S	Sartorius AG
Wasserbad	SW 20	Julabo
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
Zellzählgerät	Countess 2 FL	Thermo Fisher Scientific

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Anbieter
24-well-tissue culture plate (flat bottom with lid)	Sarstedt
1,5/2 ml <i>safe-lock</i> Reaktionsgefäße	Eppendorf
15/50 ml Konische Zentrifugationsröhrchen	Sarstedt
ER-208B-CE24, 10 well 6.7 mm	Thermofisher Scientific
Gewebekultur <i>coverslips</i> 13 mm (Plastik)	Sarstedt
Gewebekulturflasche 250 ml (T75) mit Filter im Deckel	Sarstedt
Gewebekulturflasche 50 ml (T25) mit Filter im Deckel	Sarstedt
Millipore Stericup Vacuum Filter 0,22 µm	Merck
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Nalgene Thermo Scientific
Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Pasteurpipette	Brand
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt
PureLink RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific
Serologische Plastikpipetten 5/10/25 ml	Sarstedt

3.1.3 Biologische und chemische Substanzen

Name	Anbieter
Aceton	Roth
Accutase (500 ml)	PAN-Biotech
Albumax	Life Technologies
Ampicillin	Roth
Chloroform	Roth
DAPI	Roche
DMSO 250 ml	Roth
G418 Disulfate Salt	SIGMA-ALDRICH
Glycerol	Merck
Gelatine	Merck
Gentamycin	Ratiopharm
Giemsa (500 ml)	Merck
Glutaraldehyd (25 %)	Merck
Glucose (wasserfrei)	Roth
Ham's F12 Medium mit L-Glutamin und 25 mM HEPES	PAN-Biotech
Hypoxanthin	Sigma
Immersionsöl 518 N	Zeiss
Inaktiviertes fetales Rinderserum	Capricorn
KCl	Roth

Name	Anbieter
KH ₂ PO ₄	Roth
Leica CV Mount	Leica Biosystems
Menschliches Blut (0+)	Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
NaCl	Roth
NaHCO ₃	Sigma
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	Sigma
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Life Technologies
RPMI-1640 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES; ohne NaHCO ₃	AppliChem
Sorbitol (D-Sorbitol)	Sigma
TRIzol reagent	Life Technologies
Zeocin	InvivoGen

3.1.4 Verwendete Software

Name	Anbieter
Cellprofiler	Anne E. Carpenter
Ilastik	Christoph Sommer
Photoshop	Adobe
Prism® (Version 9)	GraphPad

3.1.5 Plasmide

Name	Anbieter
pAcGFP1-N1	Clontech Laboratories
pEGFP-N1	Clontech Laboratories

3.1.6 Antikörper

Name	Anbieter
Alexa Fluor 488 <i>goat anti-rabbit IgG superclonal</i> (Invitrogen A27034)	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor 594 <i>goat anti-rat</i> (Invitrogen A11007)	Thermo Fisher Scientific
ICAM-1-Antikörper (Monoklonal)	Abnova
<i>rabbit anti-KAHRP</i>	AG Bruchhaus
<i>rat anti-HA</i>	AG Bruchhaus
α CP5 (unspezifisch, Maus, Monoklonal)	AG Bruchhaus

3.1.7 Puffer, Medien und andere Lösungen

Für CHO-Zellkultur

Zellkulturmedium (Komplettmedium, steril filtriert)

Ham's F12 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES	500 ml
Inaktiviertes Fetales Kälberserum	50 ml
Penicillin/Streptomycin Mix (100 x)	5 ml
Lagerung bei 4 °C für maximal 4 Wochen	

Gefrierlösung für CHO-Zellen

CHO-Zellkulturmedium (Komplettmedium: Ham's F12)	45 ml
DMSO (10 %, steril)	5 ml
Lagerung bei 4 °C	

10 x PBS für die CHO-Zellkultur, autoklaviert

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	100 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM
In dest. H ₂ O, pH 7,4	

Für *P. falciparum*-Kultur

RPMI mit Albumax (Kultivierungsmedium), steril filtriert

RPMI 1640	1,587 % (w/v)
Albumax	0,5 % (v/v)
NaHCO ₃	12 mM
Glucose	6 mM
Hypoxanthine	0,2 mM
Gentamycin	0,4 mM
In dest. H ₂ O, pH 7,2	

Bindungsmedium (BM), steril filtriert

RPMI 1640	16,4 g
Glucose	20 g
In 1 liter dest. H ₂ O, pH 7,2	

Synchronisierungslösung (5 %iges D-Sorbitol, steril filtriert)

D-Sorbitol	25,0 g
in 500 ml dest. H ₂ O	
Lagerung bei 4 °C	

Einfrierlösung, steril filtriert

D-Sorbitol	3 g
NaCl	0,65 g
dest. H ₂ O	72 ml
Glycerol (autoklaviert)	28 ml
Lagerung bei 4 °C	

Auftaulösung, steril filtriert (*malaria thawing solution* (MTS))

NaCl	35 g
In 1 l dest. H ₂ O	
Lagerung bei 4 °C	

Giemsalösung (10 %)

Giensa	10 ml
In 90 ml H ₂ O	

Medium für *knob-enrichment*

RPMI 1640	16,4 g
in 1 l dest. H ₂ O, pH 7,2	

Gelatinelösung (1 %), steril filtriert

Gelatine	1 g
in 100 ml RPMI 1640	16,4 g/l

Weiser-Puffer

Na ₂ HPO ₄	2,09 g
KH ₂ PO ₄	0,49 g
In 1 l dest. H ₂ O	

3.1.8 Verwendete Zelllinien

Für diese Arbeit wurden CHO-745-Zellen für die Expression der gewünschten ERs verwendet. Diese Zelllinie weist einen Defekt in der Biosynthese von Glykosaminoglykan-Ketten auf. Der plazentare Adhäsionsrezeptor Chondroitin-4-Sulfat, an den *P. falciparum* iEs normalerweise binden, ist auf der Oberfläche daher nicht exprimiert (Brehmer 2021). Die hier verwendete CHO-745-Zelllinie wurde mit den Plasmiden pAc-GFP1-N1_ERxy und pEGFP-N1_ERxy transfiziert. Diese enthalten die Sequenz von jeweils einem Endothelrezeptor und dem Expressionsmarker GFP (*green fluorescent protein*). Der extrazelluläre Anteil des daraus entstehenden Fusionsproteins besteht ausschließlich aus dem Rezeptor. Das GFP ist intrazellulär und beeinflusst die extrazelluläre Domäne nicht (Brehmer 2021). Eine CHO-GFP-Zelllinie, bei der nur das intrazelluläre GFP exprimiert ist, dient in dieser Arbeit als Negativkontrolle. Damit soll gezeigt werden, dass das GFP keinen Einfluss auf die Bindung von iEs hat, beziehungsweise dass die iEs nicht an andere Strukturen der CHO-Zellen binden. Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 1 gezeigt. Alle Zellen, ausgenommen die CHO-K1-EPCR-Zelllinie, wurden von Jana Brehmer (BNITM, AG Bruchhaus) übernommen. CHO-K1-EPCR wurde freundlicher Weise von Thomas Lavstsen (Copenhagen University) bereitgestellt. Das *P. falciparum*-Isolat IT4 wurde in dieser Arbeit verwendet, beziehungsweise die daraus hergestellte *var16*-Transfektante. Im August 1967 wurde der IT4-Stamm aus einem Patienten in Westafrika isoliert und weiter kultiviert (Jensen and Trager 1978).

Tabelle 1: CHO-745-Zelllinien die in dieser Arbeit verwendet wurden

Zelllinie	Vektor	Rezeptor
CHO-745-GFP	pAc-GFP1-N1	/
CHO-745-CD36	pAc-GFP1-N1	CD36
CHO-745-ICAM-1	pAc-GFP1-N1	ICAM-1
CHO-745-TNFR1	pAc-GFP1-N1	TNFR1
CHO-745-TNFR2	pAc-GFP1-N1	TNFR2
CHO-745-MDR1	pAc-GFP1-N1	MDR1
CHO-745-VCAM-1	pAc-GFP1-N1	VCAM-1
CHO-745-CD55	pAc-GFP1-N1	CD55
CHO-745-CD9	pEGFP-N1	CD9
CHO-745-CD37	pAc-GFP1-N1	CD37
CHO-745-CD81	pAc-GFP1-N1	CD81

3.2 Methoden zur Kultivierung von CHO-Zellen und *P. falciparum*

3.2.1 *In Vitro*-Kultivierung von CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden in Gewebekulturflaschen mit einer luftdurchlässigen Filterkappe als Verschluss kultiviert, welche speziell für adhärent-wachsende Zellen geeignet sind. Es wurden sowohl T25 (25 cm) als auch T75 (75 cm) Flaschen verwendet. In der T25-Flasche wurden 5 ml Medium und in der T75-Flasche 10 bis 15 ml Medium für die Kultivierung der Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C und unter einer CO₂-Konzentration von 5 % kultiviert. Die Konfluenz und Vitalität der CHO-Zellen am Flaschenboden wurden durch den Einsatz eines inversen Mikroskops überwacht. Um Überwucherungen zu vermeiden und die Vitalität der Zellen aufrechtzuerhalten wurden diese, wenn nötig, gesplittet (Verdünnen der Zellzahl in der Kulturflasche) und das Medium gewechselt. Hierbei wurde das verbrauchte Medium entfernt und die adhärenen Zellen mit 3 ml beziehungsweise 9 ml vorgewärmtem 1 x PBS (37 °C) einmal gewaschen. Anschließend

wurde Accutase auf die Zellen gegeben, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Für die T25-Flasche wurden 500 µl Accutase und für die T75-Flasche 1500 µl Accutase verwendet. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂-Konzentration konnten die Zellen durch Klopfen auf den Tisch vom Boden der Flasche gelöst werden. Die CHO-Zellen wurden in Zellkulturmedium resuspendiert, was zu einer Inhibition der Accutase-Aktivität führte und je nach Konfluenz 1:2 bis 1:30 mit 5 ml beziehungsweise 15 ml frischem Medium verdünnt. Für die Selektion der transgenen CHO-Zelllinien wurden 100 µl G418 pro 5 ml Medium hinzugegeben (G418: 50 mg/ml; Endkonzentration: 0,98 mg/ml). Für CHO-K1-EPCR wurde 25 µl Zeocin pro 5 ml Medium hinzugegeben (Zeocin: 100 mg/ml; Endkonzentration: 0,5 mg/ml).

3.2.2 Einfrieren von CHO-Zellen

Die beschriebene Methode aus Abschnitt 3.2.1 wurde angewendet, um die CHO-Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Anschließend wurde das Zellsediment bei 300 g für 2 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in der CHO-Gefrierlösung resuspendiert. Für eine T25-Flasche wurden etwa 3 ml CHO-Gefrierlösung verwendet und für eine T75-Flasche ungefähr 10 ml. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C in einem Mr. Frosty Gefrierbehälter für mindestens einen Tag gelagert, bevor sie bei -170 °C aufbewahrt wurden.

3.2.3 Auftauen von CHO-Zellen

Die Kryoröhrchen wurden für ungefähr eine Minute bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die aufgetauten Zellen in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen mit 5 ml vorgewärmtem (37 °C) Zellkulturmedium überführt. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 300 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit Zellkulturmedium resuspendiert. Es erfolgte die Kultivierung wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

3.2.4 *In Vitro*-Kultivierung von *P. falciparum*

Die Standardkulturmethoden von Trager und Jensen (1976) wurden genutzt, um die Parasiten zu kultivieren. Die *in vitro*-Kultivierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt. In die kleinen Petrischalen wurde 5 ml, in die großen Petrischalen 10 ml Kultivierungsmedium

hinzugegeben. Die Kultur wurde bei einem Hämatokritwert von 5 % und bei 37 °C inkubiert. Die Gaszusammensetzung bestand aus 1 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂. Das Medium wurde fast jeden Tag ausgetauscht und die Parasitämie und der Hämatokrit wurden, wenn nötig, nachjustiert. Um den Hämatokrit zu regulieren, wurden Erythrozyten der Blutgruppe 0+ verwendet. Zu den Transfektanten wurde 40 µl G418 pro 5 ml Medium zugesetzt. Die verwendete Lösung bestand aus 50 mg/ml G418 in sterilfiltriertem RPMI-Medium (Endkonzentration: 0,4 mg/ml).

3.2.5 Giemsa-Färbung

Zur Bestimmung des Anteils infizierter Erythrozyten in der Kultur wurden Blutausstriche mit 1 µl der entsprechenden Kultur auf Objektträgern angefertigt. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und anschließend 30 s lang in Methanol fixiert. Danach wurden die Objektträger für 10 min in einer 10 %igen Giemsa-Lösung gefärbt. Nachdem überschüssige Giemsa-Lösung mit Wasser entfernt und der Objektträger erneut getrocknet war, wurde dieser unter einem Lichtmikroskop untersucht.

3.2.6 Synchronisierung der *P. falciparum*-Kultur mittels D-Sorbitol

Um eine synchrone *P. falciparum*-Kultur zu erzeugen, erfolgte unter anderem die Synchronisierung mittels D-Sorbitol. Dieses lysiert nur die Trophozoiten- und Schizontenstadien, da diese eine höhere Permeabilität aufweisen (Lambros and Vanderberg 1979). Somit bleiben nur Parasiten im Ringstadium übrig, die anschließend weiter kultiviert werden können. Hierfür wurde die Kultur in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt, bei 800 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden in einer 5 %igen Sorbitol-Lösung resuspendiert, für 20 min im Brutschrank inkubiert und erneut für 5 min bei 800 g zentrifugiert, um die Sorbitol-Lösung zu entfernen. Das Sediment wurde gewaschen und schließlich in Kultivierungsmedium resuspendiert und weiter kultiviert gemäß der Beschreibung in Abschnitt 3.2.4.

3.2.7 Einfrieren einer *P. falciparum*-Kultur

Um eine *P. falciparum*-Kultur für die langfristige Lagerung einzufrieren, wurde die Kultur im Ringstadium mit etwa 5 % Parasitämie für 5 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment im vierfachen Volumen der Einfrierlösung resuspendiert. Die

Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und für mindestens einen Tag bei -80 °C im Mr. Frosty Gefrierbehälter gelagert. Die langfristige Lagerung erfolgte im Stickstofftank bei -170 °C.

3.2.8 Auftauen einer *P. falciparum*-Kultur

Um die kryokonservierte *P. falciparum*-Kultur aufzutauen, wurde das Kryo-Dauerstabilat für 2 min bei einer Temperatur von 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde dieses in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und mit einer vorab erwärmten Auftaulösung (MTS) im gleichen Volumen gemischt, indem die MTS tropfenweise hinzugegeben wurde. Das Röhrchen wurde für 2 min bei 300 g zentrifugiert. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 3 ml MTS gewaschen und erneut für 2 min bei 300 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und wie in 3.2.4 beschrieben kultiviert.

3.2.9 Knob-enrichment

Um sicherzustellen, dass alle Versuche ausschließlich mit infizierten Erythrozyten durchgeführt wurden, die *knobs* auf ihrer Membran aufweisen, wurde das *knob-enrichment* mit der Gelatinelösung durchgeführt. Nicht-infizierte Erythrozyten und iEs ohne *knobs* sinken in dieser Lösung schneller ab als iEs mit *knobs* (Waterkeyn, Cowman, and Cooke 2001). Zur Selektion der *P. falciparum*-Kultur wurde das Sediment nach einer Zentrifugation bei 800 g für 5 min in einem 15 ml-Zentrifugationsröhrchen verwendet. Der Überstand wurde entfernt. Es wurde eine gleiche Volumenmenge des Sediments an vorgewärmtem *knob-enrichment*-Medium und die vierfache Volumenmenge des Sediments an vorgewärmter 1 %iger Gelatinelösung vorsichtig und ohne Blasenbildung hinzugegeben und gemischt. Danach wurde für ungefähr 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und dieser Überstand in einem 15 ml-Zentrifugationsröhrchen für 5 min bei 800 g zentrifugiert. Der dabei resultierende Überstand wurde abgenommen und das Sediment wieder in 10 ml Kultivierungsmedium oder in 2 ml Bindungsmedium (BM) resuspendiert, je nachdem ob diese weiter kultiviert wurden, oder für einen Versuch genutzt wurden.

3.3 Methoden zur Expressionsanalyse

3.3.1 Immunfluoreszenz-Assay

Zum Nachweis von gebildetem KAHRP und PfEMP1 wurde ein IFA durchgeführt. Zuerst wurde ein *knob-enrichment* gemacht, wie in 3.2.9 beschrieben. Die Parasitämie betrug zwischen 40 und 60 %. Das Sediment aus dem *knob-enrichment* wurde in 3 ml 1 x PBS gewaschen und bei 800 g für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 250 µl 1 x PBS resuspendiert und auf ein IFA-Objektträger (ER-208B-CE24, 10 well 6.7 mm) gegeben in dem 80 µl der Suspension einige Male in einem well auf und abpipettiert wurde und das ganze Volumen dann abgenommen wurde. Auf diese Weise bleiben einige Erythrozyten am Boden haften. Nachdem die Objektträger vollständig getrocknet waren, wurden die Erythrozyten in Aceton für 30 min fixiert. Es folgte die Lagerung über Nacht im Kühlschrank.

Am nächsten Tag wurden die wells mit etwa 50 µl 1 x PBS für 30 min bedeckt, um diese zu rehydrieren. Danach wurden diese dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Die ersten beiden Antikörper (*rabbit anti-KAHRP* (1:500) und *rat anti-HA* (1:1000)) wurden hinzugegeben in 3 % BSA in 1 x PBS mit hinzugegebenem Ampicillin (1:1000) und über Nacht in einer Box im Kühlschrank gelagert.

Die wells wurden am nächsten Tag fünfmal mit 1 x PBS gewaschen und die weiteren Antikörper in 3 % BSA in 1 x PBS hinzugegeben (*Alexa Fluor 594 goat anti-rat* (1:2000) und *Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG Superclonal* (1:2000)). Ebenso wurde der Zellkern mit DAPI eingefärbt (1:1000) mit hinzugefügtem Ampicillin (1:1000). Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die wells fünfmal mit 1 x PBS gewaschen und vollständig bei 37 °C getrocknet. Drei Tropfen von PBS gepuffertem Glycerin wurden zwischen well und Deckglas gegeben. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt.

3.3.2 RNA-Isolierung für Transkriptomanalyse

Synchronisierte Parasiten im Ringstadium mit einer Parasitämie zwischen 5 und 10 % wurden in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 800 g für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml Kultivierungsmedium gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit der zehnfachen Menge TRIzol (37 °C) lysiert. Dazu wurde das Röhrchen für 10 s stark geschüttelt und danach 5 min bei 37 °C inkubiert. Die TRIzol-Probe wurde bei -80 °C gelagert. Am Tag der RNA-Isolierung wurde die Probe bei 37 °C aufgetaut und zügig 1 ml davon in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Reaktionsgefäß 15 s stark geschüttelt und dann 3 min bei RT

inkubiert. Danach wurde die Probe für 30 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben und auf Eis gelagert. Zum Überstand wurde 70 %iges Ethanol in gleichem Volumenanteil hinzugegeben und drei bis viermal invertiert. Das weitere Vorgehen entspricht der Anleitung zum RNA-Kit (PureLink RNA Mini Kit). Eluiert wurde die RNA in zwei Schritten mit jeweils 25 µl RNase-freiem Wasser. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels NanoDrop bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei 80 °C gelagert.

3.3.3 Überprüfung der Qualität der RNA-Isolierung

Unmittelbar nach der Isolierung wurde die Konzentration der separierten RNA mithilfe des NanoDrop 2000/2000c Spektrophotometers photometrisch bestimmt, wie es vom Hersteller empfohlen wird.

Die Qualität wurde mit einem Bioanalyser-System untersucht (Agilent 2100). Das System verwendet eine automatisierte Kapillar-Elektrophorese. Die RNA wird anhand ihrer Größe in mRNA, rRNA-Fraktionen, sowie in fragmentierte RNA aufgetrennt. Der RIN-Wert (*RNA integrity number*) wird von diesem System generiert und macht einen Vergleich und eine Bewertung der RNA-Qualität möglich. Dieser Wert kann zwischen 1 und 10 liegen. 1 bedeutet starke Degradation, 10 bedeutet die RNA ist vollständig intakt (Schroeder et al. 2006). Dies wurde freundlicher Weise von Johannes Allweier (AG Bruchhaus, BNITM) für dieses Projekt durchgeführt. Der RIN-Wert für die hier verwendete Probe betrug 7,9.

3.3.4 Next generation sequencing (NGS)

Um zu überprüfen, ob von der IT4_ *var16*-Transfektante ausschließlich das *var16*-Gen exprimiert wird, wurde NGS eingesetzt. Die BNITM-NGS-Corefacility führte die Sequenzierung durch. Johannes Allweier übernahm freundlicher Weise die Analyse der Daten, die für dieses Projekt verwendet wurden. Die RNA wurde mit NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 sequenziert.

3.4 Methoden zur Analyse des Bindungsverhaltens von iEs

3.4.1 Statisches Bindungs-Assay

Aussäen der CHO-Zellen zwei Tage vor dem Assay

Die *coverslips* wurden mit einer sterilen Pinzette in eine 24-*well*-Platte gelegt. Die CHO-Zellen wurden abgelöst wie in 3.2.1 beschrieben. Danach wurden diese einmal mit Zellkulturmedium gewaschen, zentrifugiert bei 300 g für 2 min und in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Mittels des Zellzählgerätes wurde die Konzentration der Zellen bestimmt. Die Zellen wurden entsprechend mit Medium verdünnt, um eine Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro ml zu erhalten. Danach wurde G418 hinzugegeben und jeweils 0,5 ml der Zellsuspension in die *wells* gegeben. Dies entspricht einer Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ CHO-Zellen pro *well*.

Tag des Assays

Zuerst wurde kontrolliert, dass die CHO-Zellen gut gewachsen und zu mindestens 90 % konfluent waren. Die entsprechende Parasitenkultur, mit einer Parasitämie von mindestens 5 % im Trophozoiten-Stadium wurde wie in 3.2.9 beschrieben selektiert und in 2 ml BM resuspendiert. Vor dem Resuspendieren wird von der Parasitenkultur ein Ausstrich gemacht und dieser mit Giemsa gefärbt. Mit dem Ausstrich wurde die Parasitämie, diese lag nach dem *knob-enrichment* meist zwischen 40 und 60 %, bestimmt. Die Konzentration der resuspendierten Zellen wurde mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Dazu wurde eine 1:100 Verdünnung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß hergestellt. Die Parasitämie wurde mit der Konzentration der Zellen verrechnet, um die iEs/ml in der Suspension zu ermitteln. Die Suspension wurde verdünnt, sodass eine Konzentration von $2 \cdot 10^6$ iEs/ml vorlag. Das Medium der CHO-Zellen in der 24-*well*-Platte wurde abgenommen, 0,5 ml BM dazugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das BM wurde abgenommen und jeweils 0,5 ml der Parasitensuspension hinzugegeben ($1 \cdot 10^6$ iEs pro *well*). Die *well*-Platte mit den CHO-Zellen und den iEs wurde bei 37 °C für 75 min inkubiert und alle 15 min leicht geschwenkt.

Nach der Inkubation wurden die *coverslips* gewaschen. Dazu wurden diese mit einer Pinzette herausgenommen und dreimal in ein Becherglas mit BM getaucht, an einem Tuch die Flüssigkeit aufgefangen und in ein weiteres Becherglas mit BM dreimal eingetaucht und die Flüssigkeit wieder aufgefangen. Anschließend wurden die *coverslips* mit der Oberseite nach unten in eine frische 24-*well*-Platte gelegt, welche 0,6 ml BM pro *well* enthielt und die in einem Winkel von 45 ° aufgestellt war. Die *coverslips* wurden so 30 min bei RT inkubiert. Anschließend folgte die Fixierung der Zellen in einer frischen Platte mit 0,5 ml 1 %igem Glutaraldehyd in 1 x PBS für 30 min mit der Oberseite nach oben. Es folgte die Färbung der

Zellen. Dazu wurde das Glutaraldehyd abgesaugt und 300 μl einer 10 %igen Giemsalösung in Weiser-Puffer dazugegeben, welche zuvor mit einem Faltenfilter filtriert wurde. Die *coverslips* wurden nach 15 min aus der Färbung genommen und in destilliertem Wasser gründlich gewaschen. Anschließend wurden die *coverslips* auf ein Tuch gelegt, um diese zu trocknen. Nach dem Trocknen wurden diese auf ein Glasobjektträger mit Leica CV Mount fixiert.

Für die Assays wurden drei technische und drei biologische Replikate angefertigt und 10 Bilder pro *coverslip* gemacht (40 x Objektiv, EVOS XL). Dies entspricht 30 Bildern für jedes technische Replikat und insgesamt 90 Bilder für 3 biologische Replikate. Die Bilder wurden mit Computersoftware ausgewertet (Cellprofiler, Ilastik) und so die Anzahl der gebundenen iEs pro mm^2 bestimmt.

3.4.2 Inhibitions-Assay

Das Inhibitions-Assay orientiert sich an dem Abschnitt 3.4.1. Am Tag des Assays wurde anstelle der Inkubation mit 0,5 ml BM 250 μl Antikörperlösung auf die CHO-Zellen gegeben, bei denen eine Inhibition der Bindung von iEs verursacht werden sollte. Für die Inhibition der Bindung an ICAM-1 wurde der ICAM-1-Antikörper (antiICAM-1) in der Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf die CHO-Zellen gegeben. Außerdem wurde als Negativkontrolle mit einem unspezifischen Antikörper (αCP5) mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inkubiert. Als weitere Kontrolle wurde CD36 mit antiICAM-1 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und mit dem unspezifischen Antikörper mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inkubiert. Auf die Kontroll-CHO-Zellen, auf die kein Antikörper hinzugegeben wurde, wurde 250 μl BM hinzugegeben. Es wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 250 μl pro *well* von der iEs-Suspension mit einer Konzentration von $4 \cdot 10^6$ iEs/ml ($1 \cdot 10^6$ iEs pro *well*) auf die CHO-Zellen gegeben. Alles weitere erfolgte, wie es in Abschnitt 3.4.1 beschrieben ist. Es wurde jeweils nur ein biologisches Replikat angefertigt. Für die ICAM-1-Kontrolle ohne Inkubation mit Antikörpern wurden für alle *coverslips* nur 20 anstatt 30 Bilder angefertigt.

3.5 Statistische Auswertung

Für die Analyse der Daten und die Erstellung der Graphen wurde die Software Prism verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der IT4-SLI-*var16*-Transfektante

Mit dem IFA wurde überprüft, ob die *PfEMP1s* exprimiert sind und ob *knobs* mittels KAHRP ausgebildet werden (Abb. 8). Der HA-tag an den *PfEMP1s* wurde genutzt, um einen entsprechenden Antikörper daran zu binden. Es ist nur möglich *PfEMP1s* nachzuweisen, die sich in den MCs befinden. Die Gründe hierfür sind bisher unbekannt (Brehmer 2021).

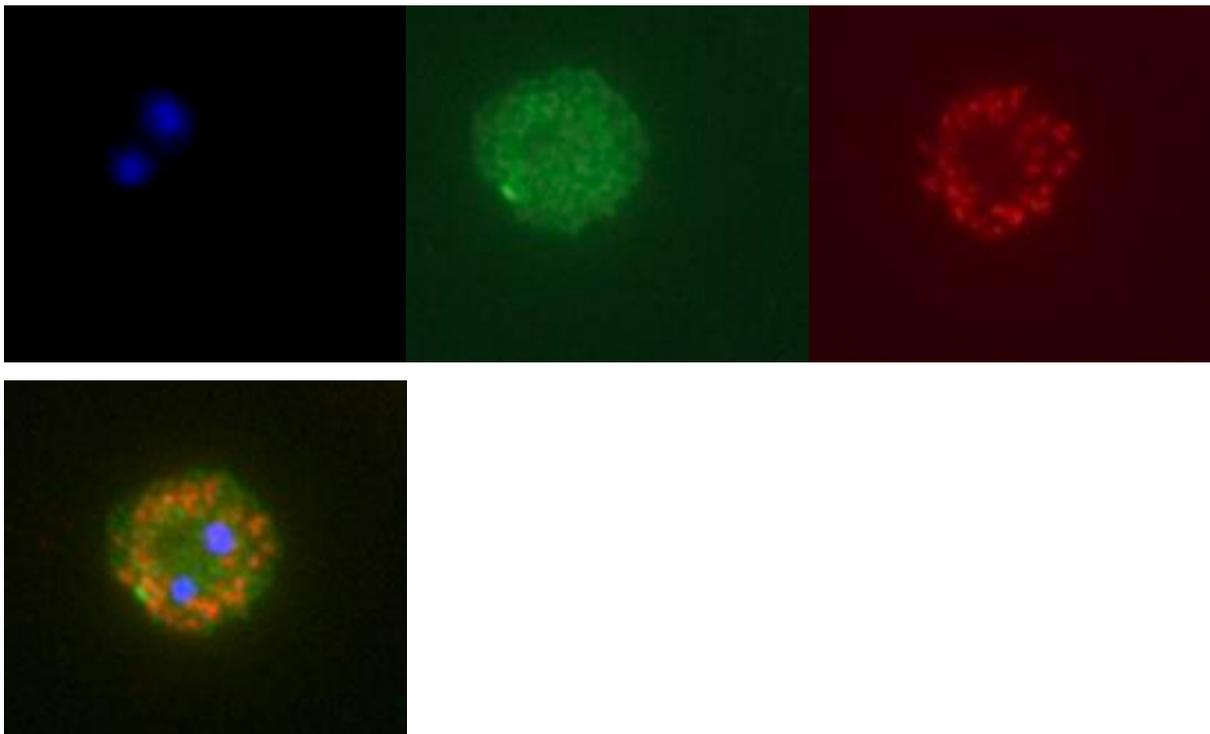


Abbildung 8: Bilder des Immunfluoreszenz-Assay

Erste Bildreihe: Zellkern mit DAPI (blau), KAHRP mit *rabbit* anti-KAHRP und Alexa Fluor 488 *goat anti-rabbit* IgG *superclonal* (grün), *PfEMP1* in den MCs mit *rat* anti-HA und Alexa Fluor 594 *goat anti-rat* (rot). Bild in zweiter Reihe: Überlagerung der oberen drei Bilder.

Die *knobs* werden durch KAHRP gebildet, was durch den grün fluoreszierenden Antikörper nachgewiesen wird (Abb. 8). Der rot fluoreszierende Antikörper zeigt, dass die *PfEMP1s* exprimiert sind.

Um nachzuweisen, dass lediglich *var16* exprimiert wird, wurde das Transkriptom mittels NGS analysiert (Abb. 9 und Abb. 10).

IT4-WT

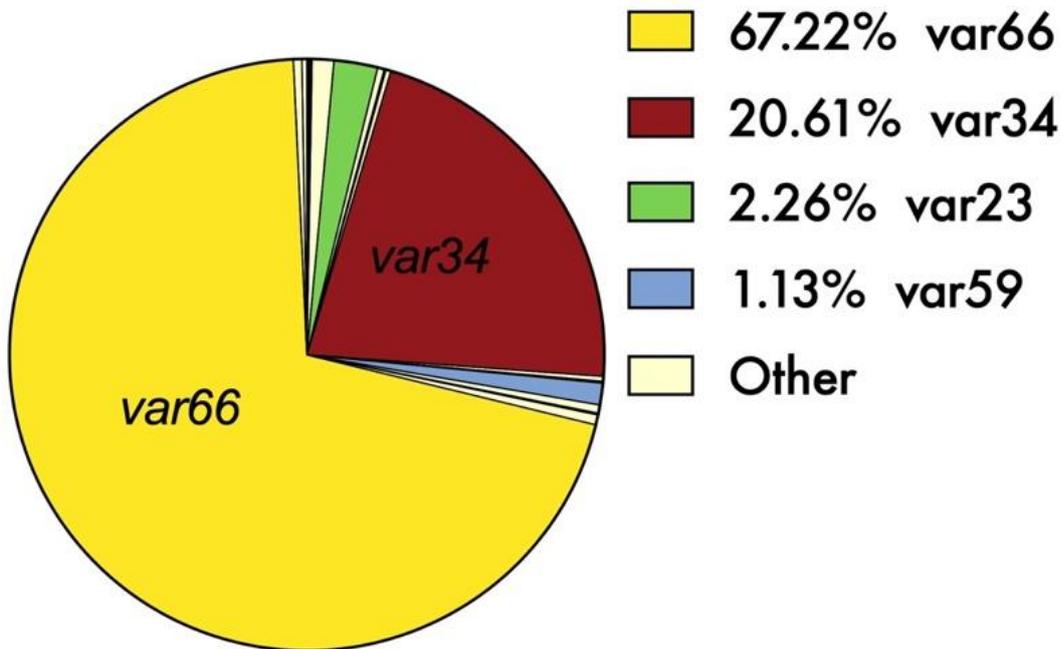


Abbildung 9: Ergebnis der NGS-Analyse der IT4-Wildtyp (WT) -Population

Relativer Anteil der einzelnen *var*-Gene an allen *var*-Genen. Die Gene *var66* und *var34* sind die am meisten und typischen exprimierten *var*-Gene in der IT4-Population (Metwally 2016).

SLI-*var16*

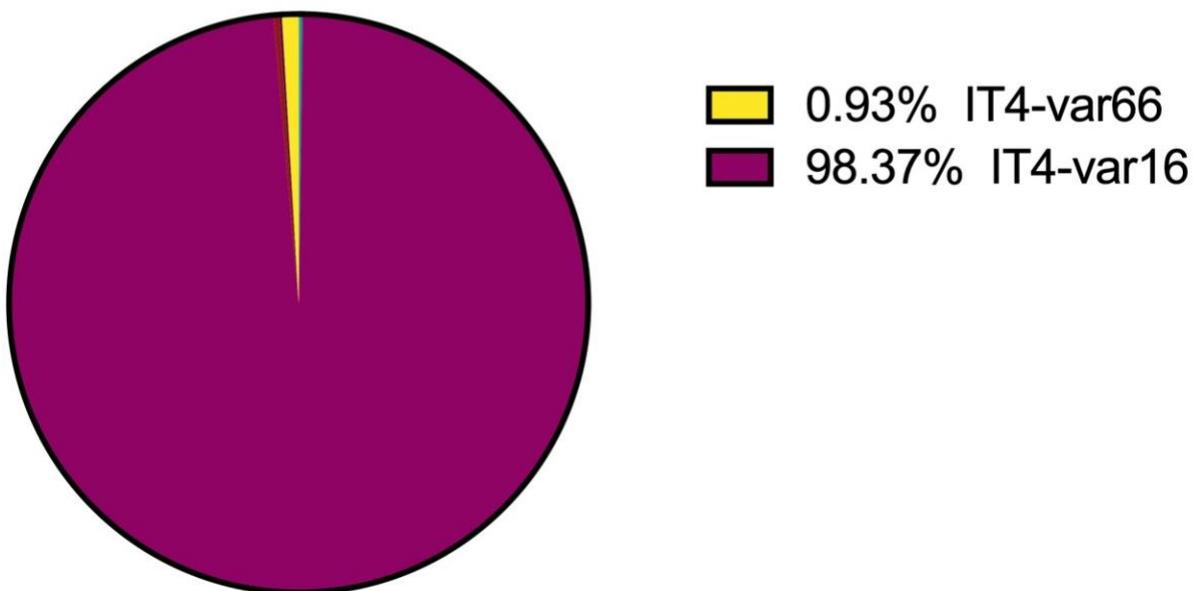


Abbildung 10: Ergebnis der NGS-Analyse der IT4-SLI-*var16*-Transfektante

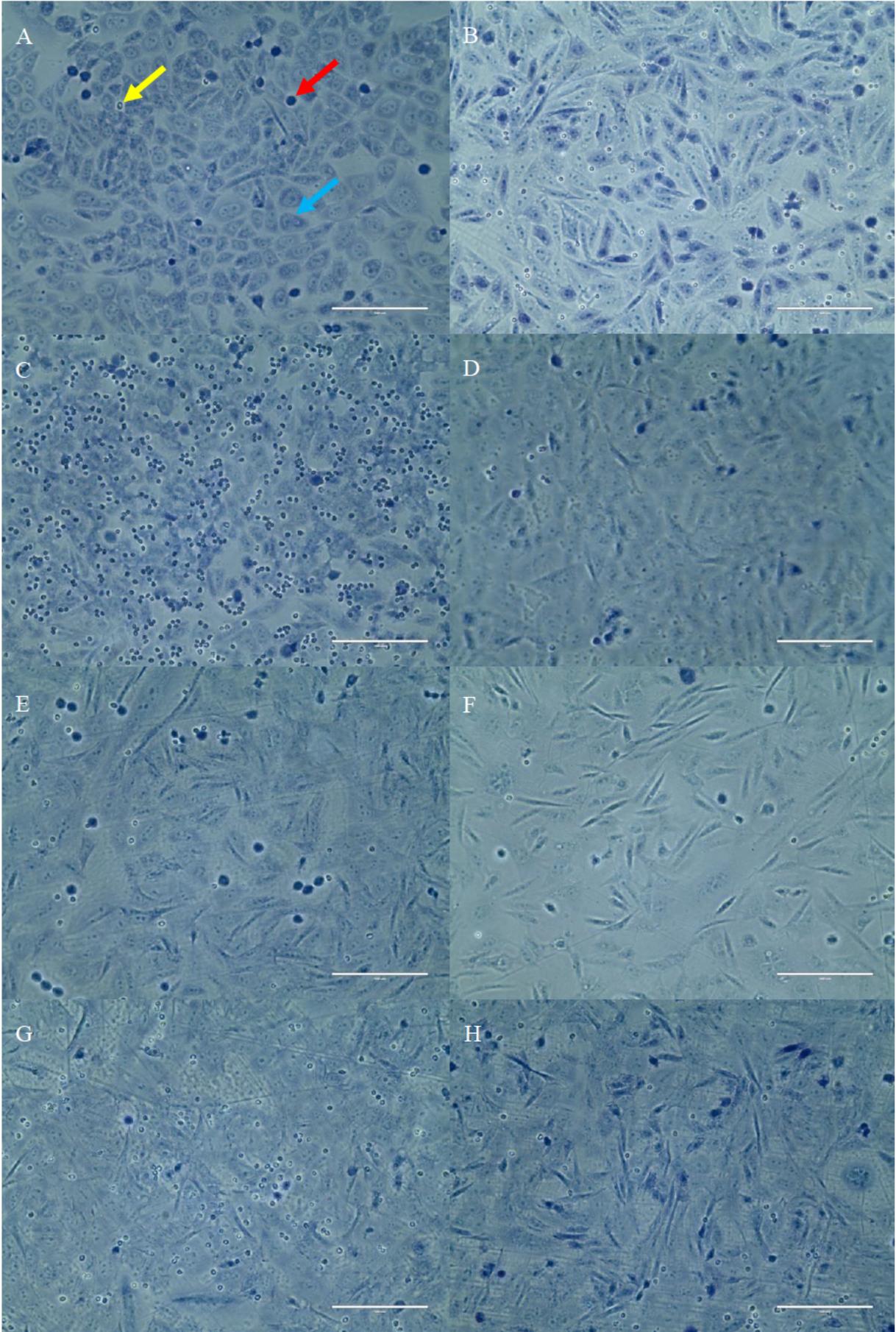
Relativer Anteil der einzelnen *var*-Gene an allen *var*-Genen.

Die IT4-WT Population weist eine gemischte Expression von unterschiedlichen *var*-Genen auf (Abb. 9). Dabei machen *var66* und *var34* den Hauptanteil aus. Die Integration des Resistenzgens an das *var16*-Gen hat sehr gut funktioniert (Abb. 10). Mit 98,37 % macht *var16* den Hauptanteil der Population aus. 0,93 % ist *var66*. Nach jedem Zyklus tendieren einige Parasiten dazu, das exprimierte *var*-Gen zu wechseln (Guizetti and Scherf 2013). Dabei sterben die Parasiten, welche kein *var16* exprimieren, nicht sofort ab. Es resultiert eine Kultur, die nicht zu 100 % *var16* exprimiert.

4.2 Statische Bindungs-Assays

Mit den statischen Bindungs-Assays wurde untersucht, an welche ERs das *var16_PfEMP1*-Protein bindet. Dabei wurden transgene CHO-745-Zellen, die entsprechende ERs auf der Oberfläche präsentieren, auf *coverslips* in 24-*well*-Platten ausgesät. Nach zwei Tagen waren diese konfluent und es wurden iEs auf die Zellen gegeben und inkubiert. Vor jedem Bindungs-Assay wurde das *knob-enrichment* durchgeführt. Dies wurde gemacht, um die Parasiten anzureichern, welche nur *knobs* auf der Oberfläche tragen und die darin befindlichen *PfEMP1*s enthalten. Die Parasitämie betrug nach jedem *knob-enrichment* zwischen 40 und 60 %. Nach der Inkubation mit den iEs folgte das Abwaschen der nichtgebundenen Erythrozyten. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Für jeden Rezeptor wurden in einem Experiment drei technische Replikate angefertigt. Von jedem Replikat wurden 10 Bilder gemacht, sodass am Ende des Experimentes für jeden Rezeptor 30 Bilder vorlagen. Dieses Experiment wurde für jeden Rezeptor dreimal wiederholt, um drei biologische Replikate zu erhalten. Für K1-EPCR wurde für das dritte biologische Replikat nur 15 Bilder angefertigt, da die Zellen nicht ausreichend konfluent für 30 Bilder waren. Aus Zeitgründen konnte dies nicht wiederholt werden.

Abbildung 11 zeigt Beispielbilder, von den jeweiligen Bindungs-Assays mit den unterschiedlichen Rezeptoren. Hieraus lässt sich bereits eine Tendenz erkennen, mit welcher Intensität die iEs an den jeweiligen Rezeptor binden.



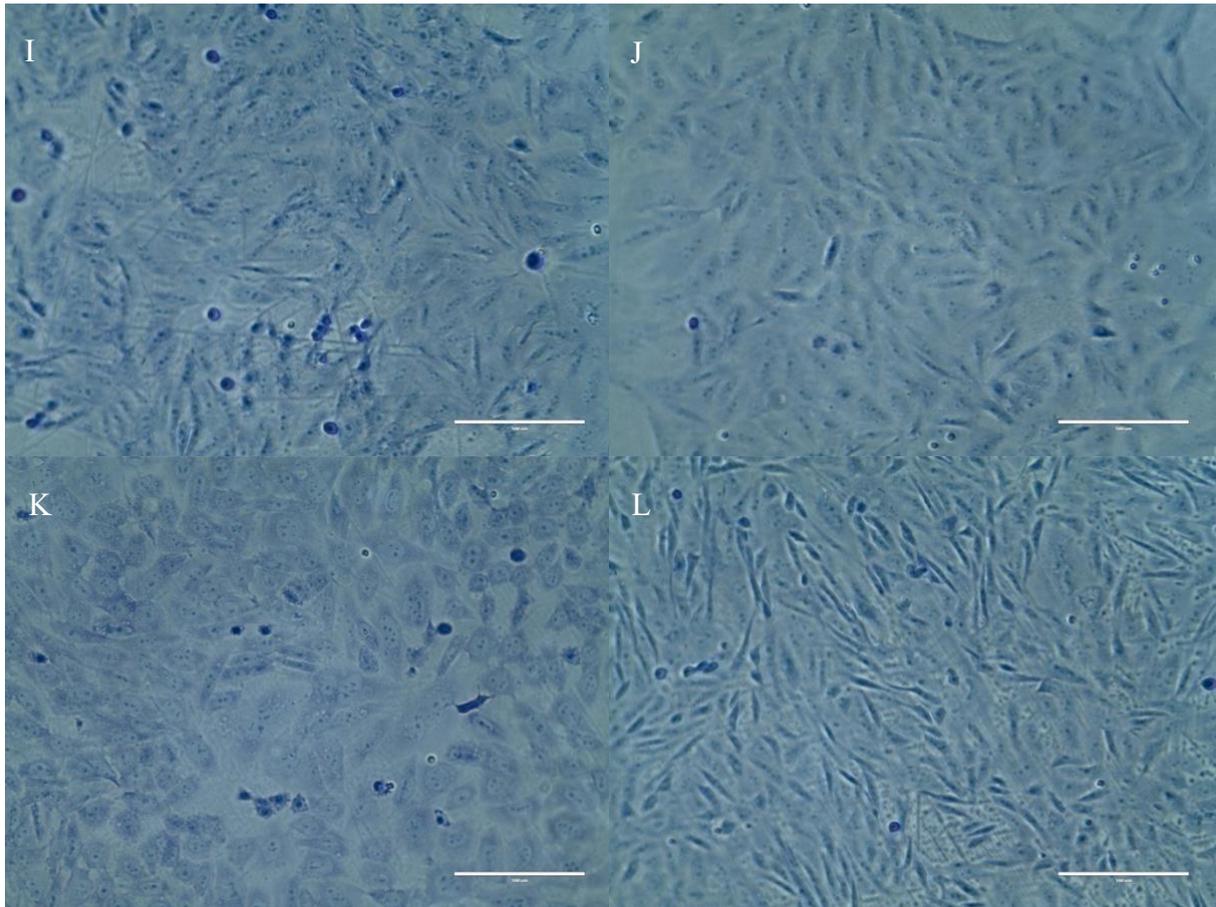


Abbildung 11: Bilder der Bindungs-Assays für die verwendeten ERs

Ausgesäte CHO-Zellen mit gebundenen iEs. (A) GFP (gelber Pfeil: gebundener infizierter Erythrozyt, blauer Pfeil: lebende CHO-Zelle, roter Pfeil: tote CHO-Zelle), (B) CD36, (C) ICAM-1, (D) TNFR1, (E) TNFR2, (F) MDR1, (G) VCAM-1, (H) CD55, (I) CD9, (J) CD37, (K) CD81, (L) EPCR.

In Abbildung 12 sind alle Ergebnisse der gesamten Bindungs-Assays zusammengefasst.

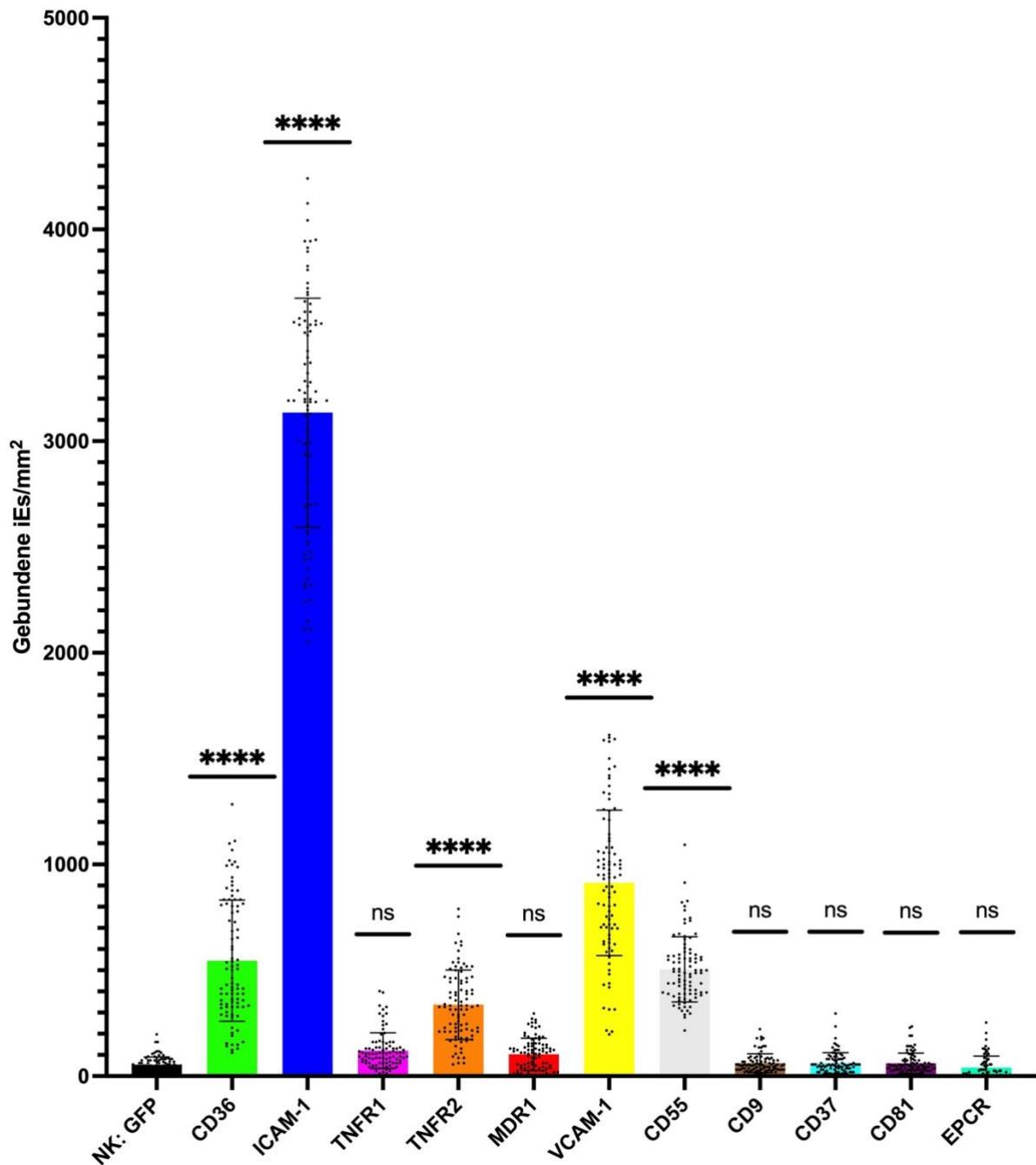


Abbildung 12: Ergebnisse der Bindungs-Assays von *var16_PfEMP1* mit den verschiedenen ERs

Die ERs wurden auf transgenen CHO-745-Zellen präsentiert. Bei jedem Assay wurden drei technische Replikate angefertigt. Von jedem technischen Replikate wurden 10 Bilder gemacht (jeder schwarze Punkt entspricht einem Bild). Für jeden Rezeptor wurden drei biologische Experimente durchgeführt. Für das dritte biologische Replikate des Rezeptors EPCR wurden nur 15 Bilder angefertigt. Zum Auszählen der Bilder wurde die Software Ilastik und Cellprofiler verwendet. Die Anzahl der gebundenen iEs pro mm^2 ist bestimmt worden. Die Balkenhöhe entspricht dem Mittelwert mit der Standardabweichung (Fehlerbalken). Als Negativkontrolle (NK) dient CHO-GFP. Diese Zelllinie trägt keinen humanen Rezeptor auf der Oberfläche. Die Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA gegenüber der NK ermittelt. **** $\hat{=}$ $p < 0,0001$; ns $\hat{=}$ nicht signifikant.

Wie schon in vorherigen Arbeiten gezeigt, gibt es eine deutliche Bindung von *var16_PfEMP1* an CD36 mit 545 (+/- 286) iEs/mm² und an ICAM-1 mit 3134 (+/- 541) iEs/mm² (Abb. 12) (Brehmer 2021). ICAM-1 bindet am meisten iEs der *var16*-Transfektante in diesen statischen Bindungs-Assays. Ebenso konnte die Bindung an TNFR2 (337 (+/- 164) iEs/mm²) und an VCAM-1 (913 (+/- 343) iEs/mm²) verifiziert werden. In dieser Arbeit ist die Anzahl der gebundenen iEs bei VCAM-1 höher als bei TNFR2. In der Arbeit von Jana Brehmer ist die Anzahl an gebundenen iEs bei TNFR2 höher als bei VCAM-1 (Brehmer 2021). Die *var16*-Transfektante bindet nicht signifikant an MDR1 (103 (+/- 77) iEs/mm²), CD9 (61 (+/- 44) iEs/mm²), CD37 (61 (+/- 50) iEs/mm²), EPCR (40 (+/- 55) iEs/mm²) und TNFR1 (121 (+/- 84) iEs/mm²). Dies entspricht den bereits bekannten Ergebnissen (Brehmer 2021). Es konnte als neuer Bindungspartner CD55 (505 (+/- 154) iEs/mm²) gefunden werden. Für CD81 konnte keine signifikante Bindung festgestellt werden (60 (+/- 49) iEs/mm²). Die NK mit intrazellulärem GFP bindet 54 (+/- 36) iEs/mm².

4.3 Inhibitions-Assay

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Bindung der iEs an ICAM-1 um spezifische Bindungen handelt, wurde ein Inhibitions-Assay durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Assay, bei dem die Bindung von *var16_PfEMP1* an ICAM-1 inhibiert werden sollte (Abb.13). Das Assay ist bis auf wenige Schritte gleich dem normalen Bindungs-Assay. Jedoch wurden die verwendeten CHO-Zellen vor Inkubation mit den iEs zuerst mit den Antikörpern inkubiert. Die ICAM-1- und die CD36-Kontrolle wurden nur mit BM inkubiert und nicht mit Antikörpern. Danach folgte die Inkubation mit den iEs, das Waschen, Fixieren und Färben der Zellen. Für dieses Assay wurde nur ein biologisches Replikat erstellt. Von der ICAM-1-Kontrolle wurden nur 20 Bilder anstatt den sonst 30 Bilder pro Assay und Rezeptor gemacht. Um einen Vergleich der Auswirkung der verwendeten Antikörper auf andere ERs zu haben, wurde CD36 als Kontrolle verwendet. Aus zeitlichen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit nur ein Pilotversuch durchgeführt und die Inhibierung für einen Endothelrezeptor (ICAM-1) getestet.

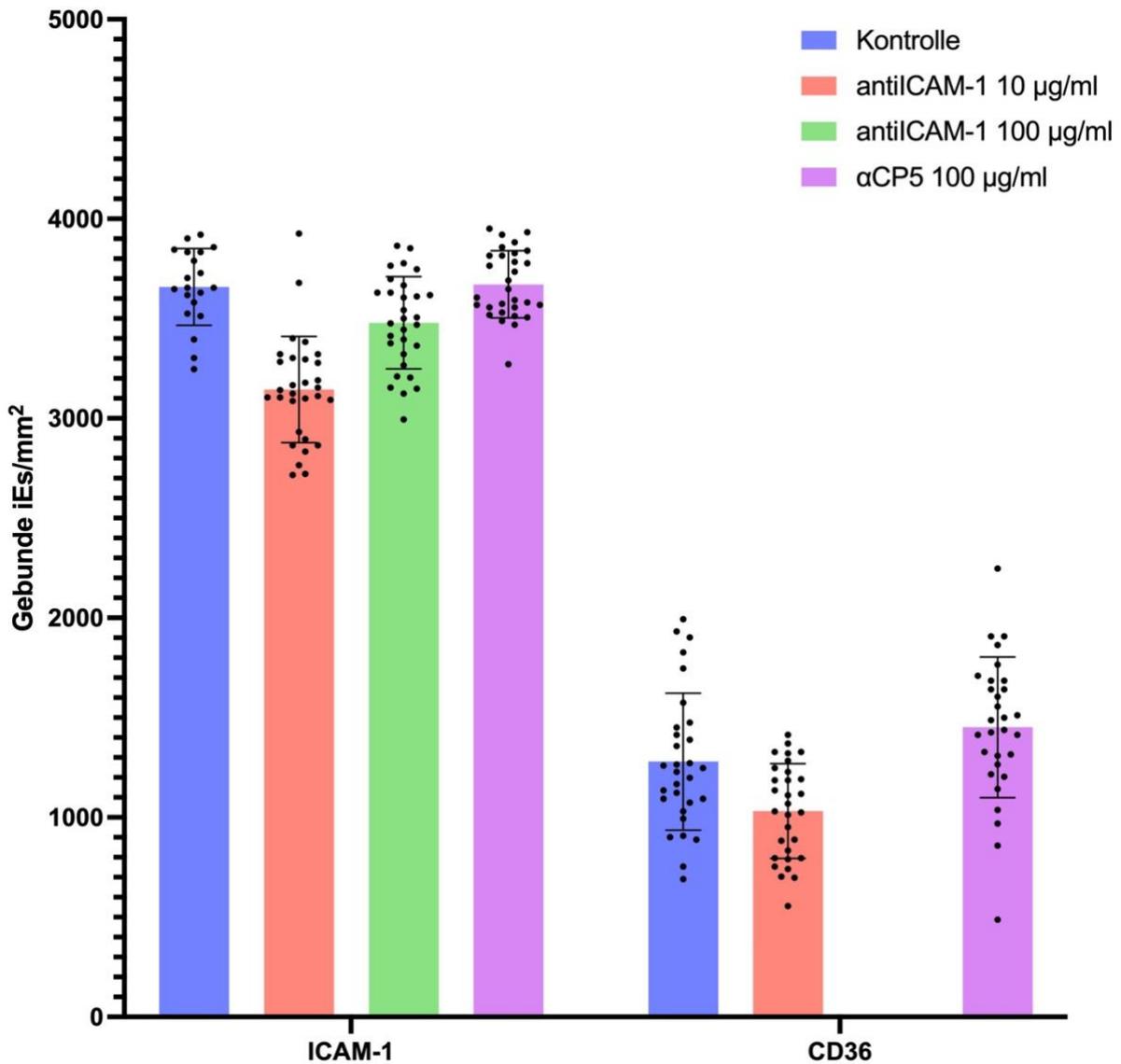


Abbildung 13: Ergebnisse des Inhibitions-Assays

Die ERs wurden auf transgenen CHO-745-Zellen präsentiert. Bei jedem Assay wurden drei technische Replikate angefertigt. Von jedem technischen Replikate wurden 10 Bilder gemacht, bis auf die ICAM-1-Kontrolle, von der nur 20 Bilder insgesamt gemacht wurden (jeder schwarze Punkt entspricht einem Bild). Es wurde nur ein biologisches Replikate angefertigt. Zum Auszählen der Bilder wurde die Software Ilastik und Cellprofiler verwendet. Die Anzahl der gebundenen iEs pro mm^2 ist bestimmt worden. Die Balkenhöhe entspricht dem Mittelwert mit der Standardabweichung (Fehlerbalken). Der ICAM-1-Rezeptor wurde mit antiICAM-1 inkubiert mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ und $100 \mu\text{g/ml}$, außerdem mit dem unspezifischen Antikörper αCP5 mit einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$. Als weitere Kontrolle wurde CD36 mit antiICAM-1 inkubiert mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ und zusätzlich mit dem unspezifischen Antikörper mit einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$.

Es ist zu erkennen, dass die Anzahl an gebundenen iEs bei ICAM-1, nach Inkubation mit antiICAM-1 mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$, abnimmt (Abb. 13). Die Kontrolle von

ICAM-1 bindet 3659 (+/- 192) iEs/mm², ICAM-1 mit 10 µg/ml antiICAM-1 nur 3145 (+/- 266) iEs/mm². Wird die Antikörperkonzentration erhöht, steigt die Anzahl an gebundenen iEs wieder. ICAM-1 mit 100 µg/ml antiICAM-1 bindet 3479 (+/- 231) iEs/mm². Nach Inkubation mit dem unspezifischen Antikörper αCP5 ergibt sich eine nahezu gleiche Anzahl an gebunden iEs im Vergleich zur ICAM-1-Kontrolle. Für ICAM-1 mit 100 µg/ml αCP5 sind es 3671 (+/- 167) iEs/mm². Für den CD36 Rezeptor ergibt sich ein ähnliches Bild. Die Kontrolle von CD36 bindet 1280 (+/- 343) iEs/mm², CD36 mit 10 µg/ml antiICAM-1 nur noch 1032 (+/- 237) iEs/mm². Nach Inkubation von CD36 mit 100 µg/ml αCP5 Antikörper binden 1451 (+/- 352) iEs/mm², und damit mehr als bei der CD36-Kontrolle. Die Inhibition für den Rezeptor ICAM-1 hat damit nicht funktioniert und der hier verwendete antiICAM-1 ist ungeeignet für diesen Inhibitionsversuch.

5 Diskussion

5.1 Überprüfung der IT4-SLI-*var16*-Transfektante

Mit dem IFA konnte gezeigt werden, dass KAHRP exprimiert wird, wobei es sich um das Hauptprotein bei der Bildung der *knobs* handelt (Prajapati and Singh 2013). Auch die PfEMP1-Proteine werden exprimiert. Die hier gezeigten PfEMP1s befinden sich noch nicht an der Oberfläche der iEs, sondern in den *maurer's clefts* (Brehmer 2021). Der mit DAPI eingefärbte Zellkern/die DNA erscheint blau. In Abbildung 8 sind zwei blaue Punkte zu sehen. Manchmal kommt es vor, dass zwei Parasiten in einen Erythrozyten eindringen.

Mit der NGS-Analyse wurde zuerst gezeigt, welche *var*-Gene in dem IT4-Wildtyp-Stamm exprimiert werden (Abb. 9). Wie in vorherigen Arbeiten schon gezeigt, machen *var66* und *var34* den Hauptbestandteil der exprimierten *var*-Gene in IT4-WT aus (Metwally 2016). Dies ändert sich bei der SLI-*var16*-Transfektante. Die Integration des Resistenzgens war erfolgreich (Abb.10).

SLI-*var22*

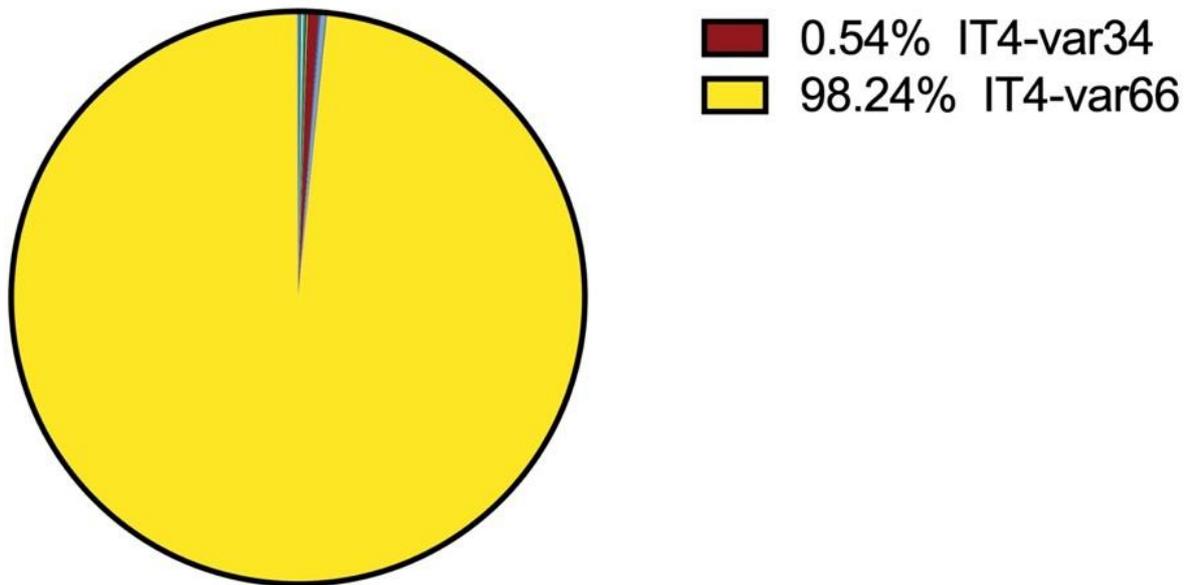


Abbildung 14: NGS-Analyse einer IT4-SLI-*var22*-Transfektante

Relativer Anteil der einzelnen *var*-Gene an allen *var*-Genen. Zur Verfügung gestellt von Johannes Allweier.

Abbildung 14 zeigt ein Beispiel einer *var22*-Transfektante, bei welcher die Integration des Resistenzgens nicht funktioniert hat. Das *var66*-Gen nimmt hier den Hauptanteil ein, dieser beträgt 98,24 %. Dies könnte daran liegen, dass die ATS-Domäne des *var22*-Gens sich sehr stark mit der ATS-Domäne des *var66*-Gens ähnelt. Bei der ATS-Domäne handelt es sich um eine hochkonservierte Sequenz (Smith et al. 2001). Demnach ist es schwierig Sequenzen herauszusuchen, die einzigartig für ein *var*-Gen sind, um entsprechende Primer und Plasmide zu designen.

5.2 Statische Bindungs-Assays

In den statischen Bindungs-Assays konnten die Rezeptoren CD36, ICAM-1, TNFR2 und VCAM-1 als Bindungspartner von früheren Arbeiten verifiziert werden (Abb.12) (Brehmer 2021). Jedoch ergab sich ein anderes Verhältnis der Bindungen von iEs an VCAM-1 und TNFR2. In dieser Arbeit ist die Anzahl an gebundenen iEs an VCAM-1 ($913 (+/- 343)$ iEs/mm²) höher als an TNFR2 ($337 (+/- 164)$ iEs/mm²). In der Arbeit von Jana Brehmer ist dieses Verhältnis umgekehrt (Brehmer 2021). Allgemein lässt sich sagen, dass sich die Anzahl der gebundenen iEs für jedes biologische Experiment unterscheidet. Dies ist an der Streuung der einzelnen Messpunkte deutlich zu erkennen (Abb. 12). Zu diesen Unterschieden

führen unterschiedliche Bedingungen in jedem der Experimente. Die CHO-Zellen wachsen nicht immer gleich, manchmal ist ein *coverslip* sehr stark, manchmal weniger bewachsen. Jedoch betrug die Konfluenz mindestens 90 %. Außerdem unterscheidet sich jeder Waschvorgang nach Inkubation der CHO-Zellen mit den iEs. Die Geschwindigkeit, mit der die *coverslips* in das BM zum Waschen getaucht werden, unterscheidet sich bei jedem Experiment beziehungsweise bei jedem *coverslip*. So kann es sein, dass hier bei einem Experiment mehr Erythrozyten von den CHO-Zellen abgewaschen wurden als bei einem anderen. Auch das Alter der CHO-Zellen spielt eine Rolle. Diese verlieren nach einiger Zeit die exprimierten ERs, weshalb diese nicht länger als 2 Wochen verwendet wurden. Ein Unterschied in der Intensität an exprimierten ERs zwischen zwei und zehn Tage alten Zellen kann bereits festgestellt werden. Dies konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden.

An CD36 wird die Bindung durch die CIDR α 5-Domäne vermittelt, an ICAM-1 durch die DBL β 5-Domäne, wie bereits bekannt ist (Smith 2014; Bachmann et al. 2022). Es wird vorgeschlagen, dass die Bindung an TNFR2 und VCAM-1 ebenfalls durch die DBL β 5-Domäne vermittelt wird, da eine Bindung an beide Rezeptoren auch bei *var01* beobachtet wurde, welche wie *var16* diese DBL β 5-Domäne enthält (Brehmer 2021).

Für TNFR1, MDR1, CD9, CD37 und EPCR konnte keine signifikante Bindung von *var16_PfEMP1* festgestellt werden. Dies entspricht den Ergebnissen der Arbeit von Jana Brehmer (Brehmer 2021). Für CD81 konnte ebenfalls keine signifikante Bindung festgestellt werden. Ein neu entdeckter Bindungspartner von *var16_PfEMP1* ist jedoch der Rezeptor CD55. An diesen binden 505 (+/- 154) iEs/mm². Welche Domäne für die Bindung an CD55 verantwortlich ist, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Zum einen kann die Bindung weiterer *var*-Transfektanten an CD55 untersucht werden. Es können dann die Domänen der gebundenen *var_PfEMP1*s verglichen (CIDR, DBL) und die Domänen eingegrenzt werden. Ebenfalls könnten statische Bindungs-Assays mit an Ni (Nickel)-*beads* gebundenen Proteindomänen Aufschluss geben. Dabei werden die gewünschten *PfEMP1*-Domänen N-Terminal mit einem His-*tag* und einer Lipoyl-Domäne versehen, was das Protein Nickel-affin und löslicher macht. Exprimiert werden die *PfEMP1*-Domänen in Bakterienstämmen. Diese werden aufgeschlossen und die erhaltenen Domänen können an Ni-*beads* gebunden werden. Nun ist es möglich, statische Bindungs-Assays für jede rekombinant erzeugte Domäne durchzuführen (Brehmer 2021). Dies ist eine Möglichkeit, um die *var16_PfEMP1*-Domäne zu charakterisieren, welche für die Bindung an CD55, aber auch an TNFR2 und VCAM-1 verantwortlich ist. Dass *var16_PfEMP1* nicht an EPCR bindet war abzusehen, da dieses keine

CIDR α 1-Domäne aufweist. Diese Domäne ist für die Bindung an EPCR verantwortlich (Bachmann et al. 2022; L. Turner et al. 2013).

5.2.1 Mögliche Auswirkung der Bindung an den jeweiligen Rezeptor

Die Bindung an VCAM-1 könnte zu einem schweren Verlauf der Malaria-Erkrankung beitragen, da die Kombination von VCAM-1 mit ICAM-1, CD9 und CD151 wichtig für die transendotheliale Migration von Leukozyten ist (Barreiro et al. 2005). Damit kann die Bindung an VCAM-1, aber auch an ICAM-1, einen negativen Einfluss auf den Verlauf der Krankheit haben. Bei tödlich-verlaufender Malaria wurde bereits eine erhöhte vaskuläre Expression von VCAM-1 und ICAM-1 und eine Ko-Lokalisation mit iEs nachgewiesen (Armah et al. 2005).

Da CD55 im ganzen Körper exprimiert wird (Ruiz-Argüelles and Llorente 2007), beispielsweise im Vergleich zu CD36 (G. D. H. Turner et al. 1994), könnte die Sequestrierung an diesen Rezeptor bei der zerebralen Malaria eine Rolle spielen.

Die TNF-Konzentration im Blut ist bei der zerebralen Malaria deutlich höher als bei den schwachen Verläufen (Kwiatkowski et al. 1990). TNF α ist der wichtigste Ligand von TNFR2 (Wajant and Sigmund 2019) und die Sequestrierung von iEs an TNFR2 könnte demnach Auswirkungen auf das Krankheitsbild haben. Bei Experimenten mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass TNFR2 entscheidend ist für die zerebrale Malaria, da Mäuse mit einem genetischen Mangel an TNFR2 geschützt waren (Lucas et al. 1997). Dies sind Hinweise darauf, dass TNFR2 auch beim Menschen entscheidend für schwere Verläufe der Malaria sein kann. Was genau die Anheftung an diesen Rezeptor durch zum Beispiel *var16_PfEMP1* bewirkt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

5.3 Inhibitions-Assay

Ziel dieses Versuches war es zu beweisen, dass es sich bei der Bindung von *var16_PfEMP1* an ICAM-1 um eine spezifische Bindung handelt. Dazu wurde ein monoklonaler ICAM-1-Antikörper eingesetzt. Die Kontrolle von ICAM-1, welche nicht mit einem Antikörper inkubiert wurde, bindet mehr iEs als ICAM-1 nach der Inkubation mit antiICAM-1 mit 10 μ g/ml (Abb. 13). Dies lässt vermuten, es gäbe eine spezifische Inhibierung für den ICAM-1-Rezeptor. Doch bei einer Inkubation mit antiICAM-1 mit einer Konzentration von 100 μ g/ml steigt die Anzahl gebundener iEs wieder. Es findet demnach keine spezifische Inhibierung statt. Der unspezifische Antikörper nimmt ebenso keinen Einfluss auf die Bindung.

Der Trend des Inhibitionsversuchs mit der CD36-Kontrolle ähnelt dem Inhibitionsversuch von ICAM-1. Nach Inkubation mit 10 µg/ml antiICAM-1 binden weniger iEs als bei CD36 ohne Antikörper. Dies hat nichts mit einer spezifischen Inhibierung zu tun. Es müsste daher einen anderen Grund geben, weshalb bei beiden ERs weniger iEs binden nach Inkubation mit 10 µg/ml antiICAM-1. Die Inkubation mit 100 µg/ml antiICAM-1 für CD36 fehlt, da nicht genügend Antikörper zur Verfügung stand. Nach Inkubation von CD36 mit dem unspezifischen Antikörper αCP5 binden etwas mehr iEs als an die Kontrolle von CD36. Dieses Phänomen ist auch in anderen Arbeiten zu finden (Esser et al. 2014).

Da die Inhibition mit dem verwendeten Antikörper nicht funktioniert hat, lässt vermuten, dass dieser nicht an die gleiche Bindungsstelle wie *var16_PfEMP1* bindet. In Abbildung 15 sind verschiedene Bindungsstellen an ICAM-1 dargestellt.

A. Mehra et al. / Journal of Molecular Graphics and Modelling 57 (2015) 27–35

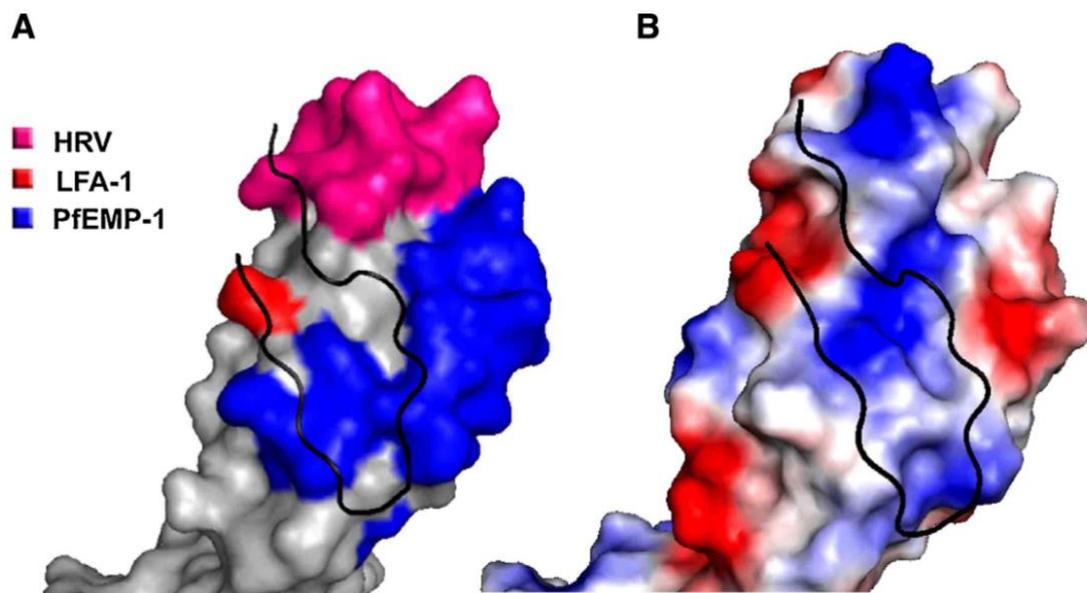


Abbildung 15: Oberflächenstruktur von ICAM-1

(A) zeigt die Bindungsstellen verschiedener Liganden. Pink: HRV (Rhinovirus); rot: LFA-1 (*lymphocyte Function-associated antigen 1*); blau: PfEMP1; schwarzes Peptid: IB-Peptid aus 21 Aminosäuren, welches von ICAM-1 abgeleitet ist und die Bindung von T-Lymphozyten an Endothelzellen (mit ICAM-1) hemmt. (B) Oberflächenstruktur bezüglich der Ladung. Blau: positiv geladen; rot: negativ geladen; weiß: hydrophobe Regionen (Mehra et al. 2015).

Zu sehen sind die unterschiedlichen Bindungsdomänen für verschiedene Antigene (Abb. 15 (A)). Die Bindungsstelle, welche von Interesse für die Untersuchung der PfEMP1-Bindung ist, ist blau dargestellt. Liegt der verwendete Antikörper nicht über dieser Stelle oder

deckt diese nicht genügend ab, so kann *var16_PfEMP1* weiterhin binden. Beim verwendeten Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper. Das ist ein Antikörper, welcher von nur einem B-Lymphozyten-Klon stammt und nur an ein Epitop des ICAM-1-Rezeptors bindet. Hier wäre ein polyklonaler Antikörper besser geeignet, da dieser aus Antikörpern besteht, welche an verschiedene Epitope binden (Nelson et al. 2000). Eine weitere Lösung wäre, einen monoklonalen Antikörper zu finden, von dem bekannt ist, dass dieser an die *PfEMP1*-Bindungsstelle bindet. Des Weiteren wäre es möglich, ein IB-Peptid für den Inhibitionsversuch zu verwenden, welches optimiert ist und an die Bindungsstelle für *PfEMP1* bindet. Dafür kämen einige modifizierte Peptide infrage (Abb. 16). Es handelt sich um Optimierungen am IB-Peptid, welches von ICAM-1 abgeleitet ist. Vor allem ein modifiziertes Peptid mit der Bezeichnung IBT213 aus sechs Aminosäuren ist ein vielversprechender Inhibitor für *PfEMP1*s (Mehra et al. 2015).

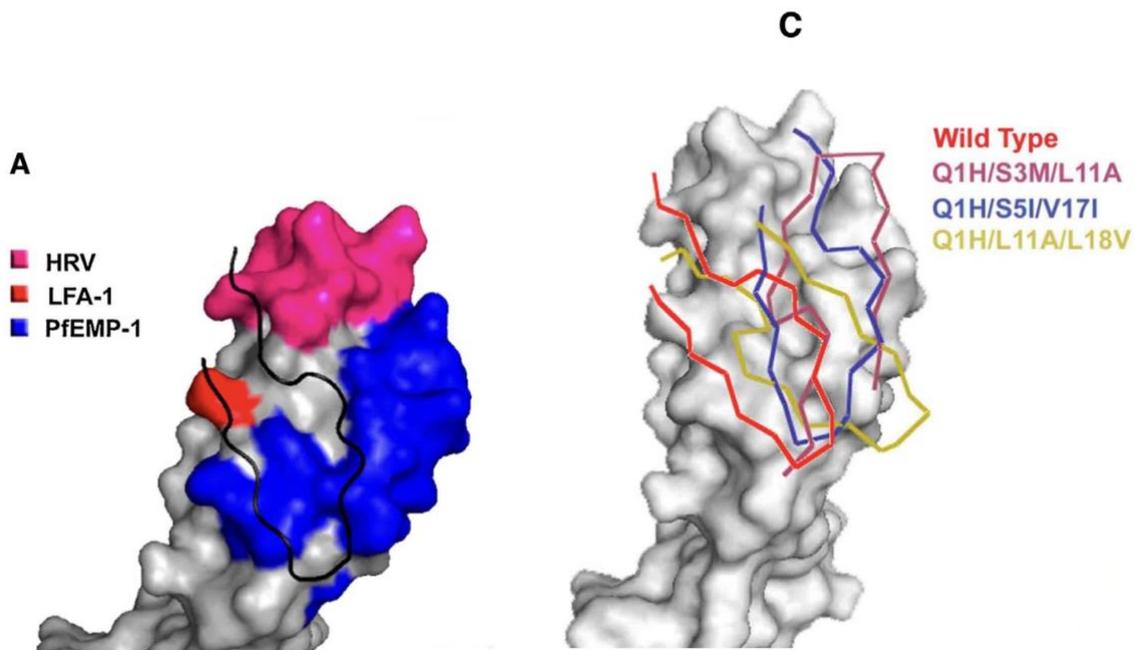


Abbildung 16: Oberflächenstruktur von ICAM-1 mit dem IB-Peptid und weiteren modifizierten Peptiden

(A) zeigt die Bindungsstellen verschiedener Liganden. Pink: HRV (Rhinovirus); rot: LFA-1; blau: *PfEMP1*; schwarzes Peptid: IB-Peptid aus 21 Aminosäuren, welches von ICAM-1 abgeleitet ist und die Bindung von T-Lymphozyten an Endothelzellen (mit ICAM-1) hemmt. (C) Dreifach substituierte Peptide. Als Vorlage dient die IB-Peptid-Sequenz. Die modifizierten Peptide decken zum Teil deutlich besser die *PfEMP1*-Bindungsstelle ab. Die Buchstaben stehen für die substituierten Aminosäuren. Beispiel.: Q1H, das erste Glutamin in der Sequenz ist gegen ein Histidin ausgetauscht (modifiziert aus Mehra et al. 2015).

In Tabelle 2 sind mögliche Antikörper vorgeschlagen für weitere Inhibitions-Assays mit den hier gefundenen oder verifizierten Bindungspartnern.

Tabelle 2: Vorgeschlagene Antikörper für weitere Inhibitions-Assays

Gegen Rezeptor	Name	Anbieter
ICAM-1	ICAM-1 Polyclonal Antibody (710278, <i>human</i> , aus <i>rabbit</i>)	Thermo Fisher Scientific
CD36	CD36 Polyclonal Antibody (PA1-16813, <i>human</i> , aus <i>rabbit</i>)	Thermo Fisher Scientific
TNFR2	TNFR2 Polyclonal Antibody (PA5-87429, <i>human</i> , aus <i>rabbit</i>)	Thermo Fisher Scientific
VCAM-1	VCAM-1 Polyclonal Antibody (PA5-86042, <i>human</i> , aus <i>rabbit</i>)	Thermo Fisher Scientific
CD55	CD55 Polyclonal Antibody (PA5-21532, <i>human</i> , aus <i>rabbit</i>)	Thermo Fisher Scientific

6 Ausblick

Die Experimente mit den SLI-Transfektanten machen es möglich, die Bindung der einzelnen PfEMP1s genauer zu charakterisieren. Als weiterführende Arbeiten könnte man zuerst weitere Rezeptoren in statischen Bindungs-Assays testen, an die IT4_ *var16*_PfEMP1 bindet oder nicht bindet. Ist ein Bindungspartner gefunden, so gilt es die spezifische Bindung mittels Inhibitions-Assays nachzuprüfen. Dafür ist es nötig, entsprechende Antikörper für den jeweiligen Rezeptor zu finden. Am besten wären hier polyklonale Antikörper, die an mehrere Epitope der ERs binden. Eine weitere Möglichkeit sind Peptide, die die Bindungsstellen blockieren, wie dies bei einem modifizierten IB-Peptid für ICAM-1 der Fall ist (Mehra et al. 2015). Des Weiteren gilt es herauszufinden, welche Domänen des IT4_ *var16*_PfEMP1 an den entsprechenden Bindungspartner binden. Dazu ist beispielsweise das Ni-*beads*-Bindungs-Assay geeignet. Um das Bindungsverhalten noch genauer zu charakterisieren, wäre der nächste Schritt, ein Bindungs-Assay unter Flussbedingungen durchzuführen. Dabei wird mit einem Pumpsystem die Situation in den Blutkapillaren nachgeahmt. Es werden unterschiedliche Geschwindigkeiten, der durch eine Flusskammer geleiteten iEs-Suspension, eingestellt. In den Flusskammern sind die entsprechenden transfizierten CHO-Zellen ausgesät. Mit einem Mikroskop, einem Computer und Software wird dann ausgewertet, wie sich die iEs über die CHO-Zellen bewegen, ob sie

zum Beispiel rollen oder fest daran haften (Lubiana et al. 2020). In Abbildung 17 ist eine solche Flusskammer schematisch dargestellt.

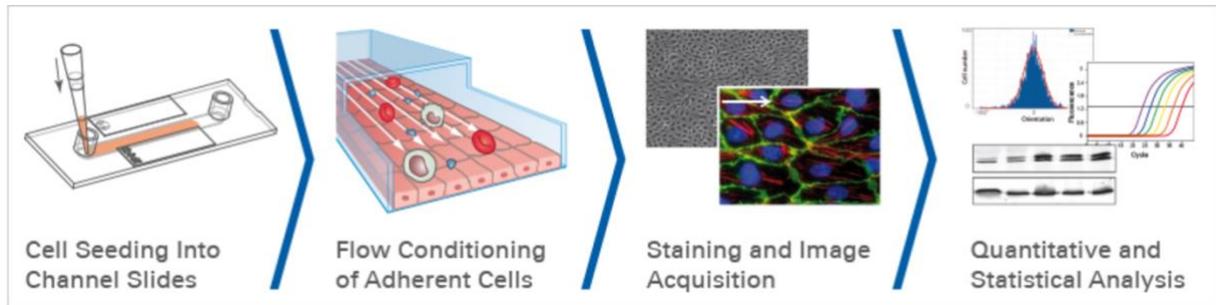


Abbildung 17: Schematische Darstellung einer Flusskammer und des Experimentes eines Bindungs-Assays unter Flussbedingungen

(Quelle: ibidi.com).

Als weitere Methode zur Charakterisierung der Bindungen bietet sich *single cell force spectroscopy* (SCFS) an. Mit dieser Methode ist es möglich zu messen, mit welcher Kraft die iEs an die jeweiligen ERs binden. Dabei wird eine einzelne Zelle an einen Cantilever eines Rasterkraftmikroskops befestigt. Mit der *atomic force microscopy* in Kombination mit der optischen Mikroskopie können einzelne Zellen auf einem Gewebe oder auf anderen Zellen positioniert werden. Die Auslenkung des Cantilevers wird zur Messung der Wechselwirkungskräfte verwendet (Helenius et al. 2008). Abbildung 18 zeigt den Messvorgang mittels SCFS.

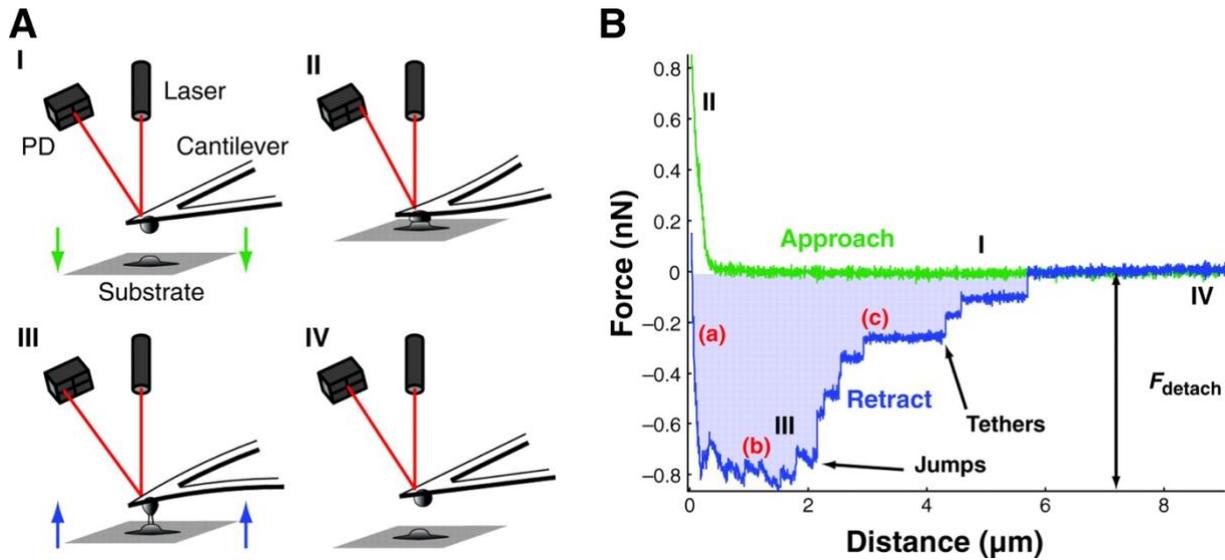


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Messvorganges mit SCFS

(AI): Ein infizierter Erythrozyt wird zum Beispiel mit transfizierten CHO-Zellen in Kontakt gebracht. Der rote Laserstrahl wird von der Rückseite des Cantilevers reflektiert und trifft auf eine Photodiode (PD). Die Position des reflektierten Laserstrahls gibt die Auslenkung des Cantilevers wieder, und damit die Kraft, die auf ihn wirkt. (AII): Die Zelle als Sonde wird auf die CHO-Zellen gedrückt, bis eine Kraft < 1 nN erreicht ist ((B) grüne Kurve). (AIII): Nach einer Kontaktzeit von 0 bis 20 min wird die Zelle zurückgezogen, dabei wird eine Kraft-Abstandskurve aufgezeichnet ((B) blaue Kurve). Gebildete Bindungen zwischen dem infizierten Erythrozyten und den CHO-Zellen brechen nacheinander auf. (AIV): Die Zelle hat sich Vollständig von der Oberfläche gelöst (Helenius et al. 2008).

Als weiteres Ziel gilt es, möglichst viele *PfEMP1s* der unterschiedlichen *var*-Gene zu charakterisieren. Dafür müssen, zu den bereits vorhandenen, weitere SLI-Transfektanten hergestellt werden. So können wichtige Grundlagen für eine spätere Medikamentenentwicklung erforscht werden.

7 Literaturverzeichnis

Antia, Meher, Thurston Herricks, and Pradipsinh K. Rathod. 2007. “Microfluidic Modeling of Cell–Cell Interactions in Malaria Pathogenesis.” *PLOS Pathogens* 3 (7): e99. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030099>.

Armah, Henry, Edwin Kwame Wiredu, Alfred Kofi Dodoo, Andrew Anthony Adjei, Yao Tettey, and Richard Gyasi. 2005. “Cytokines and Adhesion Molecules Expression in the Brain in Human Cerebral Malaria.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2 (1): 123–31. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005010123>.

Bachmann, Anna, Nahla Galal Metwally, Johannes Allweier, Jakob Cronshagen, Maria del Pilar Martinez Tauler, Agnes Murk, Lisa Katharina Roth, et al. 2022. “CD36—A Host Receptor Necessary for Malaria Parasites to Establish and Maintain Infection.” *Microorganisms* 10 (12): 2356. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122356>.

Barreiro, Olga, María Yáñez-Mó, Mónica Sala-Valdés, María Dolores Gutiérrez-López, Susana Ovale, Adrian Higginbottom, Peter N. Monk, Carlos Cabañas, and Francisco Sánchez-Madrid. 2005. “Endothelial Tetraspanin Microdomains Regulate Leukocyte Firm Adhesion during Extravasation.” *Blood* 105 (7): 2852–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3606>.

Barreiro, Olga, María Yáñez-Mó, Juan M. Serrador, María C. Montoya, Miguel Vicente-Manzanares, Reyes Tejedor, Heinz Furthmayr, and Francisco Sánchez-Madrid. 2002. “Dynamic Interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with Moesin and Ezrin in a Novel Endothelial Docking Structure for Adherent Leukocytes.” *Journal of Cell Biology* 157 (7): 1233–45. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112126>.

Belachew, Esmael Besufikad. 2018. “Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium Falciparum* Parasites.” *Journal of Immunology Research* 2018: 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/6529681>.

Birnbaum, Jakob, Sven Flemming, Nick Reichard, Alexandra Blancke Soares, Paolo Mesén-Ramírez, Ernst Jonscher, Bärbel Bergmann, and Tobias Spielmann. 2017. “A Genetic System to Study *Plasmodium Falciparum* Protein Function.” *Nature Methods* 14 (4): 450–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4223>.

Brehmer, Jana. 2021. “Analyse der Bindungseigenschaften zwischen *P. falciparum* infizierten Erythrozyten und verschiedenen Endothelrezeptoren (2021).” Universität Hamburg.

- Charrin, Stéphanie, Stéphanie Jouannet, Claude Boucheix, and Eric Rubinstein. 2014. "Tetraspanins at a Glance." *Journal of Cell Science* 127 (17): 3641–48. <https://doi.org/10.1242/jcs.154906>.
- Couffinhal, T, C Duplâa, C Moreau, J M Lamazière, and J Bonnet. 1994. "Regulation of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1 in Human Vascular Smooth Muscle Cells." *Circulation Research* 74 (2): 225–34. <https://doi.org/10.1161/01.RES.74.2.225>.
- Craig, Alister G., Mohd Fadzli Mustaffa Khairul, and Pradeep R. Patil. 2012. "Cytoadherence and Severe Malaria." *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS* 19 (2): 5–18.
- Egal, E. S. A., F. V. Mariano, M. H. Blotta, A. R. Piña, V. A. Montalli, O. P. Almeida, and A. M. Altemani. 2014. "ICAM-1 Expression on Immune Cells in Chronic Villitis." *Placenta* 35 (12): 1021–26. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.10.004>.
- Egan, Elizabeth S., Rays H. Y. Jiang, Mischka A. Moechtar, Natasha S. Barteneva, Michael P. Weekes, Luis V. Nobre, Steven P. Gygi, et al. 2015. "A Forward Genetic Screen Identifies Erythrocyte CD55 as Essential for *Plasmodium Falciparum* Invasion." *Science* 348 (6235): 711–14. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3526>.
- Enomoto, Masahiro, Shin-ichiro Kawazu, Satoru Kawai, Wakako Furuyama, Tohru Ikegami, Jun-ichi Watanabe, and Katsuhiko Mikoshiba. 2012. "Blockage of Spontaneous Ca²⁺ Oscillation Causes Cell Death in Intraerythrocytic *Plasmodium Falciparum*." *PLOS ONE* 7 (7): e39499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039499>.
- Esser, Claudia, Anna Bachmann, Daniela Kuhn, Kathrin Schuldt, Birgit Förster, Meike Thiel, Jürgen May, et al. 2014. "Evidence of Promiscuous Endothelial Binding by *Plasmodium Falciparum*-Infected Erythrocytes." *Cellular Microbiology* 16 (5): 701–8. <https://doi.org/10.1111/cmi.12270>.
- Febbraio, Maria, David P. Hajjar, and Roy L. Silverstein. 2001. "CD36: A Class B Scavenger Receptor Involved in Angiogenesis, Atherosclerosis, Inflammation, and Lipid Metabolism." *The Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 785–91. <https://doi.org/10.1172/JCI14006>.
- Gardner, Malcolm J., Neil Hall, Eula Fung, Owen White, Matthew Berriman, Richard W. Hyman, Jane M. Carlton, et al. 2002. "Genome Sequence of the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *Nature* 419 (6906): 498–511. <https://doi.org/10.1038/nature01097>.

- Gölnitz, Uta, Letusa Albrecht, and Gerhard Wunderlich. 2008. "Var Transcription Profiling of Plasmodium Falciparum 3D7: Assignment of Cytoadherent Phenotypes to Dominant Transcripts." *Malaria Journal* 7 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-14>.
- Gotsch, Ursula, Ute Jäger, Mara Dominis, and Dietmar Vestweber. 1994. "Expression of P-Selectin on Endothelial Cells Is Upregulated by LPS and TNF- α in Vivo." *Cell Adhesion and Communication* 2 (1): 7–14. <https://doi.org/10.3109/15419069409014198>.
- Guizetti, Julien, and Artur Scherf. 2013. "Silence, Activate, Poise and Switch! Mechanisms of Antigenic Variation in Plasmodium Falciparum." *Cellular Microbiology* 15 (5): 718–26. <https://doi.org/10.1111/cmi.12115>.
- Helenius, Jonne, Carl-Philipp Heisenberg, Hermann E. Gaub, and Daniel J. Müller. 2008. "Single-Cell Force Spectroscopy." *Journal of Cell Science* 121 (11): 1785–91. <https://doi.org/10.1242/jcs.030999>.
- Helms, Gesa, Anil Kumar Dasanna, Ulrich S. Schwarz, and Michael Lanzer. 2016. "Modeling Cytoadhesion of Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes and Leukocytes—Common Principles and Distinctive Features." *FEBS Letters* 590 (13): 1955–71. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12142>.
- Hunt, Nicholas H., and Georges E. Grau. 2003. "Cytokines: Accelerators and Brakes in the Pathogenesis of Cerebral Malaria." *Trends in Immunology* 24 (9): 491–99. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00229-1).
- Hviid, Lars, and Anja T.R. Jensen. 2015. "PfEMP1 – A Parasite Protein Family of Key Importance in Plasmodium Falciparum Malaria Immunity and Pathogenesis." In *Advances in Parasitology*, 88:51–84. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.02.004>.
- Jensen, J B, and W Trager. 1978. "Plasmodium Falciparum in Culture: Establishment of Additional Strains." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27 (4): 743–46. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.743>.
- Kwiatkowski, D., I. Sambou, P. Twumasi, B. M. Greenwood, A. V. S. Hill, K. R. Manogue, A. Cerami, J. Castracane, and D. R. Brewster. 1990. "TNF Concentration in Fatal Cerebral, Non-Fatal Cerebral, and Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria." *The Lancet*, Originally published as Volume 336, Issue 8725, 336 (8725): 1201–4. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92827-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92827-5).

- Lambros, Chris, and Jerome P. Vanderberg. 1979. "Synchronization of Plasmodium Falciparum Erythrocytic Stages in Culture." *The Journal of Parasitology* 65 (3): 418–20. <https://doi.org/10.2307/3280287>.
- Lee, Wenn-Chyau, Bruce Russell, and Laurent Rénia. 2019. "Sticking for a Cause: The Falciparum Malaria Parasites Cytoadherence Paradigm." *Frontiers in Immunology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01444>.
- Lubiana, Pedro, Philip Bouws, Lisa Katharina Roth, Michael Dörpinghaus, Torben Rehn, Jana Brehmer, Jan Stephan Wichers, et al. 2020. "Adhesion between P. Falciparum Infected Erythrocytes and Human Endothelial Receptors Follows Alternative Binding Dynamics under Flow and Febrile Conditions." *Scientific Reports* 10 (1): 4548. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61388-2>.
- Lucas, Rudolf, Pierre Juillard, Els Decoster, Mireille Redard, Danielle Burger, Yves Donati, Christine Giroud, et al. 1997. "Crucial Role of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor 2 and Membrane-Bound TNF in Experimental Cerebral Malaria." *European Journal of Immunology* 27 (7): 1719–25. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270719>.
- Mehra, A., Gaurav Jerath, Vibin Ramakrishnan, and Vishal Trivedi. 2015. "Characterization of ICAM-1 Biophore to Design Cytoadherence Blocking Peptides." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 57 (April): 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2015.01.004>.
- Metwally, Nahla. 2016. "Analyses of the Transcriptome Profiles of Plasmodium Falciparum Infected Erythrocytes Selected for Binding to the Human Endothelial Receptors (ICAM-1, P-Selectin, E-Selectin, CD9 and CD151)." Hamburg.
- Miller, Louis H., Dror I. Baruch, Kevin Marsh, and Ogobara K. Doumbo. 2002. "The Pathogenic Basis of Malaria." *Nature* 415 (6872): 673–79. <https://doi.org/10.1038/415673a>.
- Montgomery, Jacqui, Fingani A. Mphande, Matthew Berriman, Arnab Pain, Stephen J. Rogerson, Terrie E. Taylor, Malcolm E. Molyneux, and Alister Craig. 2007. "Differential Var Gene Expression in the Organs of Patients Dying of Falciparum Malaria." *Molecular Microbiology* 65 (4): 959–67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05837.x>.
- Mundwiler-Pachlatko, Esther, and Hans-Peter Beck. 2013. "Maurer's Clefts, the Enigma of Plasmodium Falciparum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (50): 19987–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309247110>.
- Nelson, Paul, Gary Reynolds, E Waldron, Ward E, Giannopoulos K, and P Murray. 2000. "Monoclonal Antibodies." *Molecular Pathology* 53 (June): 111–17.

- Ochola, Lucy B., Bethsheba R. Siddondo, Harold Ocholla, Siana Nkya, Eva N. Kimani, Thomas N. Williams, Johnstone O. Makale, et al. 2011. "Specific Receptor Usage in Plasmodium Falciparum Cytoadherence Is Associated with Disease Outcome." *PLOS ONE* 6 (3): e14741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014741>.
- Pivkin, Igor V., Zhangli Peng, George E. Karniadakis, Pierre A. Buffet, Ming Dao, and Subra Suresh. 2016. "Biomechanics of Red Blood Cells in Human Spleen and Consequences for Physiology and Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (28): 7804–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606751113>.
- Prajapati, Surendra K., and Om P. Singh. 2013. "Remodeling of Human Red Cells Infected with Plasmodium Falciparum and the Impact of PHIST Proteins." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 51 (3): 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2013.06.003>.
- Roth, Lisa Katharina. 2019. "The Effects on the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum (WELCH, 1897) in Response to an Interaction of Parasitized Erythrocytes with Various Human Endothelial Receptors." Doctoral Thesis, Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky. <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/8227>.
- Rowe, J. Alexandra, Antoine Claessens, Ruth A. Corrigan, and Mònica Arman. 2009. "Adhesion of Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes to Human Cells: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11 (May): e16. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001082>.
- Ruiz-Argüelles, Alejandro, and Luis Llorente. 2007. "The Role of Complement Regulatory Proteins (CD55 and CD59) in the Pathogenesis of Autoimmune Hemocytopenias." *Autoimmunity Reviews* 6 (3): 155–61. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2006.09.008>.
- Sakaeda, Toshiyuki, Tsutomu Nakamura, and Katsuhiko Okumura. 2003. "Pharmacogenetics of MDR1 and Its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Drugs." *Pharmacogenomics* 4 (4): 397–410. <https://doi.org/10.1517/phgs.4.4.397.22747>.
- Scherf, A., R. Hernandez-Rivas, P. Buffet, E. Bottius, C. Benatar, B. Pouvelle, J. Gysin, and M. Lanzer. 1998. "Antigenic Variation in Malaria: In Situ Switching, Relaxed and Mutually Exclusive Transcription of Var Genes during Intra-Erythrocytic Development in Plasmodium Falciparum." *The EMBO Journal* 17 (18): 5418–26. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5418>.

- Schroeder, Andreas, Odilo Mueller, Susanne Stocker, Ruediger Salowsky, Michael Leiber, Marcus Gassmann, Samar Lightfoot, Wolfram Menzel, Martin Granzow, and Thomas Ragg. 2006. "The RIN: An RNA Integrity Number for Assigning Integrity Values to RNA Measurements." *BMC Molecular Biology* 7 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>.
- Silverstein, Roy L., and Maria Febbraio. 2009. "CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior." *Science Signaling* 2 (72). <https://doi.org/10.1126/scisignal.272re3>.
- Silvie, Olivier, Eric Rubinstein, Jean-François Franetich, Michel Prenant, Elodie Belnoue, Laurent Rénia, Laurent Hannoun, et al. 2003. "Hepatocyte CD81 Is Required for Plasmodium Falciparum and Plasmodium Yoelii Sporozoite Infectivity." *Nature Medicine* 9 (1): 93–96. <https://doi.org/10.1038/nm808>.
- Smith, Joseph D. 2014. "The Role of PfEMP1 Adhesion Domain Classification in Plasmodium Falciparum Pathogenesis Research." *Molecular and Biochemical Parasitology*, Special Issue on the 35th Anniversary of Molecular and Biochemical Parasitology, 195 (2): 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.07.006>.
- Smith, Joseph D, Benoit Gamain, Dror I Baruch, and Sue Kyes. 2001. "Decoding the Language of Var Genes and Plasmodium Falciparum Sequestration." *Trends in Parasitology* 17 (11): 538–45. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02079-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02079-7).
- Smith, Joseph D., J. Alexandra Rowe, Matthew K. Higgins, and Thomas Lavstsen. 2013. "Malaria's Deadly Grip: Cytoadhesion of Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes." *Cellular Microbiology* 15 (12): 1976–83. <https://doi.org/10.1111/cmi.12183>.
- Spiel, Annemiek B. van, Kirsten L. Puls, Mariam Sofi, Dodie Pouniotis, Hubertus Hochrein, Zane Orinska, Klaus-Peter Knobloch, Magdalena Plebanski, and Mark D. Wright. 2004. "A Regulatory Role for CD37 in T Cell Proliferation1." *The Journal of Immunology* 172 (5): 2953–61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2953>.
- Trampuz, Andrej, Matjaz Jereb, Igor Muzlovic, and Rajesh M. Prabhu. 2003. "Clinical Review: Severe Malaria." *Critical Care* 7 (4): 315. <https://doi.org/10.1186/cc2183>.
- Turner, Gareth D. H., Heather Morrison, Margaret Jones, Timothy M. E. Davis, Sornchai Looareesuwan, Ian D. Buley, Kevin C. Gatter, et al. 1994. "An Immunohistochemical Study of the Pathology of Fatal Malaria." *The American Journal of Pathology* 145 (5): 1057–69.

Turner, Louise, Thomas Lavstsen, Sanne S. Berger, Christian W. Wang, Jens E. V. Petersen, Marion Avril, Andrew J. Brazier, et al. 2013. "Severe Malaria Is Associated with Parasite Binding to Endothelial Protein C Receptor." *Nature* 498 (7455): 502–5. <https://doi.org/10.1038/nature12216>.

Wahlgren, M, J Carlson, W Ruangjirachuporn, D Conway, H Helmby, A Martinez, M E Patarroyo, and E Riley. 1990. "Geographical Distribution of Plasmodium Falciparum Erythrocyte Rosetting and Frequency of Rosetting Antibodies in Human Sera." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43 (4): 333–38. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.333>.

Wajant, Harald, and Daniela Siegmund. 2019. "TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00091>.

Waterkeyn, Jacqueline G, Alan F Cowman, and Brian M Cooke. 2001. "Plasmodium Falciparum: Gelatin Enrichment Selects for Parasites with Full-Length Chromosome 2. Implications for Cytoadhesion Assays." *Experimental Parasitology* 97 (2): 115–18. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4593>.

White, N. J. 2008. "Plasmodium Knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite." *Clinical Infectious Diseases* 46 (2): 172–73. <https://doi.org/10.1086/524889>.

WHO. 2022. "World Malaria Report 2022."

Yipp, Bryan G., Michael J. Hickey, Graciela Andonegui, Allan G. Murray, Sornchai Looareesuwan, Paul Kubes, and May Ho. 2007. "Differential Roles of CD36, ICAM-1, and P-Selectin in Plasmodium Falciparum Cytoadherence In Vivo." *Microcirculation* 14 (6): 593–602. <https://doi.org/10.1080/10739680701404705>.

Danksagung

Um dieser Arbeit auch etwas Persönliches beizulegen habe ich mich entschieden, eine Danksagung mit hineinzubringen.

Zuerst danke ich meinen Eltern, die mich das ganze Studium über finanziell getragen haben. Dadurch war ich nicht in der Not einen Nebenjob auszuüben und konnte meine Zeit auch dafür nutzen, andere Bereiche des Lebens zu studieren und kennen zu lernen und mich nicht ausschließlich auf das Fachliche an der Uni zu beschränken. Ich hatte Zeit für andere Menschen, Zeit für mich selbst, zum Beispiel um mich künstlerisch auch etwas auszuleben.

Als nächstes danke ich Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus, die es mir ermöglicht hat, einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten zu bekommen. Mit Fragen konnte ich jederzeit zu ihr gehen, wenn ich einen Rat brauchte oder die Dinge unklar waren.

Ein herzlicher Dank geht an Johannes Allweier, der mich in alle Arbeiten im Labor eingeführt hat und auch stets für meine Fragen oder zur Hilfe da war, wenn ich sie brauchte. Im Labor waren wir ein sehr gutes Team.

Weiter Danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Andrä, der sich bereit erklärt hat diese Arbeit als Professor der HAW zu betreuen. Ihre Biochemie-Vorlesung habe ich gerne gehört und ich konnte einiges aus dieser Vorlesung mitnehmen.

Außerdem bedanke ich mich beim ganzen Team der AG Bruchhaus. Alle haben mich offen und herzlich empfangen und jeder war bereit bei Fragen und Missverständnissen zu helfen. Ich wünsche euch allen viel Erfolg und dass ihr das findet was ihr sucht und für euer Leben braucht.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meinen Freunden, meinen beiden Brüdern und bei meiner ganzen Familie. Denn was wären wir ohne die Menschen, die uns lieben und die wir lieben? Was wären wir ohne die anderen, ohne menschliche Begegnungen? Niemals wurde etwas von einem Menschen allein erschaffen. Wir sind alle aufeinander angewiesen. Es gibt nichts Wichtigeres auf der Welt als den Menschen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Hamburg, 26. Juli 2023

A black rectangular box redacting the signature of the author.

Florian Kieferle