

Hochschule für Angewandte Wissenschaften

Fakultät Life Sciences

Interaktion der *Plasmodium falciparum* PfEMP1-Variante IT4var46 mit Endothelrezeptoren unter statischen und Flussbedingungen

Bachelorarbeit

Biotechnologie

vorgelegt von

Sandy Quynh Nhu Nguyen

Matrikelnummer: [REDACTED]

Hamburg

am 05.12.2025

Erstgutachter: Prof. Dr. Julien Béthune (HAW Hamburg)

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Iris Bruchhaus (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin)

In Zusammenarbeit mit dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Zusammenfassung

Malaria ist eine durch einen einzelligen Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursachte Tropenkrankheit. Sein Auftreten ist vor allem in Afrika, Südostasien und Teilen Südamerikas zu beobachten. Die gefährlichste Form, die durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wird, wird von weiblichen Anopheles-Mücken übertragen. Nach dem Stich wandern Sporozoiten in die Leber. In der Leber vermehren sie sich und infizieren anschließend Erythrozyten. Dort bewirken ihre Entwicklungszyklen Fieberschübe und hämolytische Symptome.

Die hohe Pathogenität von *P. falciparum* resultiert aus der Fähigkeit infizierter Erythrozyten, sich an Endothelzellen anzulagern und so der Milz zu entkommen. Diese Zytoadhäsion führt zu Kapillarverstopfungen, Durchblutungsstörungen, Entzündungen, Organversagen und kann in zerebraler Malaria münden. Sie wird durch Proteine der PfEMP1-Familie vermittelt, die von etwa 45–90 *var*-Genen kodiert werden.

Die Untersuchung hatte zum Ziel, die Adhäsionseigenschaften der PfEMP1-Variante IT4-var46 bei der Interaktion mit CHO-Rezeptoren unter statischen und Flussbedingungen zu analysieren. Statische Assays bieten die Möglichkeit einer detaillierten Analyse molekularer Bindungsereignisse, während Experimente unter Flussbedingungen eine realistischere Darstellung der physiologischen Verhältnisse im Blutkreislauf ermöglichen. Dafür kamen transgene CHO-Zelllinien mit unterschiedlichen Rezeptoren und der *P. falciparum*-Transfektant IT4-var46 zum Einsatz. IT4-var46 weist in beiden Experimenten eine signifikante Bindung an den Rezeptor CD36 auf, sowohl in statischen Bindungs-Assays als auch unter Flussbedingungen. Unter Fluss ergab sich insbesondere ein rollendes Adhäsionsverhalten der infizierten Erythrozyten an CD36-exprimierenden Zellen, was charakteristisch mit einer milden Verlaufsform der Malaria in Verbindung gebracht wird.

Die beobachteten Unterschiede in Haftung und Bindungsstabilität bieten wichtige Hinweise für das Verständnis der Pathogenese von *P. falciparum* und bilden die Grundlage für die Entwicklung therapeutischer Strategien, die auf eine gezielte Hemmung der Zytoadhäsion abzielen.

I. Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
I. Inhaltsverzeichnis	3
II. Tabellenverzeichnis	6
III. Abbildungsverzeichnis	7
IV. Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Malaria	10
1.2 Lebenszyklus des <i>P. falciparum</i>	13
1.2.1 Erythrozyteninvasion und Wirtszell-Anpassung	14
1.2.2 Sequestrierung	16
1.2.3 <i>knobs</i>	17
1.3 Genetik und Immunflucht von <i>PfEMP1</i>	18
1.3.1 <i>PfEMP1</i> -Proteinvariante IT4var46	19
1.4 Endothelrezeptoren	20
1.4.1 CD36	20
1.4.2 ICAM-1	20
1.4.3 CD9	20
1.4.4 CD37	20
1.4.5 CD55	21
1.4.6 CD81	21
1.4.7 TNFR1	21
1.4.8 TNFR2	21
1.4.9 VCAM-1	21
1.4.10 MDR1	22
1.4.11 EPCR	22

1.5	Vergleich von Zellinteraktionen unter statischen und unter Flussbedingungen	22
1.6	Zielsetzung, Hypothesen und wissenschaftliche Relevanz der Arbeit	23
2.	Materialien	24
2.1	Geräte.....	24
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.3	Chemische und biologische Reagenzien	25
2.4	Kulturmedien und Lösungen	26
2.5	Verwendete Zelllinien	29
2.6	Software	30
3.	Methoden.....	31
3.1	In-vitro-Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	31
3.2	Auftauprozess von <i>P. falciparum</i>	31
3.3	Gefrierprozess von <i>P. falciparum</i>	32
3.4	CHO-Zellen Kultivierung.....	32
3.5	Gefrierprozess von CHO-Zellen	33
3.6	Auftauprozess von CHO-Zellen.....	33
3.7	Sorbitol-Ring-Synchronisation.....	34
3.8	Percoll Schizont Synchronisation	34
3.9	Gelatine- <i>knob</i> -Anreicherung	35
3.10	Giemsa Färbung.....	36
3.11	RNA-Isolierung zur Transkriptionsanalyse	36
3.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
3.13	Panning-Verfahren	37
3.14	Ernte von Ringformen	38
3.15	Bindungs-Assay	38
3.16	Bindungs-Assay unter Flussbedingungen.....	40

3.17	Trypsin-Assay	43
4.	Ergebnisse	45
4.1	PCR-Verfahren	45
4.2	Panning-Verfahren	46
4.3	Bindungs-Assay	47
4.4	Bindungs-Assay unter Flussbedingungen	51
4.5	Western-Blot nach Trypsin Assay	56
5.	Diskussion	58
5.1	Panning-Verfahren	58
5.2	Bindungs-Assay	58
5.3	Bindungs-Assay unter Flussbedingungen	60
5.4	Nachweismethoden mittels PCR und Trypsin-Assay	61
5.5	Schlussbemerkung und Ausblick.....	62
6.	Literaturverzeichnis	63
7.	Eidesstattliche Erklärung	72
8.	Danksagung	73

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Liste aller verwendeten Geräte	24
Tabelle 2 Liste aller verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 3 Liste aller verwendeten chemischen und biologischen Reagenzien	25
Tabelle 4 Liste aller verwendeten Kulturmedien und Lösungen und deren Zusammensetzung	26
Tabelle 5 Liste aller verwendeten CHO-Rezeptoren.....	30
Tabelle 6 Liste aller verwendeten Softwares	30
Tabelle 7 Parameter für den Bindungs-Assay unter Flussbedingungen.....	43

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Weltweite Malaria- Inzidenz nach Ländern im Jahr 2021	11
Abbildung 2 Die jährliche Zahl der Todesfälle durch Malaria weltweit nach Regionen seit 2000.	12
Abbildung 3 Eine Darstellung des Lebenszyklus des <i>P. falciparum</i>	13
Abbildung 4 Die Unterschiede zwischen einem gesunden und einem von <i>P. falciparum</i> iEs nach Befall eines <i>P. falciparum</i> s	15
Abbildung 5 Vergleich der Morphologie und Oberflächenstruktur und iEs und Trophozoit-Stadium-iEs.	17
Abbildung 6 Strukturaufbau von IT4var46 mit spezifischen DBL- und CIDR-Abschnitten	19
Abbildung 7 Allgemeiner Versuchsaufbau des Bindungs-Assays unter Flussbedingungen	42
Abbildung 8 Ergebnis der PCR zum Transfektant var46 P4	45
Abbildung 9 Morphologie von IT4 var46-transfizierten Zellen nach bis zu viermaliger Passage über den CD36-CHO-Rezeptor	46
Abbildung 10 Repräsentative Mikroskopieaufnahmen von Bindungs-Assays mit var46 an CHO-Zellen, welche unterschiedliche Oberflächenrezeptoren exprimieren.	48
Abbildung 11 Repräsentative Mikroskopieaufnahmen von Bindungs-Assays mit var46 an CHO-Zellen, die verschiedene Oberflächenrezeptoren exprimieren.	49
Abbildung 12 Vergleich der Bindung von var46-iEs an verschiedene CHO-Zellrezeptoren.	50
Abbildung 13 Bindungs-Assay unter Flussbedingungen mit dem var46 P4 über den CHO-Zellen-Rezeptor CD36	53
Abbildung 14 Nachverfolgung von an CHO-CD36-Zellen gebundenen iEs.	54
Abbildung 15 Durchschnittliche Kontaktdistanz (μm) von IT4 var46 P4 über CD36 bei unterschiedlichen Scherkräften	55
Abbildung 16 Durchschnittliche Geschwindigkeit der iEs ($\mu\text{m}/\text{min}$) von IT4 var46 P4 über CHO-CD36 bei unterschiedlichen Scherkräften	56
Abbildung 17 Western Blot zur Analyse von var46- (A) und var46 P4- (B)PfEMP1 auf der Zelloberfläche nach Trypsin-Behandlung im Vergleich zur Kontrollprobe	56

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
BSA	<i>Bovine Adult Serum</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIDR	<i>Cysteine-rich interdomain region</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DBL	<i>Duffy-binding-like</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPCR	Endothelialen Protein-C-Rezeptor
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
G418	Neomycin
iEs	infizierte Erythrozyten
IgM	Immunglobulin M
K ⁺	<i>Knob</i> -positiv
K ⁻	<i>Knob</i> -negativen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MC	<i>Maurer's clefts</i>
MFS	Malaria Gefrierlösung
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MSP	Merozoiten-Oberflächenproteine
MTS	Malaria Auftaulösung
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NPPS	<i>New Permeability Pathways</i>
NTS	N-terminalen Segmentdomäne
O ₂	Sauerstoff

<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>PfEMP1</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrozyten-membranprotein 1
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
pH	Maß für den Säure- oder Basengehalt einer Flüssigkeit
<i>PIC</i>	<i>protease inhibitor cocktail</i>
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophoren Vakuolenmembran
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
STI	Soybean Trypsin Inhibitors
T25/T75	Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche in Quadratzentimetern; T25 (25 cm ²) und T75 (75 cm ²)
TVN	tubovesikuläre Netzwerk
Ups	<i>upstream sequence</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1 Malaria

Malaria gehört zu den weltweit wichtigsten tropischen Infektionskrankheiten. Sie wird durch einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* (*P.*) verursacht. Neben *P. falciparum* gibt es vier weitere humanpathogene Arten: *P. vivax*, das weltweit vorkommt und durch ruhende Hypnozoiten im Lebergewebe wiederkehrende Infektionen verursacht; *P. malariae*, das für meist milde, chronische Infektionen mit längerer Inkubationszeit hervorruft; *P. ovale*, das in zwei Unterarten existiert und ähnlich wie *P. vivax* Hypnozoiten bildet, jedoch in der Regel milder verläuft; sowie *P. knowlesi*, ein ursprünglich auf Makaken beschränkter Parasit, der vor allem in Südostasien zunehmend als Ursache schwerer Malaria beim Menschen auftritt. Die Übertragung erfolgt durch den Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke, die Sporozoiten in den Blutkreislauf einbringt [1] [2] [3] [4].

Der wichtigste Erreger ist *P. falciparum*, da er den Großteil der schweren Krankheitsverläufe und malariabedingten Todesfälle verursacht. Im menschlichen Wirt hat der Parasit einen komplexen Lebenszyklus: Nachdem er die Leber befallen hat, infiziert er zunächst die Erythrozyten. Dies verursacht eine zyklische Hämolyse, die sich durch Fieber, Schüttelfrost und Anämie äußert. Charakteristisch für *P. falciparum* sind unter anderem das Anheften von infizierter Erythrozyten (iEs) an den Gefäßwänden und die Rosettenbildung, was Komplikationen wie die zerebrale Malaria begünstigt [2] [3].

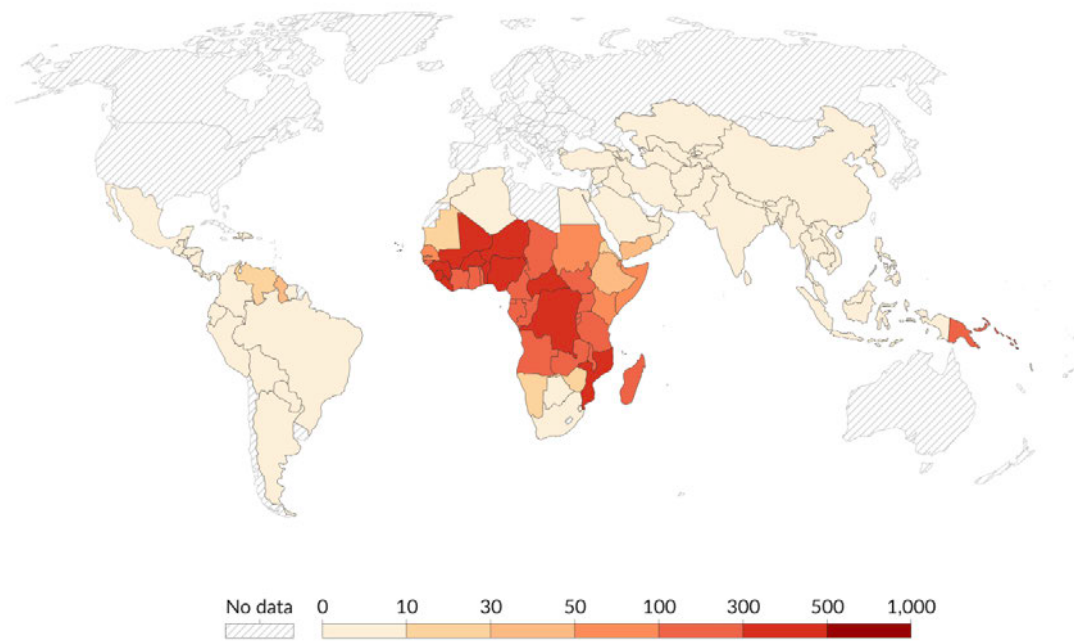


Abbildung 1 Weltweite Malaria- Inzidenz nach Ländern im Jahr 2021

Die Karte illustriert die jährliche Anzahl neuer Malariafälle pro 1000 Personen in Risikogebieten. In der Subsahara-Afrika sind die Werte besonders hoch, während andere Regionen weniger betroffen sind. Die Grundlage bilden die Weltbankdaten, Stand 2024 [5].

Malaria kommt hauptsächlich in tropischen und subtropischen Gebieten vor, besonders in Subsahara-Afrika, Südostasien und einigen Teilen Südamerikas (siehe Abbildung 1). Etwa 94% der Malariafälle in der WHO-Afrikanischen Region sind in Ländern wie Nigeria, der Demokratischen Republik Kongo, Uganda und Mosambik konzentriert, wobei Kinder unter fünf Jahren und Schwangere am meisten betroffen sind [6]. Die Auswirkungen von Klimaveränderungen, wie erhöhten Temperaturen und sich ändernden Niederschlagsmustern, sind für die Verbreitung der *Anopheles*-Mückenpopulation von großer Bedeutung; diese Veränderungen können die Übertragungszeiten der Krankheit verlängern und somit die Malariasituation, besonders in Subsahara-Afrika, verschärfen [7] [8]. Sozioökonomische Faktoren wie Armut, niedriger Bildungsstand und eingeschränkter Zugang zu Gesundheitsdiensten tragen zusätzlich zur Erhöhung der Krankheitslast bei und machen präventive Maßnahmen schwieriger [9] [8].

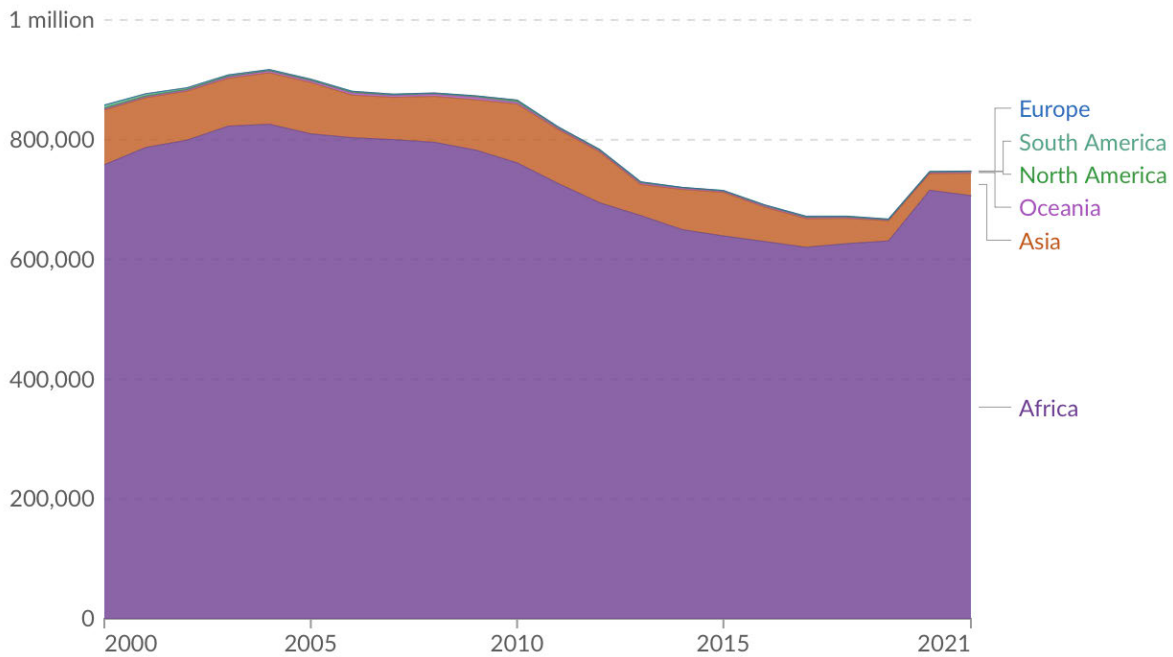


Abbildung 2 Die jährliche Zahl der Todesfälle durch Malaria weltweit nach Regionen seit 2000. Über 90% der Malariatodesfälle entfallen auf Afrika, während die Zahlen in anderen Weltregionen deutlich geringer sind. Insgesamt sind die Todesfallzahlen rückläufig, abgesehen von einem leichten Anstieg während der COVID-19-Pandemie [10].

Im Jahr 2023 verzeichnete die Weltgesundheitsorganisation (WHO) etwa 263 Millionen registrierte Neuerkrankungen, und rund 600.000 Menschen starben an den Folgen der Krankheit (siehe Abbildung 2). Kinder unter fünf Jahren und Schwangere sind besonders betroffen; ihr Risiko für schwere Verläufe ist besonders hoch. Malaria stellt aufgrund ihrer hohen Morbidität und Mortalität eine erhebliche gesundheitlichen und sozioökonomischen Belastung für viele Entwicklungsländer dar.

Um die Malaria zu bekämpfen, konzentrieren sich internationale Gesundheitsinitiativen auf einen Ansatz, der aus einer Kombination aus medikamentöser Therapie, Vektorbekämpfung und Impfstoffentwicklung besteht. Auch wenn in den letzten Jahrzehnten erhebliche Fortschritte erzielt wurden, ist Malaria immer noch ein Gesundheitsproblem mit komplexen Herausforderungen. Dazu zählen die unterschiedliche Immunantwort der Wirte, die parasitäre Diversität sowie Umweltfaktoren, die die Mückenpopulation und Übertragungsdynamik beeinflussen. Aufgrund dieser Aspekte ist es unerlässlich, dass grundlegende Forschungen zur Pathogenese und zur Immunologie der Malaria sowie zu den molekularen Mechanismen Interaktion zwischen Parasiten und Wirt durchgeführt werden [11] [12].

1.2 Lebenszyklus des *P. falciparum*

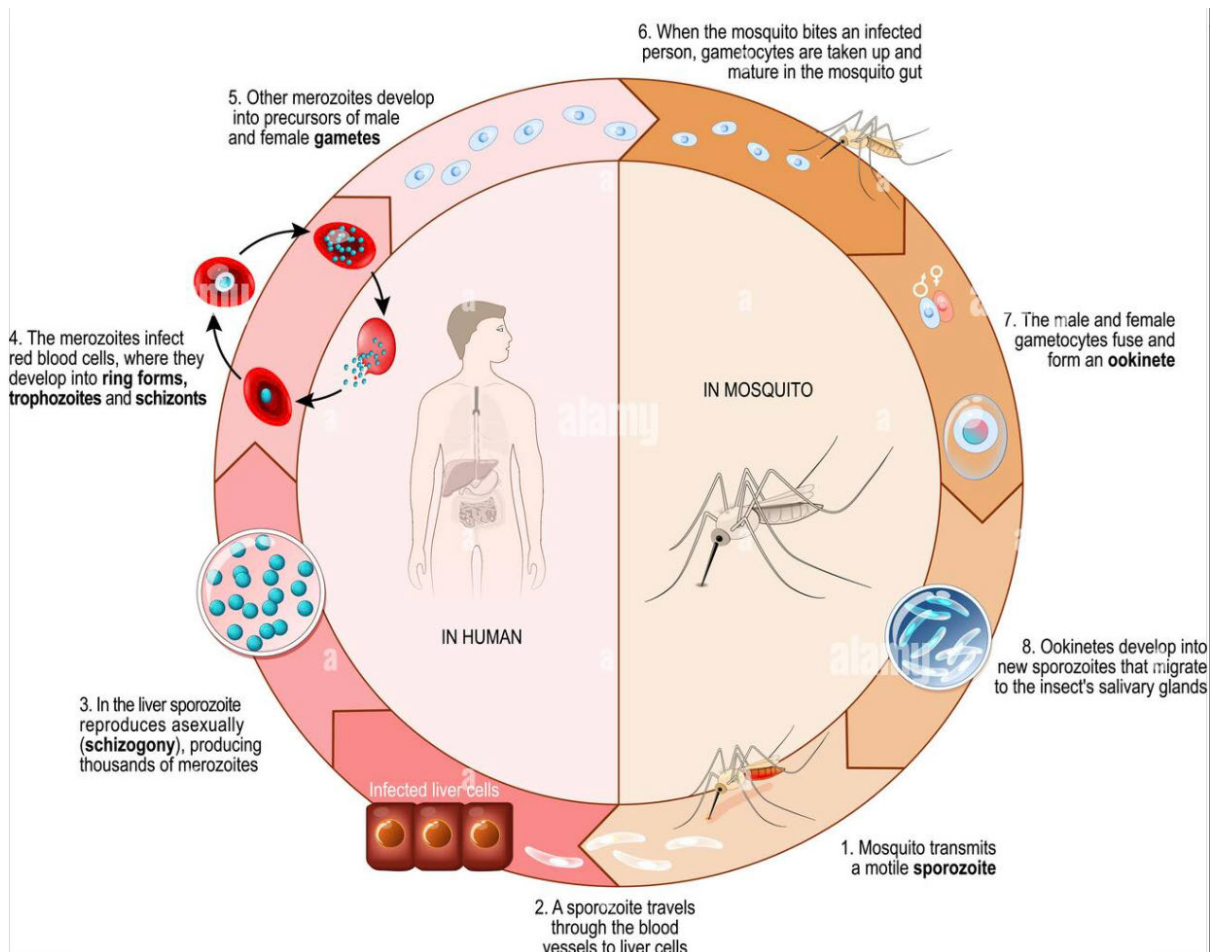


Abbildung 3 Eine Darstellung des Lebenszyklus des *P. falciparum*

Sporozoiten gelangen nach dem Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke in den menschlichen Körper; sie vermehren sich zuerst in der Leber und dann in den Erythrozyten. Einige Parasiten entwickeln sich zu Gametocyten; sie werden bei einem weiteren Mückenstich aufgenommen und starten im Mückendarm einen neuen Zyklus. Auf diese Weise wird der Entwicklungszyklus und die Infektionskette geschlossen [13].

Der Lebenszyklus des Malaria *tropica*-Erregers *P. falciparum* ist komplex und beinhaltet mehrere Stadien, sowohl im menschlichen Wirt als auch im weiblichen *Anopheles*-Mückenvektor (siehe Abbildung 3).

Die Infektion startet, wenn eine infizierte Mücke durch ihren Stich infektiöse Sporozoiten in den menschlichen Blutkreislauf überträgt. Sie wandern zur Leber, dringen in Hepatozyten ein und entwickeln sich zu Leberstadien. In den Leberzellen durchlaufen sie eine exoerythrozytäre Entwicklungsphase, die etwa 6 bis 7 Tage dauert und bis zu 30.000 Merozoiten pro infizierter Hepatozyte bildet [14] [15]. Nach Abschluss der

Leberphase werden die Merozoiten in den Blutkreislauf freigesetzt, was die erythrozytäre Phase einleitet, die für die klinischen Symptome der Malaria verantwortlich ist [11][12].

In den Erythrozyten entwickeln sich die Parasiten durch mehrere Stadien: vom frühen Ringstadium (ca. 20-24 Stunden) über das Trophozoitenstadium bis hin zum Schizontenstadium. Die gesamte erythrozytäre Phase erstreckt sich über etwa 48 Stunden. In diesem Zeitraum entwickeln sich etwa 16 bis 32 Merozoiten pro Schizont [16]. Die Erythrozytenlyse geschieht innerhalb einer Sekunde; dabei werden die Merozoiten freigesetzt, die innerhalb von ca. 10 Minuten neue Erythrozyten infizieren und so den parasitären Replikationszyklus fortsetzen [17].

Ein Teil der Parasiten entwickelt sich parallel zu den Gametozyten, den sexuellen Stadien, die innerhalb von etwa 10 bis 14 Tagen im Körper der weiblichen Mücke reifen und somit zur Weitergabe des Parasiten führen [18].

Die pathogenen Mechanismen von *P. falciparum* sind eng mit seiner Fähigkeit verbunden, iEs durch die Expression variabler Oberflächenproteine, wie das *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1), an das Endothelgefäß zu binden. Durch diese Adhäsion wird die Eliminierung der iEs in der Milz verhindert. Die Zytoadhäsion durch PfEMP1 führt zur Blockade kleiner Blutgefäße (Sequestrierung), was klinische Komplikationen wie zerebrale Malaria zur Folge haben kann. Außerdem ist sie mit der endothelialen Dysfunktion und der Auslösung von Entzündungsreaktionen verbunden, die den Krankheitsverlauf verschlimmern. Außerdem erfolgt während der Entwicklung der Erythrozyten eine antigenetische Variation der PfEMP1-Proteine, was es dem Parasiten ermöglicht, der Immunerkennung zu entkommen [16].

1.2.1. Erythrozyteninvasion und Wirtszell-Anpassung

Das Eindringen von Erythrozyten durch *P. falciparum* ist ein entscheidender Schritt im Lebenszyklus des Parasiten und bietet ihm wichtige Vorteile für sein Überleben. Ein wichtiger Aspekt ist die Fähigkeit, der Immunantwort des Wirtsorganismus zu entgehen. Da reife Erythrozyten keine *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche exprimieren, können sie keine Antigenpräsentation durchführen, wodurch der Parasit immunologisch weitgehend unerkannt bleibt [19]. Anders als im extrazellulären Raum ist der intrazelluläre Lebensraum für den Parasiten mit großen metabolischen Einschränkungen verbunden. Das einzige Nährstoffangebot ist das enthaltene Hämoglobin, welches jedoch einen Mangel an der essenziellen

Aminosäure Isoleucin aufweist. Diese Einschränkung der Nährstoffverfügbarkeit hat unmittelbare Auswirkungen auf das Wachstum und die Vermehrung des Parasiten [20] [21]. Um diese Defizite auszugleichen, induziert *P. falciparum* während seines intraerythrozytären Entwicklungszyklus umfangreiche strukturelle und funktionelle Veränderungen der Wirtszelle. Diese Anpassungen haben das Ziel, den Stoff- und Proteintransport zwischen Parasit, Wirtszytoplasma und extrazellulärem Milieu zu optimieren.

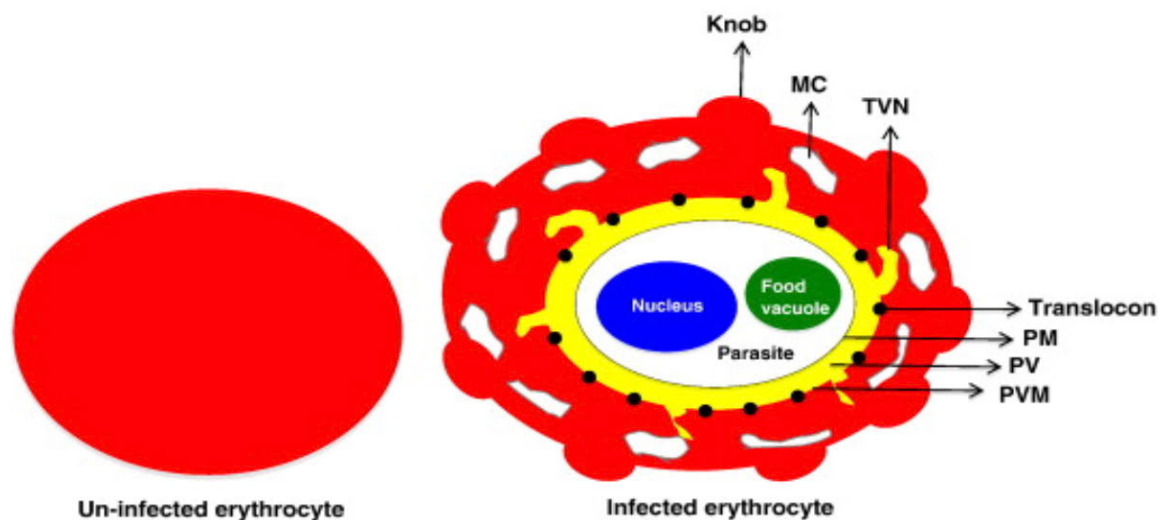


Abbildung 4 Die Unterschiede zwischen einem gesunden und einem von *P. falciparum* iEs nach Befall eines *P. falciparum*s

Während der Infektion nimmt der Parasit strukturelle und funktionelle Veränderungen an der Wirtszelle vor; es entstehen charakteristische Strukturen wie MC, TVN, PV und *knobs* an der Zelloberfläche, die für die Pathogenese und Immunflucht des Parasiten von entscheidender Bedeutung sind [22].

Der Eintritt des Parasiten in den Erythrozyten beginnt mit der Freisetzung der Merozoiten in den Blutstrom. Diese erkennen und binden geeignete Wirtszellen über spezifische Merozoiten-Oberflächenproteine (MSP), wobei eine präzise Ausrichtung des apikalen Endes an der Zellmembran erfolgt. Diese Interaktion führt zur Ausbildung eines stabilen Kontakts, über den der aktive Eindringprozess eingeleitet wird (siehe Abbildung 4). Nach dem Eindringen des Parasiten entsteht eine parasitophore Vakuole (PV), die als schützende Kompartimentierung zwischen dem Parasiten und dem Zytosol des Erythrozyten fungiert. Innerhalb der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) etabliert *P. falciparum* ein spezialisiertes Netzwerk an Transportmechanismen, die eine ausreichende Zufuhr lebenswichtiger Nährstoffe gewährleisten. Zu den dabei relevanten Strukturen zählen neu gebildete Permeabilitätskanäle, die sogenannten *New Permeability Pathways* (NPPS), welche den Import von Kohlehydraten,

Aminosäuren, Vitaminen und Cholin ermöglichen [23]. Zudem sind NPPs an der Entfernung von Stoffwechselendprodukten beteiligt, wodurch ein funktionelles Gleichgewicht im intrazellulären Milieu aufrechterhalten wird [24].

Neben den NPPs beteiligt sich ein weiteres durch den Parasiten induziertes System, das tubovesikuläre Netzwerk (TVN), an der intrazellulären Nährstoffdistribution. Dieses Netzwerk aus röhrenförmigen und vesikulären Strukturen erweitert die Kapazität des Parasiten zur Aufnahme und zum Transport kleiner Moleküle innerhalb der Wirtszelle [25]. Darüber hinaus führt die parasitäre Umgestaltung des Wirts zu tiefgreifenden morphologischen Veränderungen der Erythrozytenmembran. Ein wichtiger Aspekt ist die Bildung der sogenannten Maurer'schen Spalten (*Maurer's clefts*, MC), membranöser Kompartimente, die parasitenspezifische Proteine während des Exports an die Erythrozytenoberfläche ermöglichen [26] [27]. Diese strukturellen Anpassungen sind entscheidend, um die Wirt-Parasit-Interaktion zu stabilisieren und die langfristige Erhaltung der intrazellulären Nische von *P. falciparum* zu ermöglichen.

1.2.2 Sequestrierung

Ein entscheidender Mechanismus, der es *P. falciparum* ermöglicht, im menschlichen Körper zu überleben und gleichzeitig zur Schwere der Erkrankung beizutragen, ist die Sequestrierung. Dabei haften die iEs, insbesondere im Trophozoitenstadium, an den Gefäßwänden verschiedener Organe. Diese Adhäsion bewirkt eine Blockade des Blutflusses, die eine verminderte Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie die Akkumulation von Abfallprodukten zur Folge hat [28]. Drei unterschiedliche Muster der Zellbindung lassen sich unterscheiden: die Anheftung an Endothelzellen, die Bildung von Rosetten aus mehreren Erythrozyten sowie die Verklumpung durch Thrombozyten [29].

Ein zentraler Grund für das Festhalten der iEs an Gefäßwänden ist deren veränderte Oberflächenstruktur, die sonst zur Filterung Zerstörung in der Milz führen würde. In der Milz werden die abnormalen Zellen durch körperliche Auswahl und das Immunsystem erkannt und von Makrophagen phagozytiert [30]. Besonders in der roten Pulpa, wo sich ein Netzwerk aus Fasern bildet, werden diese veränderten Zellen zurückgehalten, während gesunde Zellen ungehindert passieren [31].

Die Schwere der Malaria richtet sich nach dem Ort der Sequestrierung. So führt die Anhaftung an den Protein-C-Rezeptor im Gehirngefäßendothel häufig zu zerebraler Malaria, einer lebensbedrohlichen Form der Krankheit [32] [33]. Ebenso kann die

Bindung der Parasiten an Chondroitinsulfat A in der Plazenta zu schwangerschaftsassoziierter Malaria führen, die erhebliche Risiken wie Totgeburten, Anämie der Mutter und geringes Geburtsgewicht des Kindes häufig auslöst [34] [35]. Diese hämodynamischen Blockaden und die resultierenden Gewebeschäden sind entscheidend für die Pathogenese der schweren Verlaufsformen der Malaria [36] [37].

1.2.3 knobs

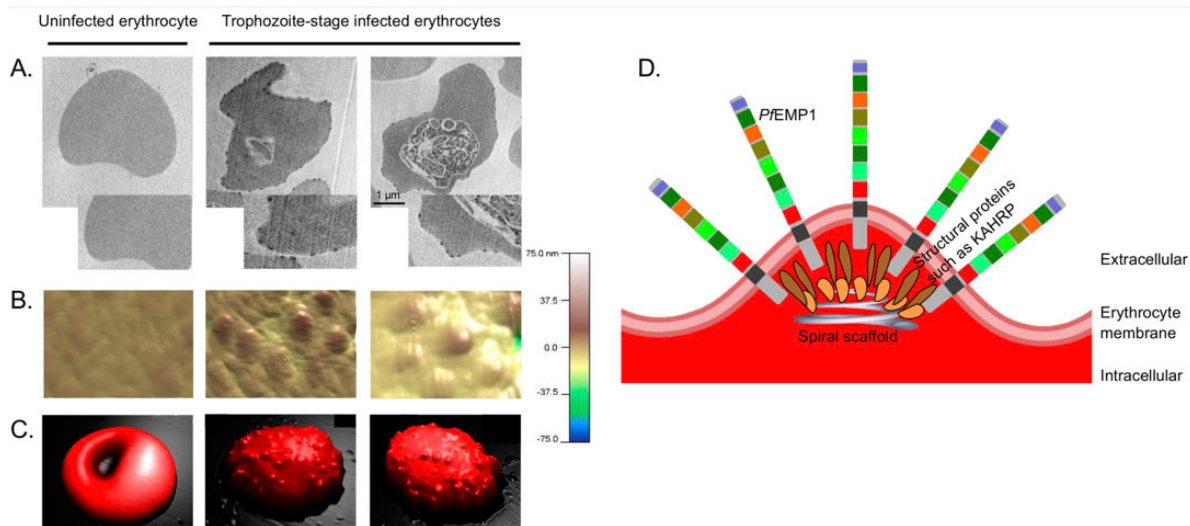


Abbildung 5 Vergleich der Morphologie und Oberflächenstruktur von iEs und Trophozoitenstadium-iEs.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen verdeutlichen die strukturellen Unterschiede zwischen gesunden und iEs. (B) Höhenprofilaufnahmen mit farblicher Codierung zeigen die Ausbildung charakteristischer *knobs* auf der Oberfläche infizierter Zellen. (C) 3D-Darstellung der Zelloberfläche bestätigen diese Veränderungen. (D) Schematische Darstellung der Anordnung von PfEMP1 und assoziierten Proteinen an den *knobs*, unterstützt durch ein spiralförmiges Gerüst aus strukturellen Proteinen wie KAHRP [38].

P. falciparum verändert aktiv die Membranstruktur seiner Wirtszellen, indem er eigene Proteine in die Erythrozytenmembran integriert (siehe Abbildung 6). Diese Umgestaltung führt zur Ausbildung kleiner Oberflächenstrukturen, sogenannter *knobs*. Dabei handelt es sich um knopfförmige Ausstülpungen auf iEs, die während des Trophozoitenstadiums entstehen – jener Entwicklungsphase, in der die Adhäsion an Endothelzellen besonders stark ausgeprägt ist [39].

Mehrere Studien zeigen, dass das Vorhandensein dieser *knobs* entscheidend für die Fähigkeit iEs ist, an Gefäßendothelzellen zu binden. Fehlen sie, kommt es zu einer deutlich geringeren Zytoadhäsion und damit meist zu mildereren Erkrankungsverläufen [40] [41]. Somit tragen die *knobs* wesentlich zur Pathogenität der *P. falciparum*-Malaria bei.

Die *knobs* fungieren außerdem als Ankerpunkte für das Protein *PfEMP1*, das zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen zählt und die Bindung der iEs an Endothelzellen vermittelt [42] [43]. Zusammen mit *PfEMP1* ist das *knob*-assoziierte histidinreiche Protein (KAHRP) Teil dieser Strukturen. (KAHRP) arbeitet mit Zytoskelettkomponenten wie Spektrin und Aktin zusammen, was eine Veränderung der mechanischen Stabilität der Zellmembran zur Folge hat [44] [45].

Durch diese strukturellen Anpassungen werden die *knobs* zu einem zentralen Element der Pathophysiologie schwerer Malariaformen.

1.3 Genetik und Immunflucht von *PfEMP1*

Die *var*-Genfamilie, die aus ungefähr 60 Genen pro Parasiten-Genom besteht, kodiert die *PfEMP1*-Proteine. Im Verlauf eines jeden Lebenszyklus wird nur eines der etwa 60 *var*-Gene während des Ringstadiums des Parasitenzyklus exprimiert, während die anderen Gene stillgelegt werden – ein Phänomen, das als *mutually exclusiv expression* bezeichnet wird [46]. Daraus resultiert, dass nur ein einzelnes *PfEMP1* auf der Oberfläche der iEs vorhanden ist, dass die Anheftung an das Endothel vermittelt und durch die antigenetische Variation vor Antikörpern des Wirts schützt, was zur Etablierung einer chronischen Infektion führt [47]. Der Parasit entkommt dem Immunsystem, indem er durch Transkriptionswechsel innerhalb der *var*-Genfamilie ständig neue Sequenzen exprimiert [48]. Die ständige Veränderung der Sequenzen führte zu einem evolutionär bedingten Polymorphismus. Ungefähr 35 der 60 *var*-Gene liegen in den Subtelomerregionen der Chromosomen, während die anderen in Clustern angeordnet sind. Ein *var*-Gen hat eine Größe von etwa 6-13 kb und setzt sich aus zwei Exons zusammen. Das erste Exon kodiert für die hochvariable extrazelluläre Region von *PfEMP1* sowie für die Transzellulardomäne, während das zweite Exon die konservierte ATS-Domäne im zytoplasmatischen Bereich codiert [49]. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit und der 5'-Promotorregionen werden *var*-Gene in vier *upstream sequence* Gruppen (Ups; A, B, C und E) klassifiziert [50] [51]. Hinsichtlich der Positionierung befinden sich die mit UpsA und UpsE assoziierten *var*-Gene in den Subtelomerregionen und werden in Richtung Telomer transkribiert. Im Gegensatz dazu liegen UpsC *var*-Gene in zentralen Chromosomenregionen, während UpsB *var*-Gene sowohl zentral als auch subtelomerisch lokalisiert sein können; beide Gruppen (UpsB und UpsC) werden vom Telomer weg transkribiert [52] [53].

1.3.1 *PfEMP1*-Proteinvariante IT4var46



Abbildung 6 Strukturaufbau von IT4var46 mit spezifischen DBL- und CIDR-Abschnitten

Die modulare Domänenstruktur der *PfEMP1*-Variante IT4var46 ist abgebildet, einschließlich spezifischer DBL- und CIDR-Abschnitte, die für die Bindung an verschiedene Wirtsrezeptoren verantwortlich sind [38].

Die IT4var46-Proteinvariante der *PfEMP1*-Familie ist ein wichtiger Akteur in der Pathogenese der Malaria. Als hochvariabler, membranständiger Glykoproteinkomplex ist *PfEMP1* der Hauptmediator für die Zytoadhäsion und wird auf der Oberfläche von iEs präsentiert. Die genetische Vielfalt der *var*-Gene, welche die Bildung von *PfEMP1* steuert, erlaubt es dem Parasiten, zahlreiche Wirtsrezeptoren zu erkennen und durch antigenetische Variation der Immunerkennung zu entkommen [53] [52]. Der IT4-Isolat ist eine Variante innerhalb dieser polymorphen Familie, die durch bestimmte Sequenzen und Domänenkonfigurationen gekennzeichnet ist. Ein Beispiel dafür, wie die modulare Domänenstruktur aus *Duffy binding-like*- (DBL-) und *cysteine rich interdomain regions*- (CIDR-) Modulen jede *PfEMP1*-Variante für spezifische Bindungsinteraktionen mit Wirtsmolekülen verantwortlich ist, wird hier gezeigt. Die lineare Anordnung der einzelnen Domänen von IT4var46 ist in Abbildung 6 dargestellt. Sie startet mit der N-terminalen Segmentdomäne (NTS) und umfasst mehrere DBL- und CIDR-Domänen. Die DBL α 0.10-, CIDR α 2.2-, DBL δ 1-, CIDR γ 4-, DBL ϵ 2-, DBL ζ 3- und DBL ϵ 3-Domäne sind dabei typisch. Besonders erwähnenswert ist, dass die Domänen DBL ϵ 2 und DBL ϵ 3 laut aktuellen Analysen stark mit der Bindung an Immunglobulin M (IgM) assoziiert sind, was für die Immunflucht des Parasiten eine wichtige Rolle spielt. Insgesamt verdeutlicht die Abbildung prägnant die organisationsspezifische Reihenfolge und funktionelle Vielfalt der Domänen von IT4var46, wobei jede Domäne unterschiedliche Bindungseigenschaften besitzt, die das Adhäsions- und Immunevasionsvermögen von *P. falciparum* modulieren können [54] [38].

1.4 Endothelrezeptoren

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Rezeptoren eingesetzt, um zu untersuchen, wie *P. falciparum* mit menschlichen Endothelzellen interagiert. Dabei kamen unterschiedliche folgende Rezeptoren zum Einsatz: CD36, ICAM-1, CD9, CD37, CD55, CD81, TNFR1, TNFR2, VCAM-1, MDR1 und EPCR.

1.4.1 CD36

Bei CD36 handelt es sich um ein transmembranöser Glycoprotein-Rezeptor mit mehreren Fettsäurebindungsstellen. Dieser wird als Klasse-B-Scavenger-Rezeptor eingestuft. CD36 besitzt zwei kurze cytoplasmatische Domänen und ein großes extrazelluläres Domänenmodul für Ligandenerkennung. Zudem spielt es eine bedeutende Rolle bei der Lipidaufnahme, Entzündungsreaktionen und vermittelt spezifisch die Bindung von Malaria-Parasiten an Endothelzellen [55].

1.4.2. ICAM-1

Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Familie, das fünf Ig-ähnliche Domänen besitzt. Die extrazellulären Domänen vermitteln Zelladhäsion durch Bindung an Leukozytenintegrine. ICAM-1 ist ein Schlüsselmolekül für die Adhäsion von iEs im Kontext von Infektionen wie Malaria [56].

1.4.3. CD9

CD9 gehört zur Tetraspanin-Familie, charakterisiert durch vier transmembranäre Helices und intrazelluläre sowie extrazelluläre Schleifen. Diese Struktur erleichtert die Bildung multipler Membrankomplexe, die an Zelladhäsion, Migration und Signaltransduktion beteiligt sind. CD9 reguliert die Endothelfunktion insbesondere im Bereich der Zellmigration und Angiogenese [57].

1.4.4. CD37

Ein weiteres Tetraspanin, CD37, verfügt über eine vergleichbare Topologie wie CD9 mit vier transmembranären Regionen und extrazellulären Schleifen. CD37 modifiziert die Immunzelladhäsion und -migration durch Beeinflussung von Integrinverteilungen und Zytoskelettdynamik [58].

1.4.5. CD55

CD55 ist ein Glykoprotein mit mehreren kurzen, extrazellulären Domänen, das die Zellen vor Komplementaktivierung schützt. Die GPI-Verankerung an der Membran erlaubt Flexibilität, was wichtig für seine regulatorische Rolle im Komplementsystem ist. Zusätzlich ist CD55 an der Parasiteninvasion beteiligt [59].

1.4.6. CD81

CD81 ist ebenfalls ein Tetraspanin mit der typischen Topologie aus vier transmembranären Segmenten. Es moduliert Zelladhäsion und Migration, indem es mit anderen Membranproteinen interagiert und Signalwege steuert. Besonders relevant ist CD81 für die Kontrolle von Immunzellen und trophoblastischen Zellfunktionen [60].

1.4.7. TNFR1

Der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) hat eine extrazelluläre Ligandbindedomäne mit cysteinhaltigen Wiederholungen sowie eine intrazelluläre Todesdomäne, die Apoptose und Entzündungssignale vermittelt. In Endothelzellen wird TNFR1 zur Steuerung von Entzündungs- und Überlebensprozessen verwendet [61].

1.4.8. TNFR2

Das Hauptmerkmal das TNFR2 von TNFR1 unterscheidet, ist das Fehlen einer Todesdomäne. Es besteht aus mehreren cysteinhaltigen Domänen in der extrazellulären Region und fördert das Überleben und die Proliferation von Zellen über den NF- κ B-Signalweg. TNFR2 spielt eine wichtige Rolle in der Gefäßneubildung und der Immunregulation [62].

1.4.9. VCAM-1

VCAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das aus sieben Ig-ähnlichen extrazellulären Domänen besteht. Es ermöglicht die Anheftung von Leukozyten an das Endothel durch die Bindung an Integrine und ist somit entscheidend für Entzündungsprozesse und pathogen-induzierter Zelladhäsion [63].

1.4.10. MDR1

MDR1 ist ein ATP-abhängiger Transporter mit 12 transmembranären Helices, der Xenobiotika und Arzneimittel aus Zellen transportiert. Seine Rolle in der Malaria-Infektion ist zwar noch nicht vollständig verstanden, aber MDR1 hat Auswirkungen auf die Barrierefunktion und den Stofftransport in Endothelzellen [64].

1.4.11. EPCR

Der Endothel-Prostazyklin-Rezeptor (EPCR) hat eine extrazelluläre Domäne, die vom CD1-Familienstrukturtyp ist, und bindet Protein C sowie verwandte Liganden. EPCR ist bekannt dafür, die Blutgerinnung zu regulieren und als Bindungsstelle für *P. falciparum* zu fungieren; es spielt somit eine Rolle in der Pathogenese schwerer Malariaformen [65].

1.5 Vergleich von Zellinteraktionen unter statischen und unter Flussbedingungen

Die Wirkung von hämodynamischen Bedingungen auf die Beziehung zwischen iEs und vaskulären Endothelzellen ist ein entscheidender Aspekt der Malariapathogenese und beeinflusst die Zytoadhäsionseffizienz. Aber viele *in vitro* Modelle nutzen statische Kulturbedingungen ohne Blutfluss. In solchen Situationen können iEs zwar an Endothelrezeptoren binden, jedoch ohne den Einfluss des durch den Blutstrom erzeugten Scherstress. Dies erleichtert die Adhäsion, spiegelt jedoch die physiologischen Bedingungen im menschlichen Kreislaufsystem nur unzureichend wider. Im Gegensatz dazu ermöglichen dynamische Flussbedingungen, wie sie in mikrofluidischen oder Flusskammer-Systemen vorkommen, eine realistischere Nachbildung der hämodynamischen Kräfte und machen es möglich, die Zytoadhäsion unter physiologisch relevanten Scherkräften zu untersuchen [66].

Die dynamischen Wechselwirkungen werden durch mechanische Deformationen der Erythrozytenmembran und durch spezifische Bindungsdomänen, die unter Flussbedingungen aktiviert oder verstärkt werden, moduliert. Mikrofluidische Systeme und Flow-Assays sind wertvolle Werkzeuge, um diese Prozesse genau zu analysieren und zu bestimmen, wie Flussgeschwindigkeit und Scherkräften die Adhäsionsstärke beeinflussen. Die unterschiedlichen Ergebnisse zur Zytoadhäsion, die man durch statische und dynamische Modelle erhält, haben bedeutende Folgen für die Schaffung von

Therapieansätzen, weil sie die Bindungsmechanismen unter realistischen Bedingungen und somit die Zielstrukturen für Interventionen besser darstellen [67] [68].

1.6 Zielsetzung, Hypothesen und wissenschaftliche Relevanz der Arbeit

Die vorliegende Arbeit analysiert, wie die *P. falciparum*- PfEMP1-Variante IT4var46 mit unterschiedlichen CHO-Rezeptoren interagiert, sowohl unter statischer als auch unter rollender Bindung.

Das Hauptaugenmerk liegt darauf, zu erforschen, ob und wie stark die PfEMP1-Variante IT4var46 an bestimmte CHO-Rezeptoren bindet. Danach erfolgt die Analyse der Bindung unter dynamischen Bedingungen, wobei vor allem die Wirkung der Scherkraft im Fokus steht: Ab welcher Kraft entsteht die Bindung, bei welcher Kraft löst sie sich wieder, und ob eine feste oder rollende Bindung zu beobachten ist. Falls eine rollende Bindung auftritt, kann zusätzlich die Bewegungsgeschwindigkeit bestimmt werden.

Ziel dieser Untersuchung ist es, die molekularen Mechanismen besser zu verstehen, die zur Adhärenz iEs an das Gefäßendothel beitragen, sowie die entsprechende Transfektante zu charakterisieren. Dabei soll untersucht werden, an welche Rezeptoren IT4var46 sowohl unter statischen als auch unter rollenden Bedingungen bindet, welche Bindungstypen dabei nachgewiesen werden können und ob ein Zusammenhang zwischen der Bindungsinzidenz und dem Schweregrad der Malaria besteht.

2. Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 1 Liste aller verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bioanalyzer	Agilent 2100	Agilent Technologies
Gefrierer (-80°C)	FORMA 700 Series	Thermo Scientific
Ibidi Pump System	System-10902	Ibidi
Inkubator mit CO ₂	Function Line	Heraeus Instruments
Invertierendes Mikroskop	Axiscope M1	Zeiss
Mikroskop	CX31	Olympus
Mikroskop	EVOS XL	Thermo Scientific
pH-Meter	CG840	Sartorius AG
Photometer	NanaDrop 2000	Thermo Scientific
Sterile Werkbank	Class II BSC	ESCO Labculture
Thermomixer	5355R	Eppendorf
Vortex Mixer	VF2	Janke & Kunkel
Waage	BP210S	Sartorius
Wasserbad	SW20	Julabo
Zentrifuge	5427 R	Eppendorf
Zentrifuge	5415 D	Eppendorf
Zählkammer		Marienfeld Superior

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Liste aller verwendeten Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
24-Well-Zellkulturplatte	Sarstedt
1,5 ml/ 2 ml Safe-lock Reaktionsröhrchen	Eppendorf
Autoklavierbeutel	Amcor
Zellkulturflasche T25/T75	Thermo Scientific
Deckgläschen 13 mm (Plastik)	Sarstedt

Konische Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml	Falcon
Decosept Pur	Dr. Schumacher
Filterpipette 10/20/200/1000 µl	Sarstedt
Milipore Stericup	Merck
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Scientific
Parafilm	Bemis
Petrischale	Sarstedt
Serologische Pipetten 5/10/25 ml	Sarstedt
Sterile FACS-Röhrchen 5 ml	Falcon
Sterile Vakuumfilter	Merck
Spritze 20 ml	B. Braun
Spritzenfilter 0,2 µm	Sarstedt

2.3 Chemische und biologische Reagenzien

Tabelle 3 Liste aller verwendeten chemischen und biologischen Reagenzien

Artikel	Hersteller
Aceton	Roth
Accutase	Pan-Biotech
Albumax	Life Technologies
Ampicillin	Roth
Biocoll Trennlösung	Biochrom
Bovine Adult Serum (BSA)	Biomol
Chloroform	Roth
Dako Fluoreszenz Mounting Medium	Dako
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
D- Sorbitol	Sigma
Ethanol	Merck
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma
Neomycin (G418)	Greiner Bio-One
Percoll	GE Healthcare
Gentamicin	Ratiopharm

Giemsa Lösung	Merck
Glukose	Roth
Glutaraldehyde (25%)	Merck
Glycerol	Merck
Hams F12	PAN-Biotech
Human Blood (0+)	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Hypoxanthine (9636-5G)	Sigma
Immersionsöl 518 N	Zeiss
Isopropanol	PAN-Biotech
Leica CV Mount	Leica Biosystems
Methanol	Sigma
NaCl	Roth
NaHCO ₃	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Sigma
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Gibco, pH 7,4, ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺	ThermoFisher
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies
Percoll (17-0891-02)	GE Healthcare
RNase AWAY Spray Bottle	Roth
RPMI-1640 + L-Glutamin; +25 mM HEPES: -NaHCO ₃	AppliChem
Trizol Reagenz	Life Technologies

2.4 Kulturmedien und Lösungen

Tabelle 4 Liste aller verwendeten Kulturmedien und Lösungen und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
1% Gelatine	für die <i>knob</i> Anreicherung
	175 Bloom Gelatinepulver 1 g
	lösen in <i>P. falciparum</i> Kulturmedium 100 ml
	rühren bei 37°C

	Sterilfiltration Lagerung bei 4°C	0,22 µm
5% D-Sorbitol-Lösung	für 100 ml – zur Ringstadien-Synchronisation: D-Sorbitol lösen in dH ₂ O Sterilfiltration Lagerung bei 4°C	50 g 100 ml 0,22 µm
10% Giemsa	für die Plasmodium-Blutausstrichfärbung: Giemsa lösen in dH ₂ O Lagerung bei RT für max. 2 Tage	90 ml 100 ml
Bindungsmedium	für 1l Lösung: RPMI 1640 Pulver D-Glukose lösen in dH ₂ O mit NaOH pH-Wert regulieren Sterilfiltration Lagerung bei 4°C für 2 Wochen	16,4 g 20 g 1 l 7,2 0,22 µm
CHO Kulturmedium (vollständig)	Ham's F12 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES. <i>Fetal bovine serum</i> (inaktiviert bei 56°C für 45 Min.) Penicillin/ Streptomycin Mix (100x) Lagerung bei 4°C für 3 Wochen	500 ml 50 ml
CHO-PBS (10x)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) KH ₂ PO ₄ auffüllen mit dH ₂ O pH-Wert regulieren auf autoklavieren Lagerung bei RT	80 g, 1.37 M 2g, 27 mM 14,4 g , 101 mM 2,4 g, 18 mM 1 l 7,4
CHO-PBS (1x)	für ein 1 l Lösung CHO-PBS (10x)	100 ml

	auffüllen mit dH ₂ O autoklavieren Lagerung bei RT	900 ml
CHO Gefrierlösung	CHO Kulturmedium (vollständig) DMSO (10% steril). Vortexen Sterilfiltration Lagerung bei RT Lagerung bei 4°C	45 ml 5ml
Knob Lösung	RPMI 1640 auffüllen mit dH ₂ O	16,4 g 1 l
Kulturmedium	HAMS F12 FCS Streptomycin	500 ml 50 ml 5 ml
Malaria Auftaulösung (MTS)	NaCl lösen in dH ₂ O Sterilfiltration Lagerung bei 4°C	35 g 1 l 0,22 µm
Malaria Gefrierlösung (MFS)	D-Sorbitol NaCl Glycerol (autoklaviert) lösen in dH ₂ O Sterilfiltration Lagerung bei 4°C	3 g 0,65 g 72 ml 28 ml 0,22 µm
RPMI	für die <i>knob</i> Anreicherung RPMI 1640 Pulver lösen in dH ₂ O Sterilfiltration Lagerung bei 4°C	16,4 g 1 l 0,22 µm
RPMI	mit Albumax (steril filtriert) RPMI 1640 Pulver Hypoxanthin NaHCO ₃ (7,5%)	16,4 g/l 0,05 g/l 30 ml/l

	Gentamicin (40 mg/ml).	250 µl
	pH-Wert	7,2
Weiser Buffer	Na ₂ HPO ₄	2,09 g
	KH ₂ PO ₄	0,49 g

2.5 Verwendete Zelllinien

Für die Arbeit wurden CHO-745-Zellen als Wirtsmodell für die Expression spezifischer Endothelrezeptoren verwendet. Diese Zelllinie zeichnet sich durch einen Defekt in der Biosynthese von Glykosaminoglykan-Seitenketten aus. Es hat zur Folge, dass der plazentare Adhäsionsrezeptor Chondroitin-4-Sulfat, an den *P. falciparum*-iEs typischerweise bindet, nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird [69].

Die CHO-745-Zellen wurden mittels stabiler Transfektion mit den Plasmidkonstrukten pAc-GFP1-N1_ERxy sowie pEGFP-N1_ERxy versehen, welche jeweils die Sequenz eines spezifischen Endothelrezeptors in Fusion mit dem grünen Fluoreszenzprotein (GFP) kodieren. Das resultierende Fusionsprotein besteht in seinem extrazellulären Teil vollständig aus der jeweiligen Rezeptordomäne, während das GFP ausschließlich intrazellulär lokalisiert ist und somit keine Beeinflussung der Rezeptorextrazellulärdomäne erfolgt [69].

Eine CHO-GFP-Zelllinie, welche lediglich das intrazellulär exprimierte GFP enthält, diente als Negativkontrolle. Die Verwendung dieser Kontrolle ermöglichte den Ausschluss möglicher Einflüsse des GFP auf die Bindung der iEs und bestätigte, dass keine unspezifische Adhäsion der iEs an andere Zelloberflächenstrukturen der CHO-Zellen stattfindet. Eine Zusammenstellung der verwendeten Zelllinien ist in Tabelle 5 dargestellt.

Abgesehen von der CHO-K1-EPCR-Zelllinie, die von Thomas Lavstsen (Universität Kopenhagen) bereitgestellt wurde, stammen alle weiteren Zelllinien von Jana Brehmer (BNITM, AG Bruchhaus). Als Parasitenstamm wurde das *P. falciparum*-Isolat IT4 verwendet, einschließlich der daraus abgeleiteten var46-Transfektante. Der IT4-Stamm wurde im August 1967 aus einem Patienten in Westafrika isoliert und anschließend kultiviert [70].

Tabelle 5 Liste aller verwendeten CHO-Rezeptoren

Name	Rezeptor	Vektor
CHO-CD36	CD36	pAc-GFP1-N1
CHO-GFP	-	pAc-GFP1-N1
CHO-ICAM-1	ICAM-1	pAc-GFP1-N1
CHO-VCAM-1	VCAM-1	pAc-GFP1-N1
CHO-TNFR1	TNFR1	pAc-GFP1-N1
CHO-TNFR2	TNFR2	pAc-GFP1-N1
CHO-CD9	CD9	pEGFP-N1
CHO-CD37	CD37	pAc-GFP1-N1
CHO-CD55	CD55	pAc-GFP1-N1
CHO-CD81	CD81	pAc-GFP1-N1
CHO-MDR1	MDR1	pAc-GFP1-N1
CHO-K1_EPCR	EPCR	pAc-GFP1-N1

2.6 Software

Tabelle 6 Liste aller verwendeten Softwares

Name	Hersteller
Aligent 2100, Expert Software	Agilent Technologies
Prism 10	GraphPad Software
Ibidi Pump Kontrolle	Ibidi

3. Methoden

3.1 In-vitro-Kultivierung von *P. falciparum*

Die Kultivierung von *P. falciparum* wurde nach dem etablierten Verfahren von Trager und Jensen (1976) unter Verwendung des IT4-Isolats durchgeführt. Die Parasiten wuchsen in Kulturen mit 5 ml oder 10 ml des Nährmediums RPMI 1640. Der Hämokritgehalt wurde auf 5% eingestellt, um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einer Gasatmosphäre aus 5% CO₂, 1% O₂ und 94% N₂.

Das Kulturmedium wurde täglich erneuert, um eine kontinuierliche Versorgung mit Nährstoffen sicherzustellen. Parallel dazu wurden Hämatokrit und Parasitämie regelmäßig überprüft und bei Bedarf angepasst, um stabile Wachstumsverhältnisse zu gewährleisten. Bei der Kultivierung von SLI-Transfektanten wurde zusätzlich ein Selektionsdruck durch die Zugabe von G418 ausgeübt. Hierzu wurden jeweils 40 µl einer G418-Lösung auf 5 ml Medium gegeben. Die verwendete Stammlösung bestand aus 50 mg/ml G418, gelöst in steril filtriertem RPMI-Medium. Durch dieses Vorgehen konnte eine reproduzierbare und kontrollierte in-vitro-Kultur von *P. falciparum* sichergestellt werden.

3.2 Auftauprozess von *P. falciparum*

Der Auftauprozess von kryokonservierten *Plasmodium*-Parasiten begann mit dem schnellen Auftauen des Kryoröhrchens in einem bei 37°C temperierten Wasserbad. Sobald die Kryokultur vollständig aufgetaut war, wurde deren Inhalt in ein 15 ml-Falconröhrchen transferiert. Unter kontinuierlichem Tropfen wurde eine gleiche Menge vorgewärmter *Malaria Thawing Solution* (MTS) zugegeben, um einen schonenden Übergang und Zellschutz zu gewährleisten.

Die entstandene Mischung wurde für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 2-3 ml MTS resuspendiert. Anschließend erfolgte eine zweite Zentrifugation bei 1200 rpm für 2 Minuten. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, bis der Überstand klar erschien. Danach wurde der Überstand erneut entfernt, und das Pellet wurde langsam sowie tropfenweise mit 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium versetzt.

Abschließend erfolgt die Überführung der aufbereiteten Kultur in eine kleine Petrischale, der zusätzlich 250 µl Blut zugesetzt wurden, um optimale Bedingungen für

die Kultivierung zu schaffen. Das Kulturmedium wurde am folgenden Tag gewechselt, um ideale Wachstumsbedingungen für die reaktivierten Parasiten sicherzustellen.

3.3 Gefrierprozess von *P. falciparum*

Während des Gefrierprozesses von *Plasmodium*-Parasiten überleben ausschließlich Parasiten im Ringstadium, da andere Entwicklungsformen empfindlicher auf die Belastungen der Kryokonservierung reagieren. Eine höhere Parasitämie, also ein größerer Anteil iEs vor dem Einfrieren, führt dazu, dass sich die Kulturen nach dem Auftauen schneller von den schädigenden Effekten des Gefriervorgangs erholen können.

Für den Gefriervorgang wurde die suspendierte *Plasmodium*-Kultur zunächst in ein 15-ml-Falconröhrchen überführt und bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um die Zellen zu sedimentieren. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde dem verbleibenden Zellpellet tropfenweise 1 ml Malaria Freezing Solution (MFS) zugesetzt, wodurch eine schützende Umgebung für Erythrozyten und Parasiten geschaffen wurde. Anschließend wurde das präparierte Röhrchen umgehend bei -80°C gelagert, um die Zellen möglichst schonend zu konservieren und für eine spätere Verwendung bereitzuhalten.

3.4 CHO-Zellen Kultivierung

Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen, die speziell für adhärente Zelllinien geeignet waren. Hierbei wurden Flaschen der Größen T25 mit einem Mediumvolumen von 5 ml sowie T75 mit 15 ml verwendet. Der Konfluenzgrad der Zellen wurde täglich mithilfe eines inversen Mikroskops überprüft. Die Inkubation fand bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% statt. Um ein Überwachsen der Zellkulturen zu vermeiden und ihre Vitalität zu erhalten, wurden regelmäßig Passagierungen durchgeführt und das Kulturmedium in definierten Intervallen ausgetauscht.

Für das Passagieren der adhärenenten Zellen wurde zunächst das verbrauchte Medium entfernt und die Zellschicht mit 5 ml vorgewärmtem 1x CHO-PBS gewaschen. Anschließend wurden den T25-Flaschen 500 µl und den T75-Flaschen 1,5 ml Accutase zugesetzt, um die Zellen enzymatisch von der Oberflächenmatrix zu lösen. Nach einer Inkubationsdauer von etwa 3-5 Minuten bei 37°C konnten die Zellen durch leichtes Klopfen von der Flaschenwand abgelöst werden. Anschließend wurden sie in 5 ml (T25) bzw. 15 ml (T75) frischem Medium resuspendiert, wodurch die Accutase

inaktiviert wurde. Entsprechend der erreichten Zelldichte erfolgte im Anschluss die Überführung der Zellen in neue Kulturgefäße zur weiteren Kultivierung.

Zur Selektion transgener CHO-Zelllinien kamen selektive Antibiotika zum Einsatz. Für neomycinresistente Zelllinien wurden dem Kulturmedium 100 µl Neomycin (G418; 50 mg/ml) pro 5 ml Medium zugesetzt, was einer Endkonzentration von 0,98 mg/ml entsprach. Bei CHO-K1-EPCR-Zellen wurde die Selektion hingegen durch Zugabe von 25 µl Zeocin (100 mg/ml) pro 5 ml Medium durchgeführt, was einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml entsprach. Durch dieses Verfahren konnte eine stabile Kultivierung sowie eine gezielte Auswahl der gewünschten transgenen Zelllinien erreicht werden.

3.5 Gefrierprozess von CHO-Zellen

Zur Gefrierung der CHO-Zellen mussten diese zunächst, wie im Abschnitt 3.4 beschrieben, von der Oberfläche der Kulturfaschen gelöst werden. Nach dem Ablösen wurden die Zellen in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurde Zelllösung bei 1200 rpm für 2 Minuten zentrifugiert, um die Zellen zu sedimentieren. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, und das verbleibende Zellpellet wurde in 3 ml CHO-Freezing-Lösung resuspendiert.

Die entstandene Zellaufschlämmung wurde daraufhin in ein Gefriergefäß (Mr. Frosty) überführt und bei -80°C eingefroren. Durch die kontrollierte Abkühlung in diesem System konnte eine gleichmäßige Gefrierrate erzielt werden, wodurch die Vitalität und strukturelle Integrität der Zellen während des Einfrierprozesses weitgehend erhalten blieb.

3.6 Auftauprozess von CHO-Zellen

Zum Auftauen der CHO-Zellen wurde das Kryoröhrchen zunächst in ein Wasserbad bei 37°C eingestellt, bis die Zellsuspension vollständig aufgetaut war, was etwa 2 Minuten in Anspruch nahm. Anschließend wurden die Zellen in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit 10 ml CHO-Kulturmedium resuspendiert, um Rückstände des Gefriermediums zu verdünnen. Die resultierende Suspension wurde im Anschluss bei 1200 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet gemäß dem etablierten Standardverfahren in frischem Medium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung überführt. Durch dieses Vorgehen konnte eine schonende Regeneration der aufgetauten Zellen gewährleistet und eine rasche Wiederaufnahme des Zellwachstums in Kultur ermöglicht werden.

3.7 Sorbitol-Ring-Synchronisation

Die Behandlung einer *P. falciparum* -Kultur mit D-Sorbitol-Lösung diente der Synchronisation, indem reifere Parasitenformen wie Trophozoiten und Schizonten entfernt und dadurch die Ringstadien (junge Trophozoiten) selektiv angereichert wurden.

Die Sorbitol-basierte Ringsynchronisation erfolgte in mehreren aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten, um eine homogene Population synchronisierter Parasitenstadien zu erhalten. Zunächst wurde die Kultur in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das verbleibende Erythrozytenpellet mit der fünffachen Menge vorgewärmter 5%-D-Sorbitol-Lösung resuspendiert, was typischerweise einem Verhältnis von 2,5 ml Sorbitol zu 0,5 ml Pellet entsprach. Anschließend wurde die Suspension für 10 bis 20 Minuten bei 37°C inkubiert und währenddessen regelmäßig invertiert, um eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten.

Nach der Inkubationsphase wurde erneut für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Zur Kontrolle des Behandlungserfolges wurde aus 1-3 µl des Pellets ein Blutaussstrich angefertigt. Danach wurde das Pellet mit 5 ml frischem, vorgewärmten Kulturmedium gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 2000 rpm) erneut resuspendiert.

Abschließend wurde das Pellet in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium (bei Kultivierung in kleineren Petrischalen entsprechend in 5 ml) aufgenommen und in die vorbereitete Kulturschale überführt. Durch die Zugabe frischen Blutes wurden optimale Bedingungen für das weitere Wachstum der synchronisierten Parasiten geschaffen.

3.8 Percoll Schizont Synchronisation

Die Percoll-Schizont-Synchronisation dient der Anreicherung und Synchronisierung von späten Trophozoiten, Schizonten und freien Parasiten innerhalb der Kultur. Zur Durchführung wurde zunächst eine 60%ige, gekühlte Percoll-Lösung hergestellt und 4 ml davon in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt. Anschließend wurde die suspendierte Parasitenkultur vorsichtig auf die Percoll-Schicht aufgeschichtet, üblicherweise im Verhältnis von 10 ml oder 5 ml Kultur zu der Percoll-Lösung. Die Probe wurde danach bei 2000 rpm für 8 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis etwa 1 cm über der Percoll-Medium-Schicht entfernt. Die verbleibende Lösung – ohne das Erythrozytenpellet am Boden – wurde in ein neues 15 ml-Falconröhrchen überführt und für weitere 5 Minuten bei 4000

rpm zentrifugiert. Dabei bildete sich am Boden das Schizontpellet, das sichtbar war. Der Überstand wurde anschließend verworfen, und das Pellet wurde mit 10 ml frischem Kulturmedium gewaschen.

Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4000 rpm. Nach dem Entfernen des Überstands wurde aus 1 µl des Pellets ein Blutaussstrich angefertigt. Das restliche Pellet wurde in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium (bzw. in 5 ml bei Verwendung kleiner Petrischalen) resuspendiert und in die vorbereitete Kulturschale überführt. Zum Abschluss wurde frisches Blut hinzugegeben, um optimale Wachstumsbedingungen für die weitere Kultivierung der Parasiten zu gewährleisten.

3.9 Gelatine-*knob*-Anreicherung

Die Gelatine-*knob*-Anreicherung dient der Isolation von *knob*-positiven (K^+) Plasmodium-Parasiten in den Trophozoiten- und Schizontenstadien, da diese im Gegensatz zu *knob*-negativen (K^-) Parasiten und nicht infizierten Erythrozyten in einer 1% Gelatinelösung flottieren. Zunächst wurde die suspendierte Parasitenkultur in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde dem Pellet eine dem Volumen entsprechende Menge Kulturmedium sowie die vierfache Menge einer vorgewärmten 1% Gelatinelösung hinzugegeben (bspw. 0,5 ml Pellet, 0,5 ml Medium und 2 ml Gelatine).

Die Mischung wurde vorsichtig und ohne Schaumbildung homogenisiert und anschließend für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Während dieses Schrittes sammeln sich die *knob*-positiven iEs in der schwebenden Fraktion, während K^- Erythrozyten, Ringstadien und nicht infizierte Zellen absinken. Anschließend wurde der Überstand, welcher die angereicherten K^+ Erythrozyten enthielt, vorsichtig abgenommen und in ein frisches Falconröhrchen überführt, ohne das Pellet zu beeinträchtigen.

Die geerntete Überstandsfraktion wurde erneut für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und aus dem Pellet ein Blutaussstrich angefertigt. Das verbleibende Pellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Suspension in eine neue Petrischale überführt. Zur Sicherstellung optimaler Wachstumsbedingungen wurde frisches Blut hinzugegeben, um die weitere Kultivierung der isolierten K^+ Parasiten zu ermöglichen.

3.10 Giemsa Färbung

Zur Bestimmung des Entwicklungsstadiums und der Parasitämie in der Kultur wurde ein Blutaussstrich angefertigt. Dafür wurden 1 µl der Kultur auf einen Objektträger aufgetragen und mit einer sauberen Kante zu einem gleichmäßigen Monolayer verstrichen. Der Ausstrich wurde anschließend an der Luft getrocknet und danach für 30 Sekunden mit Methanol fixiert, um die Zellen zu stabilisieren und die Zellmorphologie zu erhalten.

Im folgenden Schritt wurde das Präparat mit einer 10%igen Giemsa-Lösung für 10 Minuten gefärbt. Nach dem Färben wurde die überschüssige Lösung mit Wasser abgespült, und der Objektträger trocknete erneut an der Luft. Danach erfolgte die Untersuchung des Präparats unter einem Lichtmikroskop, um die verschiedenen Entwicklungsstadien der Parasiten zu erkennen und die Parasitämie der Kultur zu bestimmen. Dank dieses Verfahrens war es möglich, die Erythrozyten und die darin befindlichen *Plasmodium*-Stadien mikroskopisch genau zu untersuchen.

3.11 RNA-Isolierung zur Transkriptionsanalyse

Um RNA zur Transkriptionsanalyse zu isolieren, ist es wichtig, dass die Plasmodium-Kultur eine Parasitämie von 5-10% hat und sich die Parasiten im Ringstadium befinden. Um eine effiziente Zelllyse zu gewährleisten, wurde das TRIzol™-Reagenz in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt, bevor das Protokoll begann.

Zunächst wurde die Ringsynchronisation wie in 3.7 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die suspendierte Plasmodium-Kultur in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Danach erfolgt eine erneute Zentrifugation unter denselben Bedingungen, wobei der Überstand wiederum verworfen wurde.

Dem resultierenden Zellpellet wurde anschließend die fünffache Pelletmenge an vorgewärmten (37°C) TRIzol™ hinzugegeben. Die Probe wurde für 10 Sekunden kräftig geschüttelt, um die Zelllyse zu erleichtern. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37°C wurde die Probe sofort bei -80°C eingefroren, um die RNA vor Degradation zu schützen.

3.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein Verfahren, um geringe Mengen DNA schnell und hochsensitiv nachzuweisen. Mit diesem Verfahren lässt sich das zu untersuchende *var*-Gen belegen. Die Verfahren wurde netterweise durch die BNITM Arbeitsgruppe Bachmann durchgeführt.

3.13 Panning-Verfahren

Das Panning-Verfahren dient der gezielten Anreicherung von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten, die spezifische bindungsassoziierte Gene exprimieren und eine selektive Adhäsion an CHO-Zellen zeigen. Zu Beginn wurde die *Plasmodium*-Kultur mikroskopisch überprüft, um sicherzustellen, dass die Parasitämie im Bereich von 1-5% lag und sich die Mehrheit der Parasiten im Trophozoitenstadium befand. Ebenso wurde der Zustand der CHO-Zellen kontrolliert, wobei eine Flächenbesiedlung von mindestens 70% erforderlich ist.

Anschließend wurde die *Plasmodium*-Kultur in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet mit 500 µl RPMI Medium und 2 ml einer 1% Gelatinelösung versetzt. Die Mischung wurde vorsichtig homogenisiert, wobei auf ein Vermeiden von Schaumbildung geachtet wurde. Danach wurde die Suspension für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um eine Anreicherung der K^+ Erythrozyten zu erreichen.

Im Anschluss wurden 1 ml der Überstandfraktion in ein neues Falconröhrchen überführt, ohne das Pellet zu stören, und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Aus dem resultierenden Pellet wurde ein Blutaussstrich angefertigt, um die Parasitenstadien und Parasitämie der angereicherten Fraktion zu überprüfen. Nach der *knob*-Anreicherung sollte die Parasitämie mindestens 50% betragen und überwiegend Trophozoiten enthalten.

Das Pellet wurde daraufhin in 5 ml Bindungsmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Parallel wurden die CHO-Zellen für den Bindungsschritt vorbereitet, indem ihr Medium ausgetauscht und die Zellen für 5 Minuten mit Bindungsmedium inkubiert wurden. Nach Entfernung des Mediums wurde das Parasitenpellet in 3 ml Bindungsmedium aufgenommen und vorsichtig auf die CHO-Zellen gegeben.

Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde, wobei das Kulturgefäß alle 15 Minuten in sechs verschiedene Richtungen sanft bewegt wurde, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen sicherzustellen. Nach Abschluss der Inkubation

wurde das Überstandsmedium entfernt, und die CHO-Zellen wurden drei- bis fünfmal mit Bindungsmedium gewaschen. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Kontrolle und Dokumentation der gebundenen iEs. Zum Schluss wurden 3 ml frisches Kulturmedium und 100 µl Blut hinzugefügt. Die Kultivierungsflasche wurde anschließend in die Plasmodium-Kulturbox eingesetzt, mit Gas versorgt und bis zum nächsten Tag inkubiert.

3.14 Ernte von Ringformen

Während der Isolierung von Ringformen, also frühen Entwicklungsstadien von *P. falciparum* in iEs, wurde die Kultursuspension zunächst in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet vorsichtig in 7 ml frischem Medium resuspendiert. Parallel dazu wurde ein neues Falcon-Röhrchen mit 7 ml Biocoll-Lösung vorbereitet, auf welche die Suspensionslösung der iEs langsam und vorsichtig aufgetragen wurde, sodass sich zwei klar getrennte Phasen bildeten.

Anschließend wurde das Röhrchen ohne Bremsen für 20 Minuten bei 2300 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das verbleibende Pellet erneut mit 7 ml Medium gewaschen, indem es weitere 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert wurde. Nach dem erneuten Entfernen des Überstandes wurden 400 µl Blut sowie 10 ml Medium hinzugegeben. Die so aufbereiteten Zellen wurden danach in eine Petrischale überführt und unter den üblichen Kulturbedingungen weiterkultiviert. Auf diese Weise wurde eine angereicherte Ringstadien-Kultur gewonnen, die sich für nachfolgende Analysen oder weiterführende Experimente eignete.

3.15 Bindungs-Assay

Die Vorbereitung für den zwei Tage später geplanten Binding-Assay begann mit einer sorgfältigen Kontrolle der *P. falciparum*-Kultur. Hierbei wurde die Parasitämie mithilfe eines Schmiertests bestimmt, wobei sichergestellt wurde, dass am Versuchstag ausschließlich Trophozoiten vorlagen. Parallel dazu erfolgte eine Überprüfung der CHO-Zellen, die mindestens eine Konfluenz von 90% aufweisen sollten.

Sobald beide Voraussetzungen erfüllt waren, begann die eigentliche Versuchsvorbereitung. Jedem Rezeptor wurde auf einer 24-well-Platte drei Wells zugeordnet. Anschließend wurden sterile Deckgläser mithilfe einer sterilen Pinzette in die Wells eingelegt. Die CHO-Zellen wurden aus dem Inkubator entnommen, das verbrauchte Medium aus den T25- bzw. T75-Flaschen abgesaugt und die Flaschen mit PBS gespült

(T25: 3 ml, T75: 5 ml). Nach dem Entfernen des PBS wurde Accutase hinzugegeben (T25: 500 µl, T75: 1500 µl) und die Zellen fünf Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Flaschen vorsichtig auf den Labortisch geklopft, um die Zelllösung zu lösen, und diese mikroskopisch überprüft. Danach wurden 5 ml Ham's F12-Medium zugegeben, die Zellen mehrfach resuspendiert und in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Die Suspension wurde bei 1200 rpm für vier Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das resultierende Zellpellet in 3 ml Ham's F12-Medium erneut aufgenommen und homogen verteilt.

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde ein Zellzählgerät mit passender Zählkammer (NanoEntek) verwendet, nach gründlichem resuspendieren wurden 10 µl der Suspension in die Zählkammer pipettiert, die anschließend in das Gerät eingesetzt wurde, um die Zellkonzentration zu ermitteln. Die Zellsuspension wurde auf die Zielkonzentration von Zellen/ml mit Ham's F12-Medium verdünnt und erneut homogenisiert. Daraufhin wurden 500 µl der Suspension pro Well pipettiert, wobei das Deckglas mithilfe der Pipettenspitze leicht nach unten gedrückt wurde, um Luftblasen zu vermeiden. Die vorbereitete Well-Platte wurden vorsichtig in mehrere Richtungen bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung sicherzustellen, und anschließend bei 37°C im Inkubator gelagert, damit die Zellen bis zum Binding-Assay optimal anwachsen konnten.

Am Versuchstag wurden zunächst die CHO-Zellen mikroskopisch überprüft, wobei mindestens 80% Konfluenz erreicht sein mussten. Danach wurde sichergestellt, dass alle für den Versuch benötigten Lösungen – einschließlich Bindungsmedium, 1% Glutaraldehyd-Lösung im Weiser-Puffer und Färbelösung – vorbereitet waren. Es folgte die *Knob*-Anreicherung der iEs. Aus 1 µl Pellet wurde ein Blutausschlag angefertigt und die Parasitämie bestimmt. Betrug diese bspw. 65%, wurde das Pellet in 2 ml Bindungsmedium resuspendiert.

Zur Zellzählung wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:100 hergestellt, und 10 µl der Suspension wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Nach der Auswertung von mindestens drei Quadranten wurde die Zellkonzentration berechnet, um daraus die gewünschte Arbeitskonzentration (z.B. iEs/ml) abzuleiten. Diese wurde durch geeignete Verdünnung mit Bindungsmedium eingestellt.

Die CHO-Zellen in den Wells wurden anschließend für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ akklimatisiert, indem 500 µl Bindungsmedium pro Well zugegeben wurden. Nach dem Entfernen des Mediums wurden jeweils 500 µl der berechneten iE-Suspension in die Wells pipettiert. Um eine gleichmäßige Bindung zu fördern, wurde die 24-well-

Platte alle 15 Minuten leicht geschwenkt; die Inkubation erfolgte insgesamt über 60 Minuten bei 37°C.

Für die Waschroutine wurden zwei Becher mit Bindungsmedium bereitgestellt. Die Deckgläser wurden mithilfe einer Pinzette aus den Wells entnommen und jeweils dreimal in jedem Becher gespült. Überschüssiges Medium wurde vorsichtig auf Papiertuch abgetupft. Anschließend wurden die Gläser mit der Zellseite nach unten in eine schräg fixierte 24-Well-Platte eingelegt, um während einer 30-minütigen Inkubation bei etwa 45° lose gebundene iEs abzulösen.

Zur Fixierung wurden die Deckgläser in eine neue Platte überführt, die jeweils 500 µl einer 1% Glutaraldehyd-Lösung enthielt. Die Fixierung erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Für die anschließende Färbung wurden die Gläser in eine weitere Platte mit 300 µl 10% Giemsa-Lösung gelegt, erneut bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mehrfach in destilliertem Wasser gewaschen und sorgfältig getrocknet.

Zum Abschluss wurden pro Objektträger drei Deckgläser mit jeweils einem Tropfen CV-Mount (Leica) aufgebracht und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten fixiert. Die fertigen Präparate wurden über Nacht vollständig getrocknet und waren anschließend bereit für die mikroskopische Auswertung.

3.16 Bindungs-Assay unter Flussbedingungen

Für den Bindungs-Assay unter Flussbedingungen wurden zunächst zwei Tage vor dem geplanten Versuch CHO-Zellen in 200 µl Ham's F12-Wachstumsmedium suspendiert. Anschließend wurden 200 µl dieser Zellsuspension in die Flusskammer (ibi Treat µ-Slide I 0.8 Luer) pipettiert und die Zellen bei 37°C im Inkubator kultiviert.

Einen Tag vor dem Bindungs-Assay unter Flussbedingungen wurde das vorhandene Medium in der Flusskammer durch frisches Ham's F12-Wachstumsmedium ersetzt. Dazu wurden die CHO-Zellen vorsichtig aus dem Inkubator entnommen, das verbrauchte Medium vollständig entfernt und jeweils 200 µl vorgewärmtes frisches Medium zugegeben. Anschließend wurde die Flusskammer erneut im Inkubator bei 37°C gelagert, bis der Assay durchgeführt wurde.

Am Tag des Assays erfolgten Vorbereitung und Durchführung nach einem standardisierten Ablauf. Zur Kalibrierung wurden 12 ml Bindungsmedium in beide Behälter der Fluidikeinheit injiziert. Es sollte beachtet werden, dass der Flüssigkeitsstand auf beiden Seiten gleich hoch war. Um Luftblasen in den Schläuchen zu entfernen, die das

Experiment beeinträchtigen könnten, wurde das Programm „*remove air bubbles*“ für 5 Minuten ausgeführt. Dabei wurde alle Luftblasen entfernt und die CHO-Zellen erneut gewaschen. Die Parasiten mussten eine Parasitämie von mindestens 5% aufweisen und sich im Trophozoitenstadium befinden. Die Parasiten wurden durch die Gelatine-*knob*-Anreicherung angereichert, um sicherzustellen, dass das Experiment ausschließlich mit Trophozoiten durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Parasiten 1:100 verdünnt und mittels der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Zusätzliche wurde nach der *knob*-Anreicherung eine Giemsa-Färbung durchgeführt. Schließlich wurde die Lösung so vorbereitet, dass eine Konzentration von 1×10^7 iEs/ml erreicht wurde. Im nächsten Schritt wurde das System mit der Flusskammer und dem Mikroskop aufgebaut, welches zum Filmen des Experimentes genutzt wurde. Die Haube, unter der das Experiment stattfand, wurde auf 37°C gestellt. Der Objektträger mit den CHO-Zellen wurde so platziert, dass unter dem Mikroskop (EVOS FL Auto) eine zusammenhängende Fläche sichtbar war. Nachdem alles eingerichtet wurde, wurden die Parasiten in den Behälter der Fluidikeinheit überführt. Das Mikroskop machte alle 3 Sekunden ein Bild, und das Programm der Pumpsteuerungssoftware wurde gleichzeitig gestartet. Der allgemeine Versuchsaufbau des Bindungs-Assays unter Flussbedingungen ist in der folgenden Abbildung 7 dargestellt.

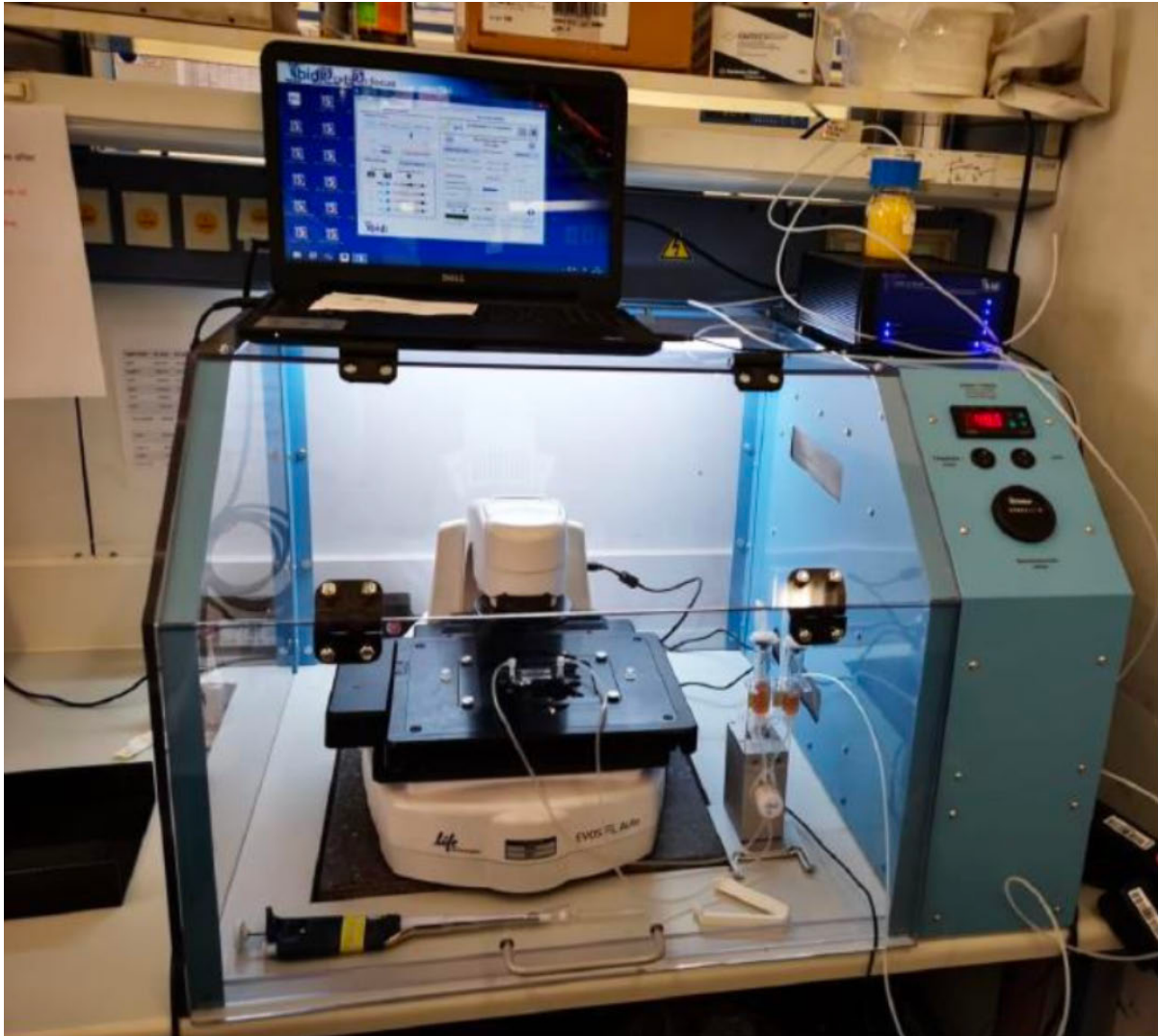


Abbildung 7 Allgemeiner Versuchsaufbau des Bindungs-Assays unter Flussbedingungen

Das Mikroskop wurde in einer Haube platziert, die die Temperatur gemäß den experimentellen Anforderungen verändern konnte. Die Fluidikeinheit befand sich in der Haube, um eine konstante Temperatur von 37°C zu gewährleisten. Die Pumpe war oben rechts und der Laptop mit der Pumpsteuerungssoftware oben links positioniert [71].

In diesem Aufbau wirkt der durch den Fluss erzeugte Scherkraft auf die Zellen im Flusssystem. Die Flussrate ist direkt proportional zum Scherkraft, gemessen in dyn/cm^2 ($1 \text{ dyn/cm}^2 \triangleq 0,1 \text{ Pa}$). Die unterschiedlichen Scherkraftraten wurden mit der Pumpsteuerungssoftware von Ibidi programmiert und sind in der Tabelle 7 zu sehen.

Tabelle 7 Parameter für den Bindungs-Assay unter Flussbedingungen

Scherkraft (dyn/cm ²)	Zeit (min)
5	10
4	10
3	10
1,5	10
0,9	10
1,5	10
3,0	10
4,0	10
5,0	10
6,0	10
7,0	10
8,0	10
8,5	10

Das Experiment wurde für das var46-Gen dreimal durchgeführt, um möglichst präzise Ergebnisse zu erzielen. Die Bewegung und Adhäsion der iEs an die von den CHO-Zellen exprimierten interessierenden Rezeptoren wurde mit der R-Software „trackdem“ verfolgt.

3.17 Trypsin-Assay

Der Trypsinassay zur Analyse proteolytischer Aktivitäten an SLI-Transfektanten wurde gemäß folgendem standardisiertem Protokoll durchgeführt: Zunächst wurden 10 ml Kulturflüssigkeit mit 20- bis 30 Stunden alten Trophozoiten in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei RT für 5 Minuten mit 2000 U/min zentrifugiert. Das Überstandmedium wurde auf 500 µl reduziert, das Zellpellet jeweils zweimal mit 10 ml PBS (pH 7,4, ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen und in maximal 500 µl PBS resuspendiert.

Zur Anreicherung der Trophozoiten wurde ein Percoll-Gradient mit den Konzentrationen 80%, 60% und 40% sorgfältig in einem 2-ml-Eppendorf-Röhrchen geschichtet. Das Zellpellet wurde behutsam auf den Gradienten aufgetragen und das Ganze für 5 Minuten bei höchster Zentrifugalkraft und RT zentrifugiert. Anschließend wurde die Trophozoiten-Fraktion in kreisförmiger Bewegung mit einer 1000-µl-Pipette

aufgenommen und in ein neues Röhrchen transferiert, wobei darauf Acht gegeben wurde, dass keine nicht-iEs oder Ringformen mitgenommen wurden.

Das Pellet wurde danach zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und jeweils 5 Minuten bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Zur Trypsin-Verdauung wurde das Pellet in zwei Fraktionen aufgeteilt: Eine Kontrollprobe mit nur PBS und eine Probe, der Trypsin in einer Konzentration von 125 µg/ml (entsprechend der Pelletgröße 50-100µl) zugegeben wurde. Beide Proben wurden bei 37°C für 30-45 Minuten inkubiert.

Die Verdauung wurde durch Zugabe des Soybean Trypsin Inhibitors (STI, 1 mg/ml; 1:50 verdünnt) gestoppt, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation auf Eis. Nach einer weiteren Waschung mit PBS folgte die Zugabe eines Proteaseinhibitor-Cocktails (einschließlich STI, PMSF 100 mM, und einem *protease inhibitor cocktail (PIC)* in Abhängigkeit vom Volumen des Lysispuffers. Nach kurzzeitiger Inkubation auf Eis wurden die Proben mit Lysepuffer versetzt, gemischt und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

Dieses Vorgehen gewährleistet eine selektive Isolation der Trophozoiten, eine kontrollierte proteolytische Behandlung mit Trypsin sowie das zuverlässige Stoppen der Proteolyse durch spezifische Inhibitoren, wodurch die Reproduzierbarkeit und Validität der Ergebnisse sichergestellt wurden. Alle Schritte wurden unter Berücksichtigung der Zellintegrität und optimalen physiologischen Bedingungen durchgeführt.

Aus zeitlichen Gründen wurde das Trypsin-Assay freundlicherweise von S. Ofori (BTA) aus dem BNITM durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 PCR-Verfahren

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren, mit dem bestimmte DNA-Abschnitte gezielt und effizient vervielfältigt werden können. Das Verfahren beruht darauf, dass spezifische Primer an die Zielsequenz binden und dadurch eine massenhafte Kopie dieses Abschnitts ermöglicht wird. Der Ablauf gliedert sich grob in drei Schritte: Zunächst wird die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen getrennt (Denaturierung). Anschließend lagern sich die Primer während der sogenannten *Annealing*-Phase an die Einzelstränge an. Schließlich verlängert die DNA-Polymerase die neuen Stränge (*Extension*). Dieser Dreischritt wiederholt sich in mehreren Zyklen, wodurch die Zahl der Zielsequenz exponentiell zunimmt. Die PCR wurde netterweise von der Arbeitsgruppe Bachmann im BNITM durchgeführt. Das resultierende Ergebnis lässt sich aus der Abbildung 8 entnehmen [72] [73].

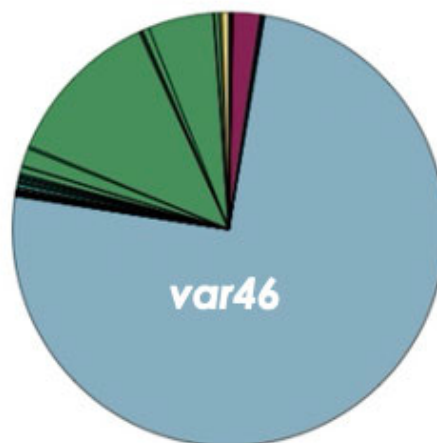


Abbildung 8 Ergebnis der PCR zum Transfektant var46 P4

Wie in der Abbildung 8 wird an dem Kreisdiagramm ersichtlich, dass die Variante var46 fast ausschließlich in der untersuchten Probe vorhanden ist und daher nachgewiesen wurde. Der hohe Anteil von var46 belegt die erfolgreiche Amplifikation und hohe Spezifität der verwendeten PCR-Methode für diesen Genabschnitt, während andere Varianten nur in sehr geringem Umfang oder gar nicht vertreten sind. Damit belegt das Ergebnis das Vorliegen von var46.

4.2 Panning-Verfahren

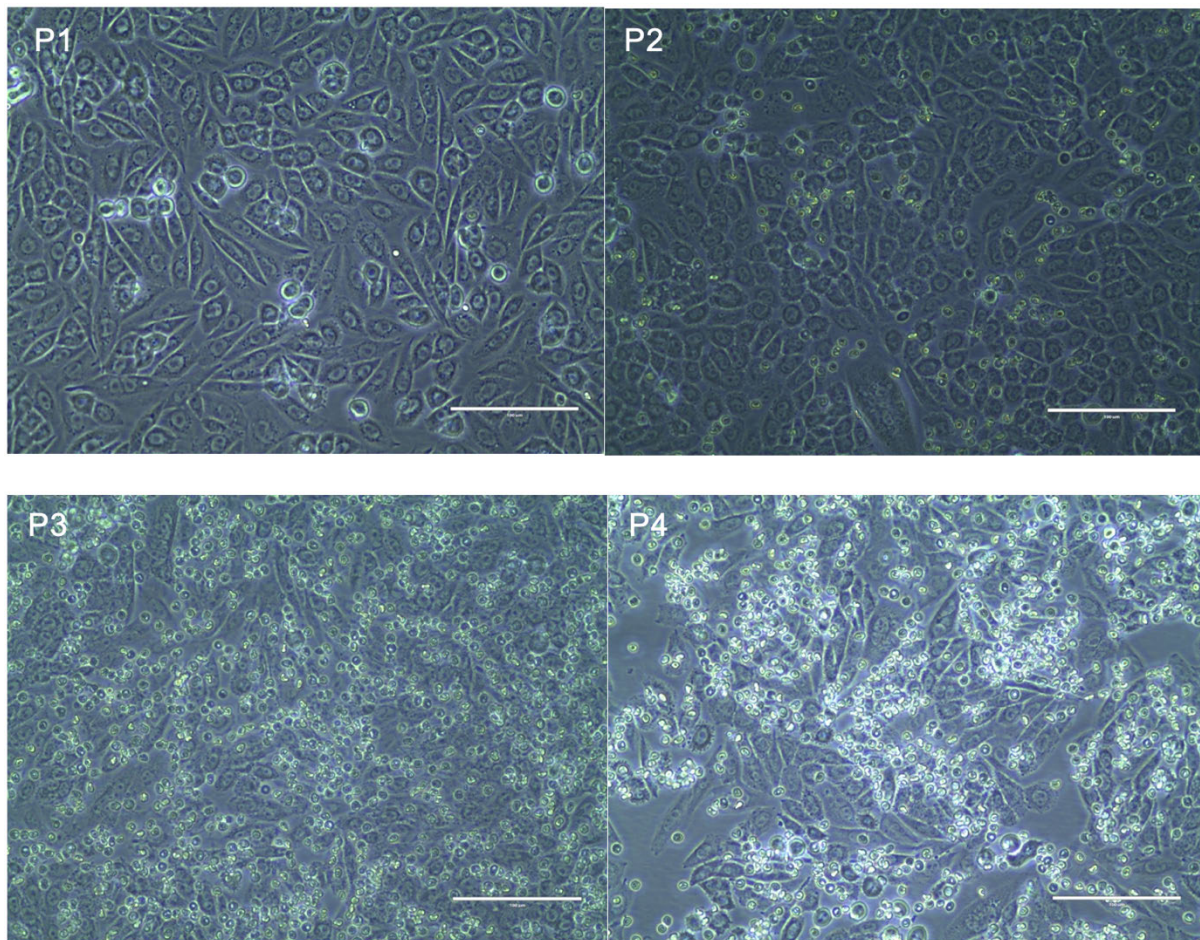


Abbildung 9 Morphologie von IT4 var46-transfizierten Zellen nach bis zu viermaliger Passage über den CD36-CHO-Rezeptor

Gezeigt sind repräsentative Bilder der Zellkultur nach jeweils einer (P1), zwei (P2), drei (P3) und vier (P4) Selektionsrunden. Die charakteristische Anreicherung und Modifizierung der Zellmorphologie ist nach mehrfacher Bindung an CD36 deutlich erkennbar.

Im Rahmen des durchgeführten Panning-Verfahrens wurde das Ziel verfolgt, *P. falciparum*-iEs, die das Oberflächenprotein var46 exprimieren, gezielt auf CHO-Zellen, die den Endothelrezeptor CD36 exprimieren. Die Methode bestand darin, die Parasiten-subpopulation mit hoher Bindungsaffinität Schritt für Schritt anzureichern. Zu Beginn wurde die Qualität der *Plasmodium*-Kultur kontrolliert, um sicherzustellen, dass sich die Parasiten im Trophozoitenstadium befand und die Parasitämie bei mind. 5% lag. Parallel wurde auch die CHO-Zellschicht überprüft, wobei eine Flächenbesiedlung von mindestens 80% erforderlich war.

In den einzelnen Schritten wurden die iEs isoliert, in geeignetem Medium resuspendiert, inkubiert und anschließend auf die vorbereiteten CHO-Zellen übertragen. Während der Inkubationsphasen wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen

geachtet. Nach jeder Panning-Runde wurden ungebundene Zellen entfernt und die Bindungseffizienz durch mikroskopische Untersuchung bewertet.

Die resultierenden Bilder (siehe Abbildung 9) liefern einen Überblick über die Entwicklung des Bindungsverhaltens: Im ersten Panel (P1) sind kaum gebundene iEs auf der CHO-Zellkultur zu sehen. Dies stellt die Ausgangssituation ohne erfolgte Selektion dar. Im zweiten Panel (P2) sind zwar schon einige adhärenente Zellen zu sehen, aber die Zellschicht bleibt noch konfluent und die Bindung noch gering. Im dritten Panel (P3) ist die Anzahl der gebundenen iEs deutlich höher, was auf eine erfolgreiche und spezifische Anreicherung hinweist. Im vierten Panel (P4) ist die CHO-Zellschicht von zahlreichen iEs bedeckt, was eine hohe Bindungskapazität beweist.

4.3 Bindungs-Assay

Das var46 P4-*PfEMP1*-Protein wurde mithilfe von Bindungs-Assays daraufhin untersucht, an welche CHO-Zellrezeptoren es spezifisch bindet. Dafür kamen transgene CHO-745-Zellen zum Einsatz, die den jeweiligen CHO-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren und anschließend auf Deckgläsern in 24-*well*-Platten ausgesät wurden. Nach einer zweitägigen Kulturzeit waren die Zellen konfluent. Anschließend wurden angereicherte iEs zu den Zellen gegeben und gemeinsam inkubiert.

Vor jedem Assay erfolgte eine Anreicherung der Parasitenpopulation durch ein *knob-enrichment*, um gezielt Parasiten auszuwählen, die charakteristische *knobs* auf ihrer Oberfläche tragen und somit auch das relevante *PfEMP1*-Protein präsentieren. In der Regel lag die Parasitämie nach dem *knob-Enrichment* zwischen 40 und 60%. Im Anschluss an die Inkubation wurden nichtgebundene Erythrozyten gründlich abgewaschen, wodurch nur die fest gebundenen iEs auf den CHO-Zellen verblieben. Es erfolgte darauf eine Fixierung und Färbung der Zellen zur mikroskopischen Auswertung. Für jeden untersuchten Rezeptor wurden in jedem einzelnen Experiment drei technische Replikate angefertigt. Von jedem dieser Replikate wurden zehn Bilder gemacht, sodass pro Rezeptor und Experiment insgesamt 30 Bildfelder analysiert wurden. Um drei biologische Replikate zu erhalten, wurde das gesamte Experiment für jeden Rezeptor unabhängig dreimal durchgeführt. Die Beispielbilder der jeweiligen Bindungs-Assays mit den unterschiedlichen Rezeptoren sind in Abbildung 10 und Abbildung 11 zu sehen. Mit dieser Methode wird sichergestellt, dass die erhobenen Daten eine hohe Zuverlässigkeit und Aussagekraft besitzen.

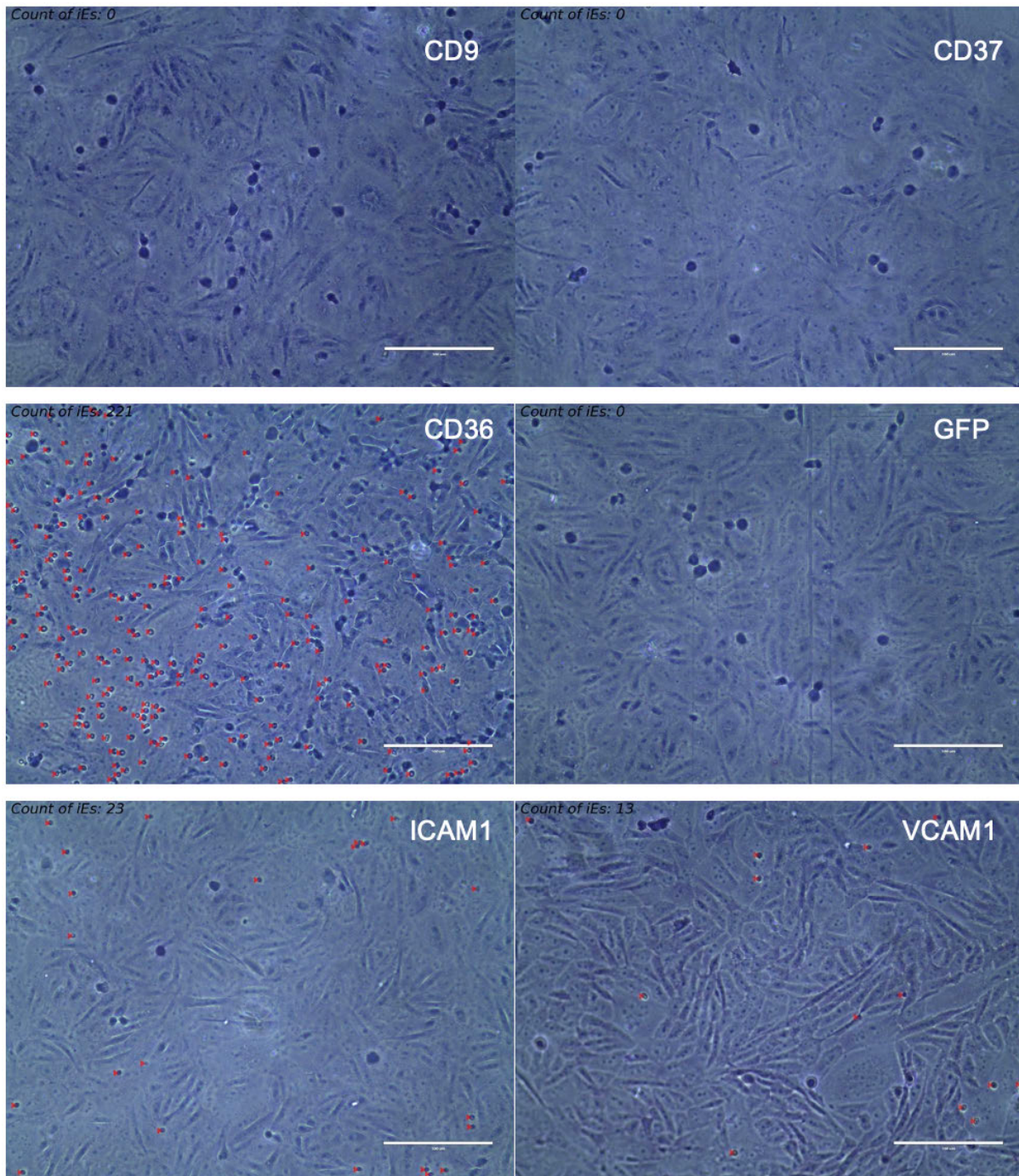


Abbildung 10 Repräsentative Mikroskopieaufnahmen von Bindungs-Assays mit var46 an CHO-Zellen, welche unterschiedliche Oberflächenrezeptoren exprimieren.

Deutlich erkennbar ist die starke Bindung von iEs (rote Punkte) an CD36 im Vergleich zu den anderen getesteten Rezeptoren CD9, CD37, ICAM-1, VCAM-1 und der negativen Kontrolle GFP. Die Anzahl gebundener Parasiten ist jeweils in der linken oberen Bildecke angegeben.

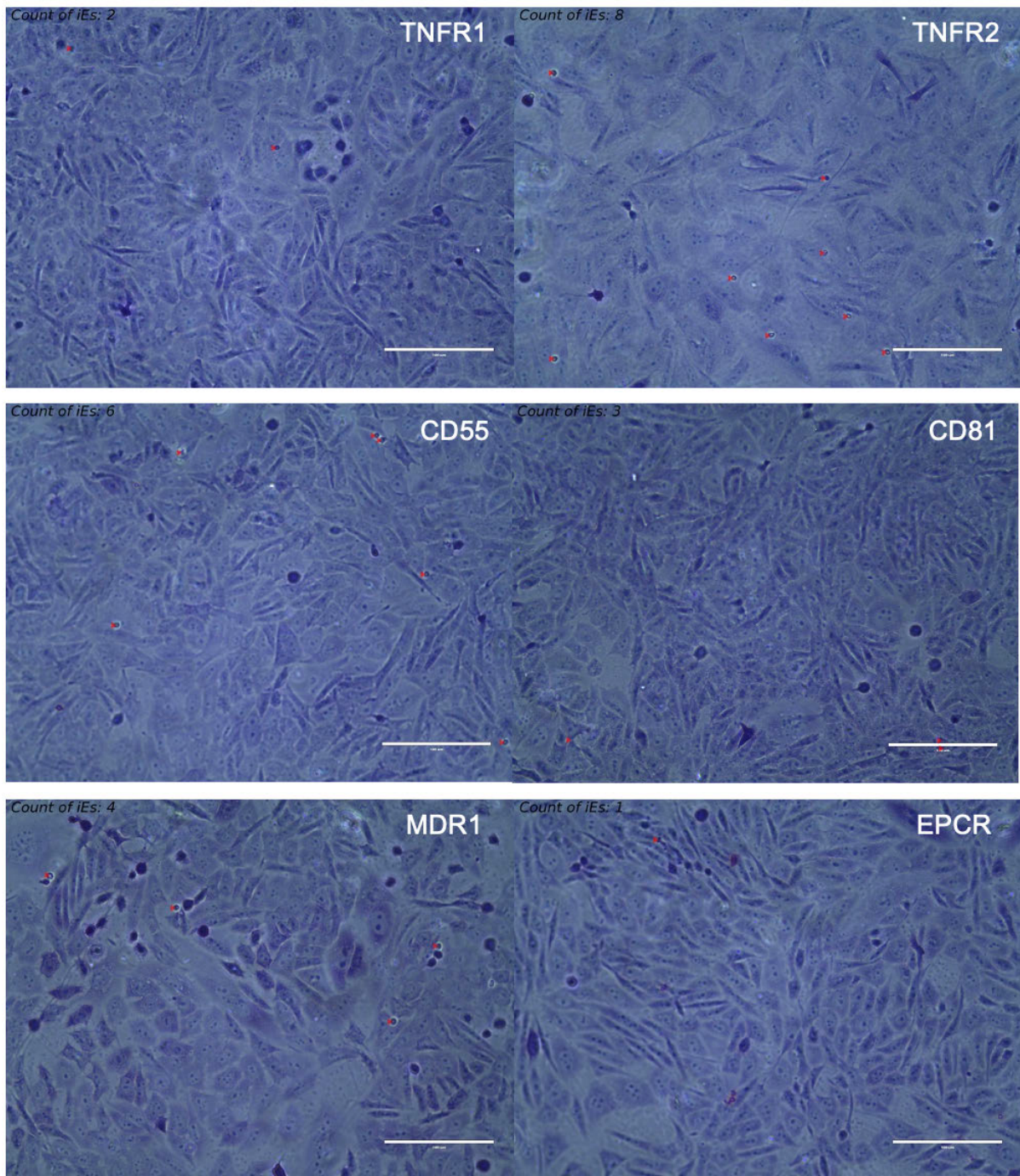


Abbildung 11 Repräsentative Mikroskopieaufnahmen von Bindungs-Assays mit var46 an CHO-Zellen, die verschiedene Oberflächenrezeptoren exprimieren.

In dieser Abbildung sind die Interaktionen mit TNFR1, TNFR2, CD55, CD81, MDR1 und EPCR dargestellt. Die Bindung von iEs (rote Punkte) bleibt im Vergleich zu anderen Rezeptoren gering; die Anzahl gebundener Zellen ist jeweils oben links im Bild angegeben.

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

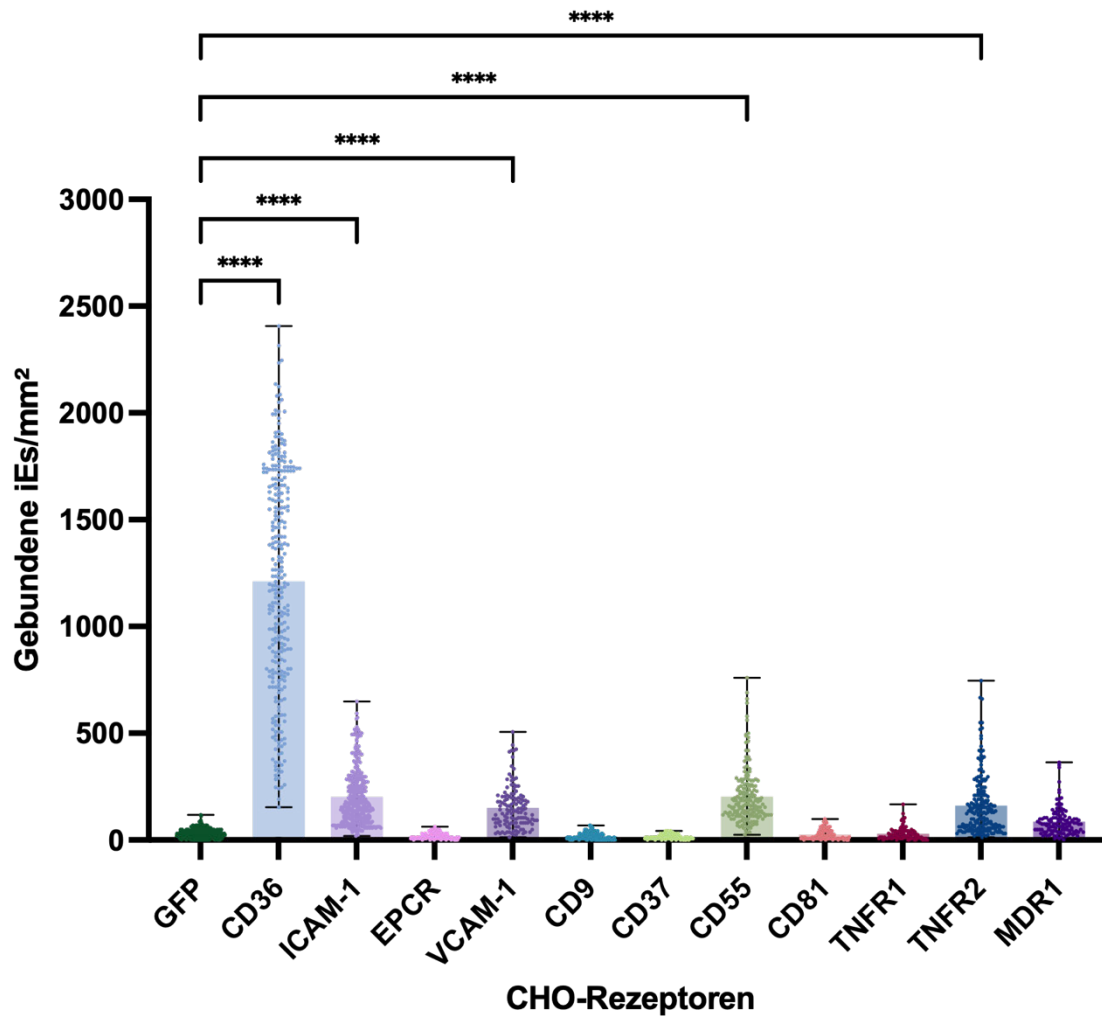


Abbildung 12 Vergleich der Bindung von var46-iEs an verschiedene CHO-Zellrezeptoren.

Die Grafik zeigt die Anzahl der gebundenen iEs pro Quadratmillimeter (iEs/mm²) für die Rezeptoren CD81, CD9, EPCR, CD37, ICAM-1, VCAM-1, CD36, CD55, TNFR2, MDR1, TNFR1 sowie die Negativkontrolle GFP. Die Vielzahl an Einzelwerten je Gruppe ermöglicht die Darstellung der Verteilung. Besonders auffällig ist die drastisch erhöhte Bindung an CD36, während ICAM-1, VCAM-1, CD55 und TNFR2 ebenfalls einen signifikanten, auch wenn niedrigen, Anstieg im Vergleich zur Kontrolle zeigen. Alle anderen getesteten Rezeptoren sowie GFP-Kontrolle weisen hingegen keine relevante Bindung auf. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine *one-way* ANOVA im Vergleich zur Negativkontrolle. (**** = $p < 0,0001$) werden im oberen Bereich der Grafik markiert und unterstreichen die spezifische Rezeptorpräferenz von var46-iEs für CD36 sowie weitere Adhäsionsmoleküle.

Die Versuche zeigen, dass das var46 P4-Protein eine deutlich höhere Bindungsaffinität für einzelne Rezeptoren besitzt. CD36 hebt sich mit 1211 (± 511) iEs/mm² im direkten Vergleich durch eine stark erhöhte Zahl gebundener iEs pro Quadratmillimeter (iEs/mm²) hervor. Zusätzlich zu CD36 wurden auch die signifikanten Bindungspartner ICAM-1 (200(± 127) iEs/mm²), VCAM-1 (151(± 100) iEs/mm²), CD55 (203(± 129) iEs/mm²) und TNFR2 (116(± 131) iEs/mm²) identifiziert. Die Messdaten lagen deutlich über dem Kontrollwert GFP (31 (± 21) iEs/mm²), was durch die statistische Analyse mit *one-way* ANOVA belegt wurde.

Die Bindung für CD36 ist mit einer mittleren Differenz von 1180 gebundenen iEs/mm² und einem P-Wert von <0,0001 hochsignifikant. Auch die Werte von ICAM-1, V-CAM-1, CD55 und TNFR2 sind mit P-Werten unter 0,0001 zu beachten, was ihre biologische Relevanz beweist. Die restlichen Rezeptoren, darunter CD81 (25 (+/-24) iEs/mm²), CD9 (19 (+/-17) iEs/mm²), EPCR (17(+/-14) iEs/mm²), CD37 (27 (+/-22) iEs/mm²), MDR1 (86 (+/-66) iEs/mm²) und TNFR1 (29 (+/-28) iEs/mm²), zeigten keine signifikant erhöhten Bindungswerte im Vergleich zur negativen Kontrolle.

4.4 Bindungs-Assay unter Flussbedingungen

Bei der Zytoadhäsion lagern sich Erythrozyten, die von *P. falciparum* infiziert sind, an die Endothelzellen von Blutgefäßen in unterschiedlichen Organen wie dem Gehirn, der Plazenta oder der Lunge an [74]. Dieser Vorgang ist eine wesentliche Ursache für die Entwicklung schwerer Malariaformen. In dieser Arbeit kann dieser Prozess mithilfe von CHO-Zellen untersucht werden, die spezifische humane Adhäsionsrezeptoren exprimieren [75].

In den vorherigen Versuchen wurde das Bindungsverhältnis unter statischen Bedingungen untersucht, welches jedoch nicht die realen Blutflussverhältnisse im Körper abbildet, da hierbei die Blutzirkulation fehlt. In der vorliegenden Untersuchung wurden daher die Bindungseigenschaften der iEs an dem CHO-Rezeptor CD36 unter simulierten Flussbedingungen geprüft, um die Situation im lebenden Organismus besser darzustellen.

Die Parasiten wurden unter definierten Scherkräften über genetisch modifizierte CHO-Zellen geführt. Ziel der Assays war es zu prüfen, ob der Transfektant ein vergleichbares Bindungsverhalten an die CHO-Rezeptoren zeigt, wie in den statischen Bindungsassays oder ob sich unter Flussbedingungen Unterschiede im Adhäsionsverhalten ergeben.

Vor den Experimenten wurden die Parasiten so aufgereinigt, dass nur jene mit den charakteristischen *knobs* getestet wurden. Bei den Versuchen kamen jeweils 10 Millionen Parasiten zum Einsatz. Die angewandten Scherkräfte, die von 0,9 bis 8,5 dyn/cm² variierten, wurden entsprechend den physiologischen Verhältnissen im menschlichen Blutstrom gewählt.

Das Mikroskop richtete sich auf Zellbereiche mit hoher Dichte, und mithilfe von spezieller Software wurde jede einzelne Zelle in kurzen Intervallen verfolgt, um Bewegungsmuster zu analysieren.

Zur Negativkontrolle wurden CHO-Zellen ohne Rezeptorexpression (CHO-GFP) eingesetzt. Es wurde festgestellt, dass die iEs keine nennenswerte Bindung an die Kontrollzentren aufwiesen, selbst wenn die Scherkräfte variierten.

Die Ergebnisse verbessern das Verständnis darüber, wie *P. falciparum* iEs unter nahezu realistischen Bedingungen mit menschlichen Endothelzellen interagieren könnten, was entscheidende Einblicke in den Malariakrankheitsmechanismus ermöglicht.

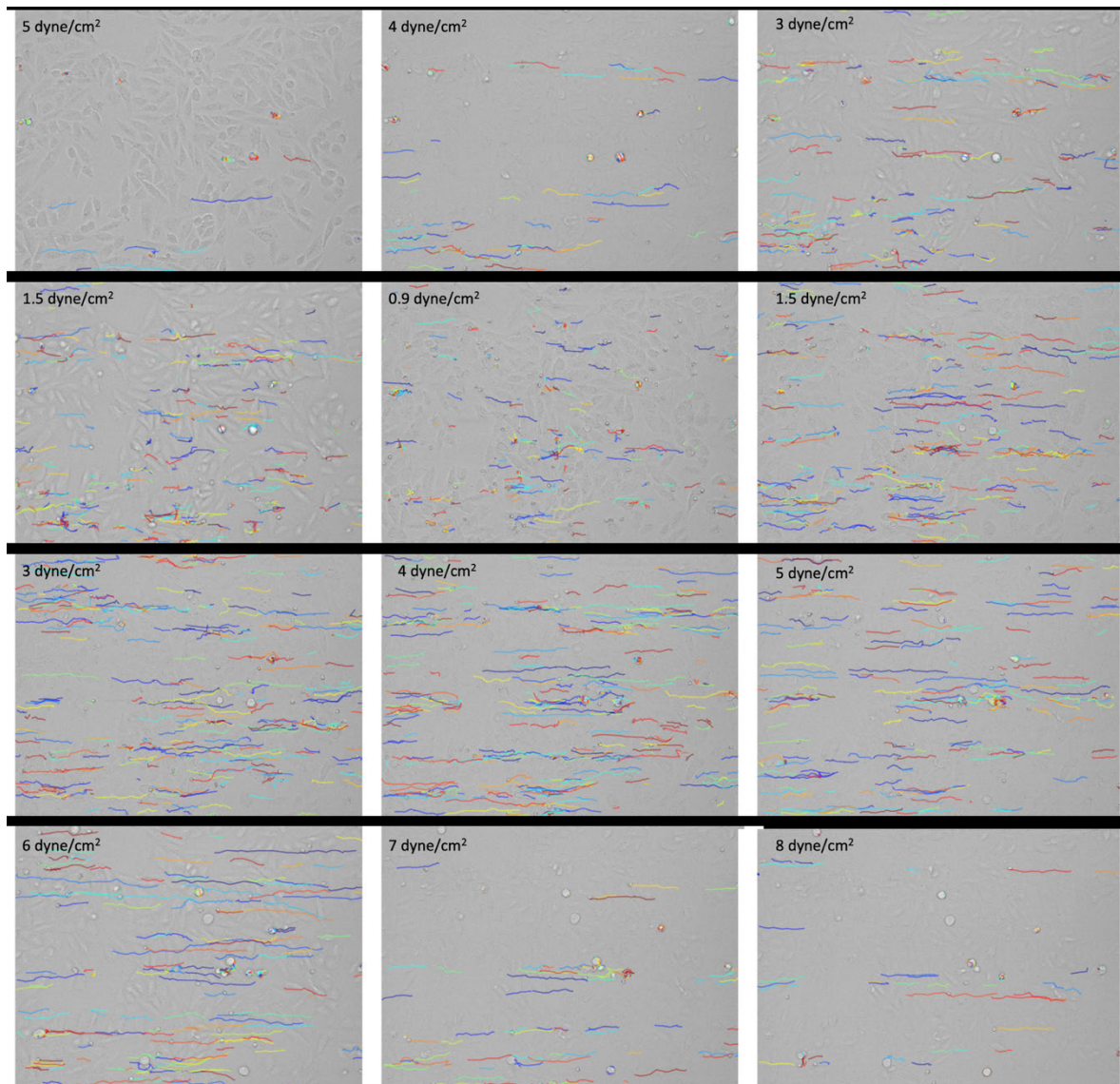


Abbildung 13 Bindungs-Assay unter Flussbedingungen mit dem var46 P4 über den CHO-Zellen-Rezeptor CD36

Die iEs wurden mit unterschiedlichen Schubspannungswerten (0,9, 1,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 und 8,5 dyn/cm²) für je 10 Minuten über CHO-CD36-Zellen lang gepumpt. Durch diesen Vorgang sollte untersucht werden, ob eine Bindung nachweisbar ist. Die Bewegungsbahnen wurden mit der R-Software trackdem verfolgt. Die Schwellenwertsetzung erfolgt bei 0,1 und der Pixelbereich bei 30-500, um iEs nachzuweisen. Mit dem EVOS FL Auto-Mikroskop wurde alle 3 Sekunden ein Bild aufgenommen.

In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass der CHO-Rezeptor CD36 im durchgeführten Assay eine rollende Bindung aufweist. Die stärkste Bindung wurde bei 0,9 dyn/cm² mit 310 iEs/mm² beobachtet. Bei 1,5 dyn/cm² banden 234 und 286 iEs/mm², bei 3 dyn/cm² banden 136 und 290 iEs/mm², bei 4 dyn/cm² banden 60 und 266 iEs/mm², bei 5 dyn/cm² banden 21 und 189 iEs/mm², bei 6 dyn/cm² banden 124 iEs/mm², bei 7 dyn/cm² banden 72 iEs/mm², bei 8 dyn/cm² banden 71 iEs/mm² und bei 8,5 dyn/cm² 39 iEs/mm². Es zeigt sich, dass die Anzahl gebundener iEs/mm² mit zunehmender Scherkraft abnimmt.

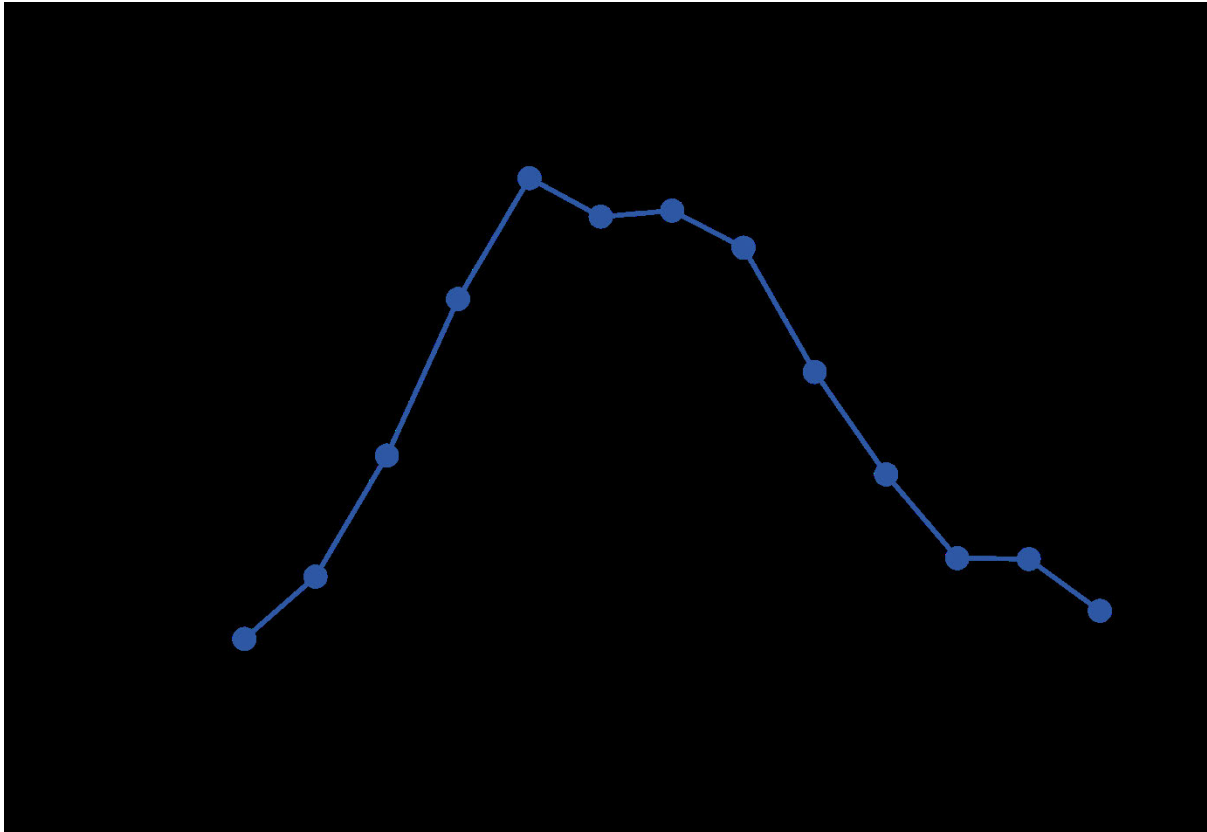


Abbildung 14 Nachverfolgung von an CHO-CD36-Zellen gebundenen iEs.

Alle 10 Minuten wurden die gebundenen iEs/mm² an CHO-CD36 bei unterschiedlichen Scherkräften (0,9, 1,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 8,5 dyn/cm²) ausgezählt. Die Abbildung stellt den Mittelwert aller Daten dar.

Die Eigenschaften der rollenden Bindung werden in Abbildung 15 und 16 genauer analysiert. In der Abbildung 15 wird die mittlere Kontaktdistanz (µm) der iEs bei verschiedenen Scherkräften (0,9, 1,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 und 8,5 dyn/cm²) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei 0,9 dyn/cm² die iEs mit 28 (+/- 16) µm die kürzeste Kontaktdistanz zu den CHO-Rezeptoren aufgewiesen wurde. Bei einer Scherkraft von 1,5 dyn/cm² erhöhte sich die Kontaktdistanz auf 34 (+/- 21) µm und 38 (+/- 25) µm. Bei 3 dyn/cm² bewegte sich die iEs weiter auf 39 (+/- 26) µm und 44 (+/- 28) µm, bei 4 dyn/cm² betrug die Kontaktdistanz 41 (+/- 28) µm und 52 (+/- 33) µm, bei 5 dyn/cm² 50 (+/- 33) µm, bei 6 dyn/cm² 54 (+/- 39) µm, bei 7 dyn/cm² 45 (+/- 30) µm, bei 8 dyn/cm² 48 (+/- 32) µm und bei 8,5 dyn/cm² 44 (+/- 32) µm. Es lässt sich feststellen, dass mit zunehmender Scherkraft auch die Kontaktdistanz der iEs bis 6 dyn/cm² zunimmt. Ab 6 dyn/cm² nimmt mit zunehmender Scherkraft die Kontaktdistanz ab, wobei das Programm zunehmend Schwierigkeiten hat, die iEs ab 5 dyn/cm² zu verfolgen.

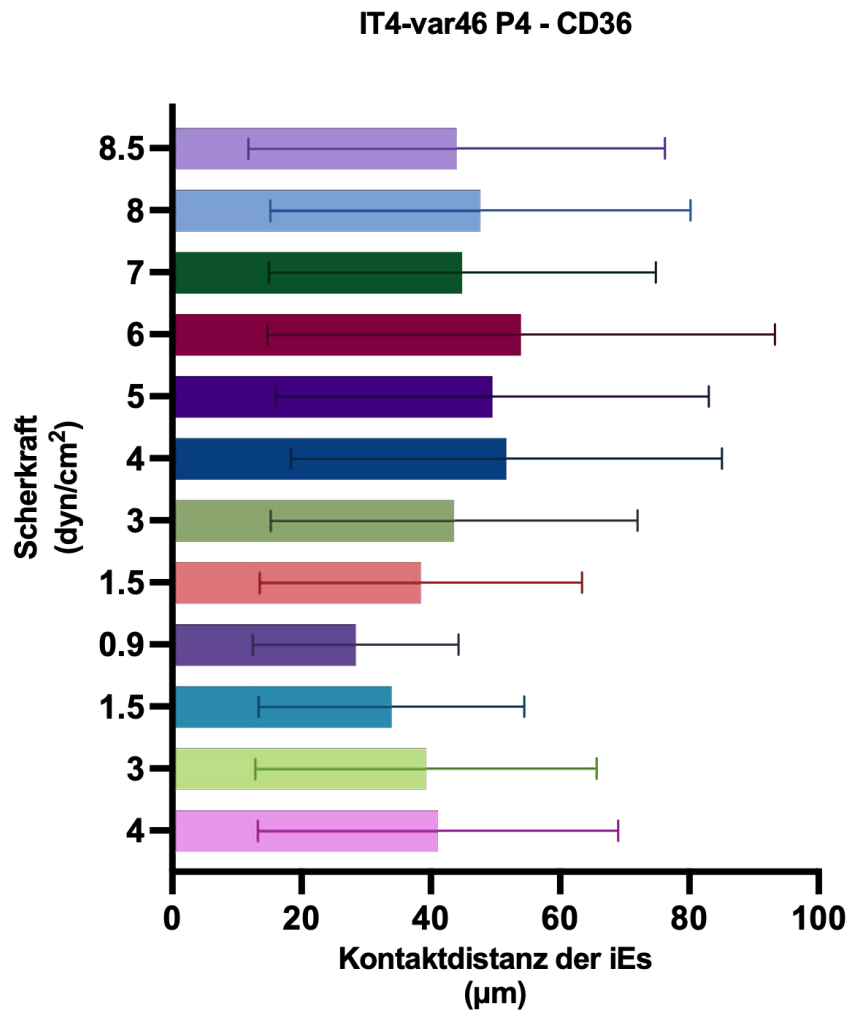


Abbildung 15 Durchschnittliche Kontaktdistanz (μm) von IT4 var46 P4 über CD36 bei unterschiedlichen Scherkräften

Es wird die durchschnittliche Kontaktdistanz (μm) der iEs bei unterschiedlichen Scherkräften (0,9, 1,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 und 8,5 dyn/cm²) dargestellt. Die Kontaktdistanz ist die mittlere Strecke, die iEs an den Rezeptoren der CHO-Zellen gebunden und dort entlang gewandert sind, während die von der Software trackdem verfolgt wurden. Die Linie weist den Durchschnitt der Kontaktdistanz der iEs auf.

Die Abbildung 16 zeigt die mittlere Geschwindigkeit (μm/min) der über CHO-CD36 rollenden iEs bei unterschiedlichen Scherkräften (0,9, 1,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 und 8,5 dyn/cm²). Bei 0,9 dyn/cm² lag die Geschwindigkeit der iEs bei 33 (+/-18) μm/min; bei 1,5 dyn/cm² erhöhte sie sich auf 39 (+/-24) μm/min und 41 (+/-25) μm/min, bei 3,0 dyn/cm² auf 51 (+/-29) μm/min und 53 (+/-31) μm/min, bei 4,0 dyn/cm² auf 60 (+/-34) μm/min, bei 5,0 dyn/cm² auf 56 (+/-32) μm/min, bei 6,0 dyn/cm² auf 59 (+/-34) μm/min, bei 7,0 dyn/cm² auf 52 (+/-34) μm/min, bei 8,0 dyn/cm² auf 52 (+/-29) μm/min und 8,5 dyn/cm² auf 60 (+/-40) μm/min. Die maximal erreichte Geschwindigkeit von 60 μm/min wurde bei Scherkräften von etwa 4,0, 6,0 und 8,5 dyn/cm² beobachtet.

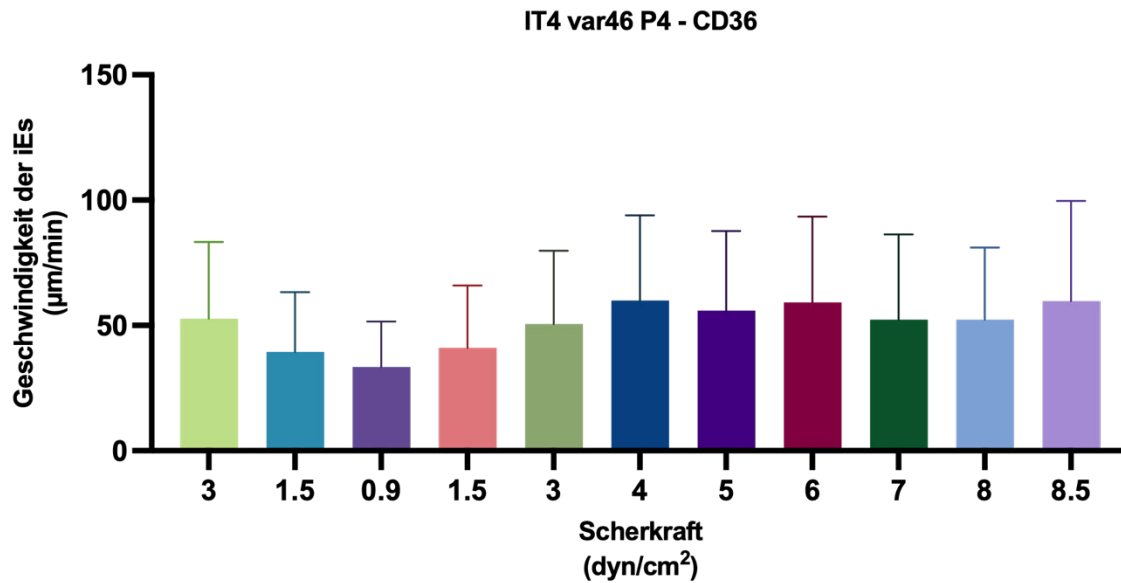


Abbildung 16 Durchschnittliche Geschwindigkeit der iEs (µm/min) von IT4 var46 P4 über CHO-CD36 bei unterschiedlichen Scherkräften

Es wird die mittlere Geschwindigkeit (µm/min) der iEs über CD36-CHO-Rezeptor bei unterschiedlichen Scherkräften (0,9, 1,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 und 8,5 dyn/cm²) dargestellt.

4.5 Western-Blot nach Trypsin Assay

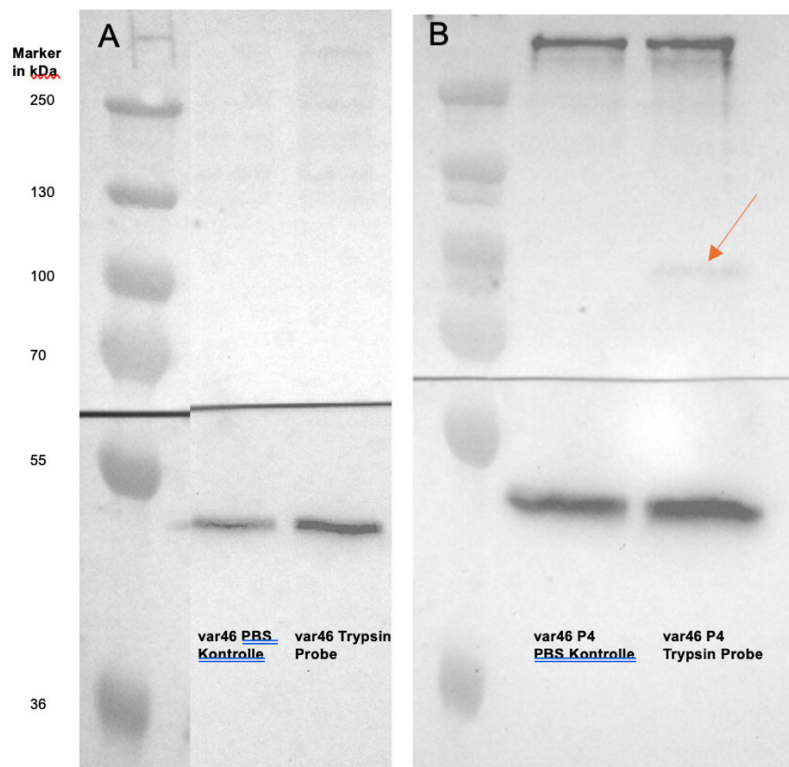


Abbildung 17 Western Blot zur Analyse von var46- (A) und var46 P4- (B) PfEMP1 auf der Zelloberfläche nach Trypsin-Behandlung im Vergleich zur Kontrollprobe

Das Western-Blot-Ergebnis für var46 (A) und var46 P4 (B) nach Trypsinbehandlung wurde aufgrund von mangelnder Zeit freundlicherweise von S.Ofori (BTA) des BNITM

bereitgestellt. In der Abbildung 17 werden in den Panel A und B Proben nach einer PBS-Behandlung als Kontrolle sowie nach einer Trypsinbehandlung dargestellt. Im Panel A ließ sich an der Erythrozytenoberfläche kein var46-Protein nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigt var46 P4 im Panel B eine Bande bei etwa 100 kDa, die auf die Präsenz des Transfektanten und damit auf die Expression des var46-Proteins hinweist.

5. Diskussion

5.1 Panning-Verfahren

Wie die Ergebnisse des durchgeführten Panning-Verfahrens belegen, wurde durch die selektive Anreicherung von *P. falciparum*-iEs, die das var46-Oberflächenprotein exprimieren, eine kontinuierlich steigende Bindung an CD36-positive CHO-Zellen erzielt. Die Analyse unter dem Mikroskop zeigt einen eindeutigen Verlauf: In den frühen Panning-Schritten (P1 und 2) waren nur wenige Adhäsionen zu verzeichnen, doch die Anzahl der gebundenen iEs verringerte sich mit jeder weiteren Selektion deutlich (P3 und 4). In der letzten Panning-Runde sind die iEs deutlich an den CHO-Zellen gebunden, was den Erfolg des Panning-Verfahrens belegt.

Das Ergebnis beweist, dass das angewandte selektive Verfahren in der Lage ist, spezifisch bindende Parasitenpopulationen aus einer heterogenen Gesamtfraktion herauszufiltern und zu konzentrieren. Die hohe Adhäsion an CD36 hebt die funktionelle Rolle des var46-Gens bei der Zellbindung hervor und lässt vermuten, dass der Selektionsprozess zu einer populationsspezifischen Expression von bindungsassoziierten Genen führt. Die Grundlage wird gelegt, um die angereicherte Fraktion weiter funktionell und molekular zu charakterisieren und ihre Rolle im Pathomechanismus der *Malaria tropica* zu untersuchen.

Selektive Anreicherungsverfahren sind entscheidend, um spezifische Parasitenvarianten zu untersuchen. Eine Einschränkung besteht jedoch darin, dass die Ausbeute und Spezifität des Panning stark von den Oberflächenstrukturen und Bindungsbedingungen abhängt, die man verwendet. Dennoch wurde im Laufe dieser Abschlussarbeit erfolgreich bewiesen, dass das systematische Panning über CD36 eine hilfreiche Methode ist, um spezifisch adhärente *P. falciparum*-Populationen zu isolieren, deren detaillierte Analyse wertvolle Hinweise auf die Adhäsionsmechanismen des Parasiten geben kann.

5.2 Bindungs-Assay

Die Ergebnisse der Bindungs-Assays mit dem von var46 P4 exprimierten PfEMP1 bieten wichtige neue Einsichten in die Parasiten-Wirt-Interaktion, insbesondere was die Rezeptorbindung auf CHO-Zellen betrifft. Besonders hervorzuheben ist die stark ausgeprägte und signifikante Bindung von var46 an den Rezeptor CD36. Dieses Erkenntnis ist im Einklang mit der bekannten biologischen Rolle von CD36 als

Scavenger-Rezeptor, der stark vertreten ist und eine Schlüsselrolle in der Zelladhäsion, Lipidaufnahme und Immunregulation spielt [76].

Die CD36 hat eine besondere Bedeutung in pathologischen Prozessen, besonders im Zusammenhang mit Malaria, weil die Bindung von parasitären Erythrozyten an CD36 zur Gefäßverstopfung und zu milden Komplikationen führen kann. Die starke Bindung von var46 P4 an CD36 hebt dessen mögliche Rolle als Hauptrezeptor für die Zytoadhäsion von *P. falciparum* -iEs hervor. Die Daten belegen, dass die Bindung von var46 P4 an CD36 sowohl quantitativ als auch statistisch signifikant ist, da die Anzahl der gebundenen Zellen den Kontrollwert (GFP) um ein Vielfaches übertrifft [67] [77].

Außerdem wurde durch die Versuche nachgewiesen, dass die Rezeptoren ICAM-1, VCAM-1, CD55 und TNFR2 eine Bindung zu var46 P4 aufweisen. Die bekannten Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sind wichtig für das Immunzell-Recruitment und die Entzündungsreaktion. Die Bindung von var46 P4 an diese Moleküle könnte einen Betrag zur Gefäßverstopfung und zum immunologischen Ausweichverhalten des Parasiten leisten [78] [74]. CD55, ein wichtiger Regulator des Komplementsystems, wird ebenfalls in die Pathogenese von Malaria einbezogen und könnte durch die Bindung von var46 den Immunschutz beeinflussen [79]. TNFR2, als Rezeptor für Tumornekrosefaktor, ist ebenfalls an Immunprozessen beteiligt und dessen Bindung durch var46 könnte die lokale Immunantwort modulieren [80].

Jedoch sollten die signifikanten Bindungen von var46 P4 auf ICAM-1, VCAM-1, CD55- und TNFR2 durch zusätzliche Experimente weiter bestätigt werden. Aufgrund einer teilweise ungleichmäßigen Aussaat der CHO-Zellen in der 24-Well-Platte mussten auf den Replikaten in begrenzten Bereichen die zehn Bilder je Replikat angefertigt werden. In diesen Bereichen zeigte sich eine auffällig hohe Bindungsdichte, die jedoch nicht als repräsentativ für das Gesamtergebnis gewertet werden kann, sondern vielmehr eine mögliche Ausnahme darstellt. Zudem weisen die Werte eine zu hohe Streuung auf. Es ist also erforderlich, die beobachtete Signifikanz in weiteren unabhängigen Versuchen zu bestätigen.

Die übrigen untersuchten Rezeptoren, darunter CD81, CD9, EPCR, CD37, MDR1 und TNFR1, zeigten keine signifikant erhöhte Bindung und sind demnach weniger relevant für die Interaktion mit var46 unter den getesteten Bedingungen. Diese Ergebnisse

verdeutlichen, dass die Zytoadhäsion und die damit verbundenen pathophysiologischen Effekte sehr gezielt und rezeptorspezifisch stattfinden.

5.3 Bindungs-Assay unter Flussbedingungen

Unter Flussbedingungen konnte für var46 P4 eine rollende Bindung über CD36 nachgewiesen werden. Die Bindung der iEs unter verschiedenen Scherkräften zeigte, dass das Maximum der gebundenen iEs/mm² bei 0,9 dyn/cm² lag und mit zunehmender Scherkraft abnahm. Die Bindung war bei 0,9 dyn/cm² am stärksten und nahm mit steigender Scherkraft kontinuierlich ab. Ein deutlicher Rückgang der gebundenen iEs/mm² wurde bereits bei 1,5 dyn/cm² beobachtet, was mit früheren Studien übereinstimmt, die eine Scherstress-abhängige Reduktion der CD36-Bindung beschreiben [81].

Auch die Kontaktdistanz der iEs wurde gemessen und zeigte, dass die von den iEs zurückgelegte Strecke bei 0,9 dyn/cm² am geringsten war. Bei höheren Scherkräften, wie 4 dyn/cm², legten die iEs größere Strecken zurück, was darauf hindeutet, dass sie bei diesen Bedingungen länger an CD36 gebunden bleiben konnten. Die Geschwindigkeit nahm dabei stetig zu. Sie war bei 0,9 dyn/cm² am niedrigsten und bei 4 dyn/cm² am höchsten, was auch bei den Scherkräften 6 und 8,5 dyn/cm² erneut gemessen werden konnte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass einige iEs in der Lage sind, auch bei höheren Scherkräften zu binden und sich über größere Distanzen zu bewegen, was mit der Hypothese übereinstimmt, dass die Bindungsdynamik von CD36 unter physiologischen Bedingungen stark von der Scherkraft abhängt [81].

In den Abbildungen 15 und 16 sind die Werte der Doppelbestimmungen der Scherkräfte 1,5, 3,0 und 4,0 durch unterschiedliche Kontaktdistanzen und Geschwindigkeiten gekennzeichnet. Die Unterschiede erklären sich also dadurch, dass die Bewegung der Parasiten aufgrund des Mikroskops nicht zuverlässig erfasst werden konnte; es wurde nur alle drei Sekunden ein Bild aufgenommen und sie bewegten sich in dieser Zeit zu schnell für eine mikroskopische Nachverfolgung.

Typischerweise wird eine Scherkraft unter 1 dyn/cm² in Venen beobachtet, während höhere Werte in Arteriolen vorkommen. Die rollende Bindung an CD36 unter Flussbedingungen ähnelt somit eher den Strömungsverhältnissen in Arteriolen, während eine stabile statische Bindung eher in arteriellen Gefäßen vorkommt [82] [83].

Weil die iEs auf CD36 weiterrollen konnten und keine statische Bindung eingingen, um die Milzpassage zu vermeiden, werden sie vermutlich in der Milz eliminiert und verursachen daher keine schwere Malaria. Diese Beobachtung wird durch Studien gestützt, die zeigen, dass eine statische Bindung an Rezeptoren wie ICAM-1 eher mit schwerer Malaria assoziiert ist, während die rollende Bindung an CD36 mit einer milderen Verlaufsform korreliert [84] [38] [85].

Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Scherkräfte für die Bindungsdynamik und den Verlauf der Malaria und zeigen, dass die spezifische Interaktion zwischen *PfEMP1* und CD36 unter physiologischen Bedingungen entscheidend für die Pathogenese ist [83].

5.4 Nachweismethoden mittels PCR und Trypsin-Assay

Das Vorliegen des *var46*-Gens wurde zunächst mittels PCR bestätigt, womit die aktive Expression dieses spezifischen *var*-Gens im untersuchten Parasitenstamm nachgewiesen wurde. Anschließend wurden durch wiederholtes Panning auf CD36-exprimierenden CHO-Zellen gezielt Parasiten angereichert, die das entsprechende *var46*-kodierte *PfEMP1* an der Oberfläche präsentieren und damit eine CD36-abhängige Adhäsion aufweisen, wie sie für viele *PfEMP1*-Varianten beschrieben ist. Durch diese selektive Anreicherung wird eine Population erhalten, in der die *var46*-Expression und das dazugehörige Bindungsprofil gegenüber CD36 dominieren [86] [87].

Im anschließenden Trypsin-Assay wurden die iEs mit Trypsin behandelt, um oberflächenständige Proteine proteolytisch zu spalten und so zu prüfen, ob das vom *var46*-Gen kodierte *PfEMP1* weiterhin auf der Zelloberfläche nachweisbar ist und in welchem Maß es trypsinempfindlich ist. Trypsin wird in ähnlichen Studien eingesetzt, um die Zugänglichkeit und Membranverankerung von *PfEMP1*-Domänen sowie deren Interaktion mit Rezeptoren wie CD36 zu charakterisieren. Die Ergebnisse des Assays zeigten, dass das *var46*-kodierte Protein trotz Trypsinbehandlung noch detektiert werden konnte, was auf eine Trypsinresistenz der vom Antikörper erkannten Domäne hinweist. Dies führt dazu, dass die Anwesenheit von *var46-PfEMP1* auf der Oberfläche von Erythrozyten nach der Selektion über CD36-CHO-Zellen sowohl genetisch als auch funktionell belegt wird. [86] [88] [87].

5.5 Schlussbemerkung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine umfassende Charakterisierung der Bindungsfähigkeit von IT4-SLI var46 gegenüber verschiedenen CHO-Rezeptoren durchgeführt, wobei jeweils nur eine *PfEMP1*-Variante in der gesamten Parasitenpopulation exprimiert wurde. Um die Bindungseigenschaften zu untersuchen, wurde zunächst var46 vier Mal (var46 P4) ein Panning durchgeführt, da es nicht angereicherte Bindungsverhältnisse aufgewiesen hatte. Ab dem vierten Panning, welches über CD36 angereichert wurde, wurde eine hohe Bindungsaffinität zu CD36 aufgezeigt. Mithilfe des statischen Bindungs-Assay, wurde gezeigt, dass var46 P4 zu CD36 eine signifikante Bindung hat. Weitere Rezeptoren, die eine Bindung mit var46 hatten, waren ICAM-1, VCAM-1, CD55 und TNFR2. Diese weiteren signifikanten Bindungen sollten durch Versuche wiederholt werden, um diese erneut zu bestätigen. Sollten weitere Versuche die Signifikanz belegen, wäre der nächste Schritt diese unter Flussbedingungen durchzuführen und deren Bindungsfähigkeit unter Flussbedingungen zu charakterisieren. Des Weiteren wäre es auch von Vorteil die Bindungsfähigkeit zukünftig auf Endothelzellen durchzuführen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] B. Singh et al. (2004) „A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings“ [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(04\)15836-4/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(04)15836-4/abstract).
- [2] J. M. Carlton et al. (2008) „Comparative evolutionary genomics of human malaria parasites“ [https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(08\)00234-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492208002341%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(08)00234-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492208002341%3Fshowall%3Dtrue).
- [3] M. Kotepui et al. (2020) „Plasmodium spp. mixed infection leading to severe malaria: a systematic review and meta-analysis“ <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7338391/>.
- [4] S. Antinori et al. (2013) „Plasmodium knowlesi: The emerging zoonotic malaria parasite“ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X12003440?via%3Dihub>.
- [5] Tropeninstitut.de (2025) „Wo gibt es Malaria?“ <https://tropeninstitut.de/malaria/wo-gibt-es-malaria->.
- [6] World Health Organization (2024) „World malaria report 2024“ <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2024>.
- [7] P. Gething et al. (2024) „Predicting the Impact of Climate Change on Malaria“ <https://www.bcg.com/publications/2024/predicting-impact-climate-change-on-malaria>.
- [8] T. Siebenbrodt (2025) „Malaria im Fokus: Fortschritte sichern – Rückschritte vermeiden“ <https://www.dsw.org/malaria-im-fokus-fortschritte-sichern-rueckschritte-vermeiden/#:~:text=Ein%20aktuelles%20Beispiel%3A%20In%20Ostafrika%20waren%20im%20Jahr%202024%20über%20637.000%20Menschen%20von%20Überschwemmungen%20betroffen%2C%20die%20zu%20einer%20v>.
- [9] O. Ebhuoma et al. (2022) „Socio-economic status as predictors of malaria transmission in KwaZulu-Natal, South Africa. A retrospective study“ <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9652696/>.
- [10] Our World in Data (2025) „Malaria deaths by world region“ <https://ourworldindata.org/grapher/malaria-deaths-by-region?time=2000..latest>.
- [11] N. J. White et al. (2014) „Malaria“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23953767/>.
- [12] A. F. Cowman et al. (2016) „Malaria: Biology and Disease“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27768886/>.

- [13] Alamy (2025) „The life cycle of MALARIA parasite. Vector diagram for educational, science, and biological use“ <https://www.alamy.com/the-life-cycle-of-malaria-parasite-vector-diagram-for-educational-science-and-biological-use-image388506070.html?imageid=4D196EB0-D69F-433D-BBBB-2EC1BC2D79AA&pn=1&searchId=5ecd477d51fa91ee806ae404ab8a4fda&searchtype=0>.
- [14] B. Schwöbel (2004) „Plasmodium falciparum: Resistenzbestimmung durch molekulare Resistenzmarker sowie in vivo Sensitivitätstests“ https://edoc.ub.uni-muenchen.de/1808/1/Schwoebel_Babett.pdf.
- [15] M. Treeck (2009) „Transport und Funktion adhäsiver Proteine des Malariaerregers Plasmodium falciparum (Welch, 1897)“ https://ediss.sub.uni-hamburg.de/bitstream/ediss/2466/1/Dissertation_Moritz_Treeck.pdf.
- [16] I. Rupp (2009) „Die Gametogenese des humanpathogenen Malariaerregers Plasmodium falciparum - eine Charakterisierung von daran beteiligten Proteasen sowie die Beschreibung und Funktionsanalyse von dabei auftretenden interzellulären Gametenfilamenten“ https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/4528/file/Dissertation_IRupp.pdf.
- [17] M. J. Boyle et al. (2010) „Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development“ <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1009198107>.
- [18] V. Soulard et al. (2015) „Plasmodium falciparum full life cycle and Plasmodium ovale liver stages in humanized mice“ <https://www.nature.com/articles/ncomms8690>.
- [19] P. S. Gomes et al. (2016) „Immune Escape Strategies of Malaria Parasites“ <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.01617/full>.
- [20] G. Dhangadamajhi et al. (2010) „The survival strategies of malaria parasite in the red blood cell and host cell polymorphisms“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22332025/>.
- [21] R. E. Martin und K. Kirk (2006) „Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite Plasmodium falciparum“ <https://ashpublications.org/blood/article/109/5/2217/23202/Transport-of-the-essential-nutrient-isoleucine-in>.
- [22] S. K. Prajapati und O. P. Singh (2013) „Remodeling of human red cells infected with Plasmodium falciparum and the impact of PHIST proteins“ <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1079979613001496?via%3Dihub>.

- [23] N. A. Counihan et al. (2021) „How Malaria Parasites Acquire Nutrients From Their Host“
<https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.649184/full>.
- [24] G. Bouyer et al. (2020) „Plasmodium falciparum sexual parasites regulate infected erythrocyte permeability“ <https://www.nature.com/articles/s42003-020-01454-7>.
- [25] P. A. Tamez et al. (2008) „An Erythrocyte Vesicle Protein Exported by the Malaria Parasite Promotes Tubovesicular Lipid Import from the Host Cell Surface“
<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371%2Fjournal.ppat.1000118>.
- [26] C. Spycher et al. (2008) „The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes“
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2008.06235.x>.
- [27] H. Wickert und G. Krohne (2007) „The complex morphology of Maurer's clefts: from discovery to three-dimensional reconstructions“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17888738/>.
- [28] H. C. van der Heyde et al. (2006) „A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction“
[https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(06\)00235-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492206002352%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(06)00235-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492206002352%3Fshowall%3Dtrue).
- [29] J. A. Rowe et al. (2009) „Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications“
<https://www.cambridge.org/core/journals/expert-reviews-in-molecular-medicine/article/adhesion-of-plasmodium-falciparum-infected-erythrocytes-to-human-cells-molecular-mechanisms-and-therapeutic-implications/D852227DA2C65CBF13226877170D7570>.
- [30] T. Herricks et al. (2012) „Estimating physical splenic filtration of Plasmodium falciparum-infected red blood cells in malaria patients“ <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cmi.12007>.
- [31] I. Safeukui et al. (2008) „Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen“
<https://ashpublications.org/blood/article/112/6/2520/24917/Retention-of-Plasmodium-falciparum-ring-infected>.
- [32] M. Bernabeu und J. D. Smith (2017) „EPCR and Malaria Severity: The Center of a Perfect Storm“ [https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(16\)30198-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492216301982%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(16)30198-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492216301982%3Fshowall%3Dtrue).

- [33] L. O. Mosnier und T. Lavstsen (2016) „The role of EPCR in the pathogenesis of severe malaria“
[https://www.thrombosisresearch.com/article/S0049-3848\(16\)30364-4/abstract](https://www.thrombosisresearch.com/article/S0049-3848(16)30364-4/abstract).
- [34] S. Omer et al. (2021) „Impact of placental malaria on maternal, placental and fetal cord responses and its role in pregnancy outcomes in women from Blue Nile State, Sudan“
<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-021-03580-x>.
- [35] W. B. Kidima (2015) „Syncytiotrophoblast Functions and Fetal Growth Restriction during Placental Malaria: Updates and Implication for Future Interventions“
<https://doi.org/10.1155/2015/451735>.
- [36] B. Maubert et al. (2001) „<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3024.2000.00292.x>“
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00292.x>.
- [37] A. K. Zakama et al. (2020) „Placental Malaria“ <https://link.springer.com/article/10.1007/s40475-020-00213-2>.
- [38] A. Bachmann et al. (2022) „CD36—A Host Receptor Necessary for Malaria Parasites to Establish and Maintain Infection“ doi: 10.3390/microorganisms10122356.
- [39] M. Dörpinghaus et al. (2020) „Stringent Selection of Knobby Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes during Cytoadhesion at Febrile Temperature“
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8020174>.
- [40] Y. D. Sharma (1991) „Knobs, knob proteins and cytoadherence in falciparum malaria“
[https://doi.org/10.1016/0020-711X\(91\)90061-Q](https://doi.org/10.1016/0020-711X(91)90061-Q).
- [41] M. F. Wiser (2023) „Knobs, Adhesion, and Severe Falciparum Malaria“
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070353>.
- [42] L. Hviid und A. T. Jensen (2015) „Chapter Two - PfEMP1 – A Parasite Protein Family of Key Importance in Plasmodium falciparum Malaria Immunity and Pathogenesis“
<https://www.sciencedirect.com/science/chapter/bookseries/abs/pii/S0065308X15000135?via%3Dihub>.
- [43] A. R. Jensen et al. (2019) „Cerebral Plasmodium falciparum malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it“
<https://doi.org/10.1111/imr.12807>.
- [44] M. Rug et al. (2006) „The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of P falciparum-infected human erythrocytes“
<https://ashpublications.org/blood/article/108/1/370/133550/The-role-of-KAHRP-domains-in-knob-formation-and>.

- [45] C. Spycher et al. (2006) „Genesis of and Trafficking to the Maurer's Clefts of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes“ <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1128/MCB.00095-06>.
- [46] A. S. Julien Guizetti (2013) „Silence, activate, poise and switch! Mechanisms of antigenic variation in Plasmodium falciparum“ <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cmi.12115>.
- [47] H. A. Akihito Sakoguchi (2022) „Mechanisms for Host Immune Evasion Mediated by Plasmodium falciparum-Infected Erythrocyte Surface Antigens“ <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.901864/full>.
- [48] Thomas D. Otto et al. (2019) „Evolutionary analysis of the most polymorphic gene family in falciparum malaria“ <https://wellcomeopenresearch.org/articles/4-193/v1>.
- [49] Christoph S. Janssen et al. (2004) „Plasmodium interspersed repeats: the major multigene superfamily of malaria parasites“ <https://doi.org/10.1093/nar/gkh907>.
- [50] Nahla Galal Metwally et al. (2017) „Characterisation of Plasmodium falciparum populations selected on the human endothelial receptors P-selectin, E-selectin, CD9 and CD151“ <https://www.nature.com/articles/s41598-017-04241-3>.
- [51] Thomas S. Rask et al. (2010) „Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Diversity in Seven Genomes – Divide and Conquer“ <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1000933>.
- [52] Susan M Kraemer et al. (2007) „Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in Plasmodium falciparum: comparisons of geographically diverse isolates“ <https://bmcmgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-8-45>.
- [53] Sue A. Kyes et al. (2007) „Antigenic Variation in Plasmodium falciparum: Gene Organization and Regulation of the var Multigene Family“ <https://doi.org/10.1128/ec.00173-07>.
- [54] M. del Pilar Quintana et al. (2019) „Comprehensive analysis of Fc-mediated IgM binding to the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family in three parasite clones“ <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6465264/>.
- [55] V. S. Peche et al. (2023) „Endothelial cell CD36 regulates membrane ceramide formation, exosome fatty acid transfer and circulating fatty acid levels“ <https://www.nature.com/articles/s41467-023-39752-3>.
- [56] A. R. Berendt et al. (1992) „The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1370656/>.

- [57] H. Lazareth et al. (2019) „The tetraspanin CD9 controls migration and proliferation of parietal epithelial cells and glomerular disease progression“ <https://www.nature.com/articles/s41467-019-11013-2>.
- [58] C. M. de Winde et al. (2018) „C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)-dependent dendritic cell migration is controlled by tetraspanin CD37“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30185523/>.
- [59] B. Shakya et al. (2021) „Erythrocyte CD55 mediates the internalization of Plasmodium falciparum parasites“ <https://doi.org/10.7554/eLife.61516> .
- [60] L. Shen et al. (2017) „Up-regulation of CD81 inhibits cytotrophoblast invasion and mediates maternal endothelial cell dysfunction in preeclampsia“ <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1617601114>.
- [61] H. Ji et al. (2014) „TNFR1 mediates TNF- α -induced tumour lymphangiogenesis and metastasis by modulating VEGF-C-VEGFR3 signalling“ <https://www.nature.com/articles/ncomms5944>.
- [62] S. Naserian et al.(2020) „The TNF/TNFR2 signaling pathway is a key regulatory factor in endothelial progenitor cell immunosuppressive effect“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32546175/>.
- [63] C. Gray et al. (2003) „ICAM-1 can play a major role in mediating P. falciparum adhesion to endothelium under flow“ <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016685103000756>.
- [64] G.-T. Ho et al. (2018) „MDR1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes intestinal inflammation“ MDR1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes intestinal inflammation.
- [65] U. R. Pendurthi et al. (2018) „Endothelial cell protein C receptor-dependent signaling“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29461258/>.
- [66] A. Scherf et al. (2008) „Antigenic variation in Plasmodium falciparum“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18785843/>.
- [67] J. D. Smith et al. (2013) „Malaria's deadly grip: cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23957661/>.
- [68] T. S. Rask et al. (2010) „Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes-divide and conquer“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20862303/>.
- [69] J. Brehmer (2021) „Analyse der Bindungseigenschaften zwischen P. falciparum infizierten Erythrozyten und verschiedenen Endothelrezeptoren“ <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/bitstream/ediss/9708/2/Dissertation.pdf>.

- [70] J. B. Jensen und W. Trager (1977) „Plasmodium Falciparum in Culture: Establishment of Additional Strains“ <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.743>.
- [71] D. Danicic-Rauchberger (2024) „Analysis of the binding phenotype of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to endothelial receptors using transgenic parasites“
- [72] Redaktion Gesundheitsportal (2023) „Laborbefund: Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)“ <https://www.gesundheit.gv.at/labor/laborbefund/polymerase-ketten-reaktion.html>.
- [73] M. Reindl (2021) „PCR-Test“ <https://www.netdoktor.de/krankheiten/covid-19/pcr-test/>.
- [74] G. C. Alister et al. (2012) „Cytoadherence and Severe Malaria“ <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3431742/>.
- [75] S. C. Wassmer et al. (2015) „Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach“ <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0841>.
- [76] R. L. Silverstein und M. Febbraio (2010) „CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior“ doi: 10.1126/scisignal.272re3.
- [77] F.-L. Hsieh et al. (2016) „The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite“ <https://www.nature.com/articles/ncomms12837>.
- [78] L. Turner et al. (2013) „Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23739325/>.
- [79] L. Kang et al. (2025) „Critical role of CD55 in controlling wound healing“ <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12005244/>.
- [80] Y. Hu et al. (2024) „Tumor necrosis factor receptor 2 promotes endothelial cell-mediated suppression of CD8+ T cells through tuning glycolysis in chemoresistance of breast cancer“ <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11265105/>.
- [81] T. Herricks et al. (2013) „Clonal Variants of Plasmodium falciparum Exhibit a Narrow Range of Rolling Velocities to Host Receptor CD36 under Dynamic Flow Conditions“ <https://journals.asm.org/doi/10.1128/ec.00148-13>.
- [82] B. J. Ballermann et al. (1998) „Shear stress and the endothelium“ [https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538\(15\)30888-7/fulltext](https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538(15)30888-7/fulltext).
- [83] J. Allweier et al. (2025) „Unraveling the complex interaction between Plasmodium falciparum infected erythrocytes and its host“ <https://www.bnitm.de/forschung/forschungsgruppen/interface/ag-wirt-parasit-interaktion/plasmodium-host-parasite-interaction>.

- [84] R. P. Thylur et al. (2017) „CD36 receptor regulates malaria-induced immune responses primarily at early blood stage infection contributing to parasitemia control and resistance to mortality“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28416609/>.
- [85] B. A. Robinson et al. (2003) „Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12603733/>.
- [86] C. Hempel et al. (2017) „Binding of Plasmodium falciparum to CD36 can be shielded by the glycocalyx“ <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5424350/>.
- [87] A. Cabrera et al. (2018) „Plasmodium falciparum-CD36 Structure-Function Relationships Defined by Ortholog Scanning Mutagenesis“ <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6386811/>.
- [88] S. Predehl (2010) „Funktionsanalysen der PfEMP1 Proteinfamilie von Plasmodium falciparum (Welch, 1897)“ <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/bitstream/ediss/3718/1/predehl.pdf>.
- [89] World Health Organization (2023) „World malaria report 2023“ <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>.
- [90] S. M. Kraemer und J. D. Smith (2006) „A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16814594/>.
- [91] A. Ramstedt Jensen et al. (2020) „Cerebral Plasmodium falciparum malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31562653/>.
- [92] A. Magallon-Tejada et al. (2016) „Cytoadhesion to gC1qR through Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 in Severe Malaria“ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27835682/>.
- [93] J. H. Janes et al. (2011) „Investigating the Host Binding Signature on the Plasmodium falciparum PfEMP1 Protein Family“ <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371%2Fjournal.ppat.1002032>.
- [94] F. Lennartz et al. (2019) „Structural insights into diverse modes of ICAM-1 binding by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes“ <https://doi.org/10.1073/pnas.1911900116>.
- [95] J. A. Rowe et al. (2009) „Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications“ <https://www.cambridge.org/core/journals/expert-reviews-in-molecular-medicine/article/adhesion-of-plasmodium-falciparum-infected-erythrocytes-to-human-cells-molecular-mechanisms-and-therapeutic-implications/D852227DA2C65CBF13226877170D7570>.

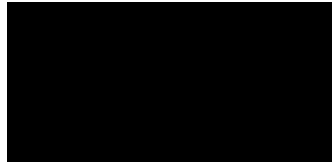
- [96] G. Helms et al. (2016) „Modeling cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and leukocytes—common principles and distinctive features“
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.12142>.
- [97] X. Zhang et al. (2024) „CD36 regulates macrophage and endothelial cell activation and multinucleate giant cell formation in anti neutrophil cytoplasm antibody vasculitis“
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521661624000251>.
- [98] M. Kößling et al. (2024) „Next Generation Sequencing“
https://flexikon.doccheck.com/de/Next_Generation_Sequencing.

7. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Literatur anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Praktische Arbeiten, die als Teil dieser Arbeit durch Dritte durchgeführt wurden, sind ebenfalls kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch online oder in gedruckter Form veröffentlicht.

Hamburg, den 04.12.25



Sandy Quynh Nhu Nguyen

8. Danksagung

An dieser Stelle bin ich nur noch eine Seite vorm Abschluss meines Studiums. Diese besondere letzte Seite widme ich folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. Bethune: Haben Sie vielen Dank, dass Sie trotz Ihres vollen Terminkalenders sich der Betreuung und der Korrektur meiner Bachelorarbeit angenommen haben. Das ist definitiv keine Selbstverständlichkeit und verlangt viel Zeit und Mühe, weshalb mein erster Dank an Sie geht.

Frau Prof. Dr. Bruchhaus: Liebe Iris, ich hatte damals im Bewerbungsgespräch mir besonders Mühe gegeben einen guten Eindruck zu hinterlassen. Ich hoffe, dass dieser Eindruck auch nach meiner Zeit geblieben ist. Ich danke dir dafür, dass du mir die Möglichkeit gegeben hast in einem Team zu arbeiten, welches herzlich und freundschaftlich miteinander arbeitet. Meine Zeit am BNITM hat mir gezeigt, wie sehr es sich gelohnt hat, mein Studium bis zum Ende durchzuziehen: Sie hat mir die Chance gegeben, mit außergewöhnlich talentierten Menschen zusammenzuarbeiten, die selbst die kleine Praktikantin im Team wertschätzen. Ich danke dir für die schöne und lehrreiche Zeit. Jeder Montag fühlte sich an wie ein Freitag.

Angehender Dr. David D. Rauchberger: Ich habe dir bis zur letzten Minute Nerven gekostet. Warum reizen wir das nicht etwas weiter aus? Ich habe noch nie Star Wars geschaut, aber ich habe gehört, dass Meister Yoda mal sagte: „Furcht ist der Pfad zur dunklen Seite. Furcht führt zu Wut, Wut führt zu Hass, Hass führt zu unsäglichem Leid.“ Ich kann dir an dieser Stelle versichern, dass ich durch deine gute Betreuung nie diese Furcht erleben musste und durch dein Anleiten auf der guten Seite geblieben bin. Danke dir, fürs Durchhalten und das Vertrauen in meine Arbeit. Ich würde mal behaupten, dass nach bestandener Bachelorarbeit du mich auch ruhig gerne befördern könntest. Möge die Macht mit dir sein. Mögen weitere Praktikanten unter deiner Leitung genauso eine gute und lehrreiche Zeit haben! Viel Erfolg für deine weitere Zeit am BNITM. Du wirst das meistern!

Mutti Susann Ofori: Liebe Susann, was wäre ich nur ohne dich? Streich das. Was wären **wir** alle nur ohne dich. Du warst das erste Gesicht am BNITM, welches mich begrüßt hatte. Ich kann mir keine bessere Person für meinen Start vorstellen. Ich hoffe, dass noch viele andere das gleiche Glück haben dürfen. Ich danke dir für deine ausführlichen Einweisungen, Erklärungen und die Momente zwischendrin in denen man

sich über alles mit dir austauschen durfte. Wie die Mutti, die gute Seele, die in dem Laden Ordnung und einen sicheren Ort zum Reden anbietet. Ich danke dir vielmals für deine Betreuung und das Gefühl der Sicherheit, welches du mir in dieser Zeit gegeben hast. Ich wünsche dir alles Gute und Schöne für das Heute und für die Zukunft.

Team AG Bruchhaus: Danke an jeden einzelnen in dieser Gruppe, der/die mich in diesem Team aufgenommen hat. Es war mir eine große Freude an eurer Seite arbeiten und lernen zu dürfen. Ich wünsche euch viel Erfolg und Geld im weiteren Werdegang!

Meine Freunde: Ich schätze jeden einzelnen meiner Freunde. Mein Herz gehört ganz euch, da ihr in allen Zeiten mich unterstützt habt. Ihr seid es gewesen, die meine Hand gehalten, mir Mut zugesprochen und den Schubs gegeben habt, als ich selbst nicht mehr weiterwusste. Darum an jeden Einzelnen: Ich danke dir. Für den Weg, den du mit mir bisher gegangen bist und mit dem du mit mir weiter gehst. Für die vielen Stunden des Zuredens. Für jede Hilfe, die du mir angeboten hast. Für jedes gemeinsame Lachen und Weinen. Ich danke dir. Von Herzen.

Meiner Familie: Ich danke euch für eure Unterstützung, die ihr mir in jeglicher Situation gegenüber gebracht habt. Hätte ich die Möglichkeit einen Moment im Leben nochmal zu erleben, dann wäre es der Gang mit euch zum Altar. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen durfte und auf dieser Welt einen Safe-Spot bei euch habe. Ich danke euch von Herzen. Ansonsten: Werdet bitte reich, damit ich in der Zukunft nur auf eure Hunde aufpassen muss.

Mein Mann: Ich hab's durchgezogen. Du schuldest mir ein Essen.

An dieser Stelle möchte ich mich nun meine Danksagung und damit mein Studium abschließen und freue mich auf das nächste Kapitel im Leben.