

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Science

Untersuchung der Adhärenz von *Plasmodium falciparum*

***PfEMP1*-Variante IT4var67 an Endothelrezeptoren unter
statischen und Flussbedingungen**

Bachelorarbeit

Im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Samanthy Yogendran

Matrikelnummer: [REDACTED]

Hamburg

am 02.04.2026

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 eines der weltweit wichtigsten tropischen Infektionskrankheiten. Sie wird durch den einzelligen Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht und tritt vor allem in tropischen und subtropischen Regionen auf, darunter Subsahra-Afrika, Südostasien und Teile Südamerikas. *Plasmodium falciparum* ist der Erreger der gefährlichsten Form der Malaria, die durch den Stich einer Anopheles-Mücke übertragen wird. Durch den Stich der Anopheles-Mücke wandern Sporozoiten in die Leber, wo sie sich vermehren und anschließend die Erythrozyten befallen.

Die Pathogenese der schweren Malaria umfasst die Zytoadhäsion infizierter Erythrozyten an Endothelrezeptoren, was zur Beeinträchtigung des Blutflusses und zu Endothelfunktionsstörungen führt. Die Zytoadhäsion wird durch das *PfEMP1*-Protein vermittelt, das auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten exprimiert wird. Um die Bindung zu erleichtern, bildet der Parasit spezielle Oberflächenstrukturen, sogenannte *knobs*, aus, in denen das *PfEMP1* lokalisiert ist. Das *PfEMP1*-Protein wird von rund 60 verschiedenen *var*-Genen kodiert.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Bindungseigenschaft der IT4-SLI-*var67-PfEMP1*-Transfektante an CHO-Zellen exprimierte Endothelrezeptoren unter statischen und Flussbedingungen zu charakterisieren. Die IT4-SLI-*var67*-Transfektante exprimiert fast ausschließlich das *var67*-Gen. Statische Assays erlauben die Untersuchung der Bindungsaffinität von infizierten Erythrozyten ruhenden Bedingungen, während Assays unter Flussbedingungen die Interaktion unter realistischen hämodynamischen Kräften abbilden. So können sowohl die Stärke der Bindung als auch das dynamische Verhalten der Zellen unter Scherstress charakterisiert werden. Die *var67*-Variante bindet an den Endothelrezeptor CD36, sowohl unter statischen als auch unter Flussbedingungen. Dabei konnte zudem eine rollende Bindung der infizierten Erythrozyten charakterisiert werden.

Das Wissen aus diesen Erkenntnissen spielt eine entscheidende Rolle für das weiterführende Verständnis der Pathogenität von *Plasmodium falciparum*. Es bildet zudem eine wichtige Grundlage für zukünftige Forschungsarbeiten, die darauf abzielen die Vielfalt der Transfektanten zu erweitern und die zugrundeliegenden Mechanismen der Pathogenese umfassender zu erfassen. Auf diese Weise kann langfristig die Entwicklung gezielter Therapien und Impfstoffe vorangetrieben werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	12
1.1 Hintergründe zu Malaria	12
1.2 Der Malaria-Parasit	13
1.3 <i>P. falciparum</i> : Der Lebenszyklus	14
1.3.1 Intraerythrozytärer Lebenszyklus und Wirtszellmodifikation	16
1.4 Sequestrierung	17
1.5 Genetische Grundlage der antigenen Variation	18
1.5.1 Die <i>var</i> -Gen-Familie	18
1.5.2 <i>PfEMP1</i>	19
1.5.2.1 <i>PfEMP1</i> -Proteinvariante IT4- <i>var67</i>	20
1.5.3 <i>knobs</i>	21
1.6 Relevante humane Endothelrezeptoren	22
1.6.1 CD36	22
1.6.2 ICAM-1	22
1.6.3 VCAM-1	23
1.6.4 EPCR	23
1.6.5 CD9, CD37, CD55, CD81	23
1.6.6 TNFR1, TNFR2	24
1.6.7 MDR-1	24
1.7 Bedeutung der Zytoadhäsion unter statischen und Flussbedingungen	24
1.8 Motivation und Projektidee	25

2.	Materialien und Methoden	26
2.1	Materialien.....	26
2.1.1	Geräte.....	26
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3	Biologische und chemische Substanzen	28
2.1.4	Puffer, Medien und weitere Lösungen	29
2.1.5	Verwendete Zelllinie.....	33
2.1.6	Software	34
2.2	Methoden zur Kultivierung von <i>P. falciparum</i> und CHO-Zellen.....	34
2.2.1	In-vitro-Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	34
2.2.2	Auftauen von <i>P. falciparum</i>	34
2.2.3	Einfrieren von <i>P. falciparum</i>	35
2.2.4	Giemsa-Färbung.....	35
2.2.5	Synchronisierung der <i>P. falciparum</i> -Kultur mit D-Sorbitol	36
2.2.6	<i>Knob-enrichment</i> mittels Gelatine	36
2.2.7	In-vitro-Kultivierung von CHO-Zellen	37
2.2.8	Einfrieren von CHO-Zellen.....	37
2.2.9	Auftauen von CHO-Zellen.....	38
2.3	Methoden zur Expressionsanalyse.....	38
2.3.1	RNA-Isolation zur Transkriptionsanalyse	38
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.3.3	Trypsin-Assay	39
2.4	Methoden zur Analyse des Bindungsverhaltens.....	40
2.4.1	Panning-Verfahren.....	40
2.4.2	Ernte der Ringform	41
2.4.3	Bindungs-Assay.....	42
2.4.4	Bindungs-Assay unter Flussbedingungen	44
3.	Ergebnisse	47

3.1	PCR-Analyse von IT4-var67 zur Genotypbestimmung	47
3.2	Statischer Bindungs-Assay mit IT4-var67	47
3.3	Panning IT4-var67 über CHO-745-CD36	50
3.4	Western-Blot-Analyse des Trypsin-Assays von var67 und var67-P4.....	52
3.5	Statischer Bindungs-Assay mit IT4-var67-P4	53
3.6	Bindungs-Assay von IT4-var67-P4 unter Flussbedingungen	56
4.	Diskussion	61
4.1	Nachweismethoden mittels PCR und Trypsin-Assay.....	61
4.2	Panning zur Selektion von IT4-var67 an CD36	62
4.3	Charakterisierung von IT4-var67 durch statische Bindungs-Assays	63
4.4	Charakterisierung von IT4-var67 durch Bindungs-Assays unter	64
	Flussbedingungen	64
5.	Schlussfolgerung und Ausblick	66
6.	Literaturverzeichnis	67
7.	Eidesstattliche Erklärung	75
8.	Danksagung	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste aller verwendeten Geräte.....	26
Tabelle 2: Liste aller verwendeten Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 3: Liste aller verwendeten chemischen und biologischen Reagenzien.....	28
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Medien und Lösungen.....	29
Tabelle 5: Liste aller verwendeten CHO-Rezeptoren	33
Tabelle 6: Liste der verwendeten Softwares	34
Tabelle 7: Parameter für den Bindungs-Assay unter Flussbedingungen	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Verbreitung von Malaria.	12
Abbildung 2: Lebenszyklus des Malariaerregers <i>P. falciparum</i>	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines nicht infizierten und eines infizierten Erythrozyten.	16
Abbildung 4: Chromosomale Anordnung der <i>var</i> -Gene.	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines <i>PfEMP1</i> -exprimierenden infizierten Erythrozyten.	20
Abbildung 6: Schematischer Aufbau des <i>PfEMP1</i> -Proteins IT4- <i>var67</i> von <i>P. falciparum</i>	20
Abbildung 7: Darstellung der <i>knob</i> -Bildung in einem durch <i>Plasmodium</i> infizierten Erythrozyten. Der <i>knob</i> dient als Plattform für das Zytoadhäsionsprotein <i>PfEMP1</i> und besteht aus Proteinen wie KAHRP, Aktin und Spektrin (Helms et al., 2016).	21
Abbildung 8: Allgemeiner Aufbau des Bindungs-Assay unter Flussbedingungen.	45
Abbildung 9: Ergebnisse der PCR von <i>var67</i> und <i>var67</i> -P4.	47
Abbildung 10: Beispielhafte Mikroskopiebilder für CHO-Zelllinien, die verschiedene menschliche Endotherezeptoren exprimieren, sowie daran gebundene iEs.	48
Abbildung 11: Bindung von IT4-SLI- <i>var67</i> -iEs an CHO-Zellen mit unterschiedlichen Endothelrezeptoren.	49
Abbildung 12: Selektive Anreicherung <i>var67</i> -exprimierender iEs über den CD36-Rezeptor durch seriellles Panning auf CHO-Zellen.	50
Abbildung 13: Nachweis der trypsinvermittelten Spaltung von <i>PfEMP1</i> in <i>var67</i> -exprimierenden iEs mittels Western Blot.	52
Abbildung 14: Beispielhafte Mikroskopiebilder für CHO-Zelllinien, die verschiedene menschliche Endotherezeptoren exprimiere, sowie daran gebundene iEs.	54
Abbildung 15: Breites Adhärenzprofil von IT4-SLI- <i>var67</i> -P4 iEs an verschiedenen CHO-Ednothelrezeptoren.	55
Abbildung 16: Analyse der Adhärenz von IT4- <i>var67</i> -P4 an CD36 unter Flussbedingungen.	57
Abbildung 17: Bindung von IT4- <i>var67</i> -P4 iEs an CHO-CD36-Zellen unter Flussbedingungen.	58
Abbildung 18: Mittlere Kontaktdistanz [mm] von IT4- <i>var67</i> -P4 iEs entlang von CD36 bei variierenden Scherkräften.	59

Abbildung 19: Mittlere Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{min}$] von IT4- <i>var67</i> -P4 iEs entlang von CHO-CD36 bei variierenden Scherkräften.....	60
---	----

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
ATS	engl. <i>acidic terminal segment</i>
BM	Bindungsmedium
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BSA	engl. <i>bovine adult serum</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CHO	engl. <i>chinese hamster ovary</i>
CIDR	engl. <i>cysteine-rich interdomain region</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DBL	engl. <i>duffy-binding-like</i>
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPCR	Endothel-Protein-C-Rezeptor
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
G418	Neomycin
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i>
ICAM-1	engl. <i>intracellular adhesion molecule 1</i>
iEs	Infizierte Erythrozyten
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MC	engl. <i>maurer's clefts</i>
MFS	engl. <i>malaria freezing solution</i>
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MSP	engl. <i>merozoite surface protein</i>
MTS	engl. <i>malaria thawing solution</i>

MDR1	engl. <i>multidrug resistance protein 1</i>
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NPPs	engl. <i>new permeability pathways</i>
NTS	N-terminale Segmentdomäne
O ₂	Sauerstoff
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
<i>PAM</i>	engl. <i>pregnancy-associated malaria</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
<i>PfEMP1</i>	engl. <i>Plasmodium falciparum erythorcyte membrane protein 1</i>
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
pH	engl. <i>Pondus hydrogenii</i> – Potential des Wassers
PIC	engl. <i>protease inhibitor cocktail</i>
PV	parasitophore vacuole
PVM	Parasitophore vacuole membrane
RT	Raumtemperatur
STI	engl. <i>Soybean trypsin inhibitor</i>
TNF-α	engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNFR1	engl. <i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TNDR2	engl. <i>tumor necrosis factor receptor 2</i>
Ups	engl. <i>upstream sequeunce</i>
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>

WHO

engl. *world health organisation*

1. Einleitung

1.1 Hintergründe zu Malaria

Malaria zählt weltweit zu den bedeutendsten tropischen Infektionskrankheiten und kommt hauptsächlich in tropischen und subtropischen Regionen vor, insbesondere in Subsahara-Afrika, Südostasien und Teilen Südamerikas. Rund 40 % der Weltbevölkerung lebt in diesen Gebieten und knapp 200 Millionen Menschen erkranken jährlich an Malaria. Abbildung 1 zeigt, welche Länder von Malaria betroffen sind. Etwa 90 % der Betroffenen stammen aus Afrika (*Malaria*, 2000).

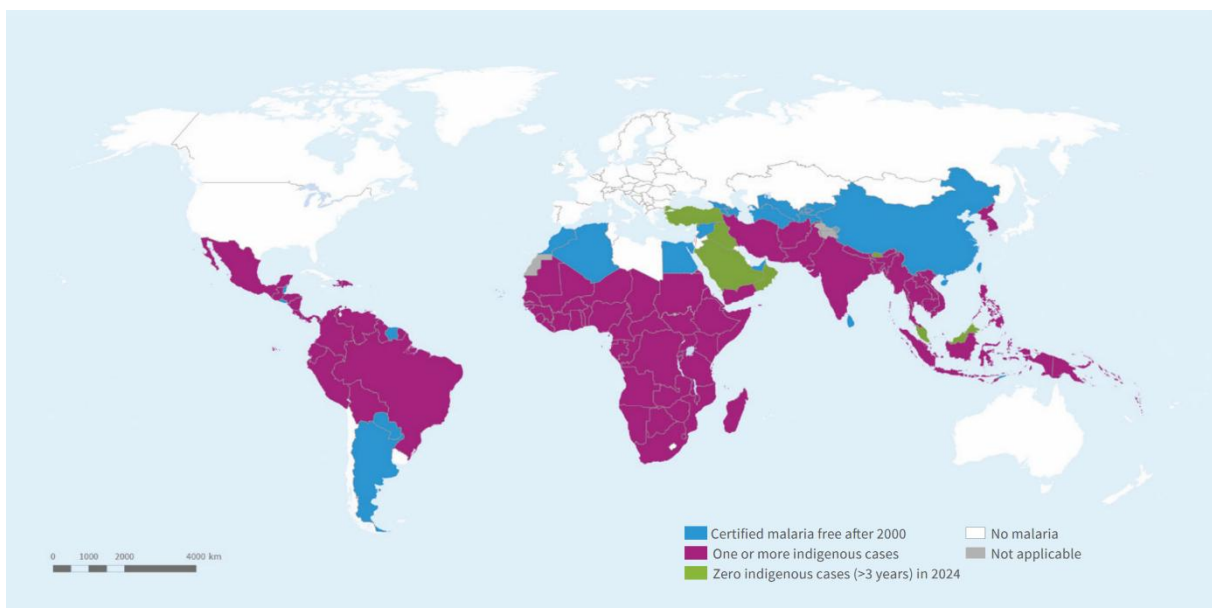


Abbildung 1: Weltweite Verbreitung von Malaria.

Die Karte zeigt die Malariaübertragung in verschiedenen Regionen der Welt. Die Länder in violett weisen eine endemische Malariaübertragung mit einem oder mehreren einheimischen Fällen auf. Die blau markierten Länder gelten seit 2000 als malariafreie Länder. In den grün gekennzeichneten Ländern wurden innerhalb der letzten drei Jahre keine einheimischen Malariafälle registriert (Stand: 2024). Die Länder in weiß sind Gebiete ohne Malariavorkommen (*World Malaria Report 2025: Addressing the Threat of Antimalarial Drug Resistance*, 2025).

Im Jahr 2024 wurden rund 282 Millionen Erkrankungen und 610.000 Todesfälle registriert, wobei drei Viertel der Todesfälle Kinder unter fünf Jahren und Schwangere sind, da das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf bei diesen Personen besonders hoch ist (*World Malaria Report 2025: Addressing the Threat of Antimalarial Drug Resistance*, 2025).

Darüber hinaus begünstigt die Klimaveränderung die Verbreitung der Anopheles-Mückenpopulation, die für die Verbreitung von Malaria verantwortlich ist. Wärmere Temperaturen oder längere feuchte Perioden fördern eine längere Lebensdauer der Mücke

und die Entwicklung des Malaria-Parasiten. Dadurch kann es zu einer erhöhten Übertragungsrate und somit zu einer steigenden Malariabelastung in den betroffenen Regionen führen (Hartung, 2025; *Predicting the Impact of Climate Change on Malaria*, 2024).

1.2 Der Malaria-Parasit

Malaria wird durch den einzelligen eukaryotischen Parasiten der Gattung *Plasmodium* (P.) verursacht und durch den Stich infizierter weiblicher *Anopheles*-Mücken auf den Menschen übertragen. Die Plasmodienarten, die überwiegend den Menschen infizieren, umfassen *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* und *P. malariae* (Sato, 2021).

P. vivax infiziert überwiegend Menschen in Südostasien, Zentralasien und Zentralamerika. Durch die Bildung von Ruhestadien der Parasiten, sogenannten Hypnozoiten, in der Leber kann *P. vivax* eine erneute Erkrankung verursachen. Zoonotische Malaria-Erreger, wie *P. knowlesi*, infizierte ursprünglich nur Makaken, wie den Javaner Affen, in Südostasien. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass dieser Erreger auch den Menschen infiziert. *P. ovale* verursacht meist eine milde Infektion mit Fieberschüben im 48- bis 50-Stunden-Rhythmus und bildet ebenfalls Hypnozoiten. *P. malariae* verursacht eine niedriggradige, häufig über Wochen anhaltende Parasitämie, die auch Jahre nach der Erstinfektion erneut auftreten kann (Gozalo et al., 2024).

Schwere Malaria hingegen wird durch *P. falciparum* verursacht. Der Krankheitsverlauf ist oft mit milden Symptomen wie Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Übelkeit und Gliederschmerzen verbunden. Er kann jedoch auch schwere Krankheitsbilder aufweisen, darunter Anämie, Atemnot, Nierenversagen und Blutungen, wodurch es zum Tod kommen kann (Philpott & Keystone, 1987; Trampuz et al., 2003). Dieses Krankheitsbild beruht auf der Fähigkeit von *P. falciparum*, sich an die Wände kleinster Blutgefäße anzuheften. Diese Adhäsion tritt in verschiedenen Organen auf, wie im Gehirn, in der Lunge, im Herzen, in der Niere, sowie in der Plazenta oder im subkutanem Fettgewebe (Autino et al., 2012; Franke-Fayard et al., 2010). Infizierte Personen, die eine Infektion überstanden haben, können gelegentlich eine partielle Immunität entwickeln, die sie vor den schweren Symptomen des Krankheitsbildes schützt (Doolan et al., 2009).

1.3 *P. falciparum*: Der Lebenszyklus

Der komplexe Lebenszyklus von *P. falciparum* umfasst sowohl den Menschen als auch die *Anopheles*-Mücke und beinhaltet zwei Entwicklungsphasen, die exoerythrozytäre Phase und die erythrozytäre Phase (Beck, 2006).

Die exoerythrozytäre Phase beginnt mit der Infektion durch den Stich der *Anopheles*-Mücke, wodurch Sporozoiten in den Blutkreislauf des Menschen freigesetzt werden (Abbildung 2). Die Sporozoiten wandern in die Leber und befallen die Hepatozyten. Dort wachsen sie und vermehren sich für 8 bis 10 Tage. Nach dieser Entwicklungsphase innerhalb der Hepatozyten werden bis zu 30.000 Merozoiten pro Leberzelle in die Blutbahn freigesetzt, die anschließend die Erythrozyten befallen. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die erythrozytäre Phase, die für die typischen Symptome der Malaria Erkrankung verantwortlich ist. Die gesamte erythrozytäre Phase dauert 48 Stunden an (Rowe et al., 2009).

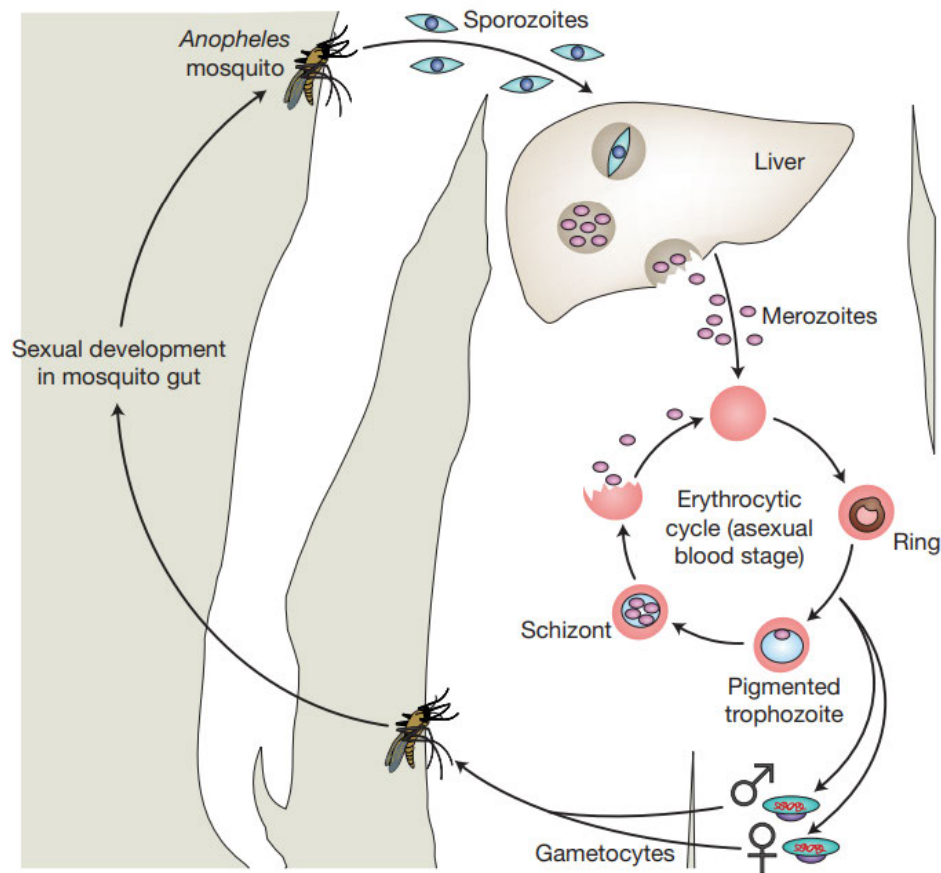


Abbildung 2: Lebenszyklus des Malariaerregers *P. falciparum*.

Die Infektion beginnt mit dem Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke, bei dem Sporozoiten in den menschlichen Blutkreislauf gelangen. Die Sporozoiten wandern in die Leber, wo sie sich vermehren und als Merozoiten in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Dort infizieren sie Erythrozyten und durchlaufen den erythrozytären Zyklus mit den Stadien Ringform, Trophozoit und Schizont. Nach dem letzten Stadium werden neue Merozoiten freigesetzt und infizieren erneut Erythrozyten. Parallel entwickelt sich ein Teil zu Gametozyten, die bei einer erneuten Blutmahlzeit von der Mücke aufgenommen werden und sich zu Sporozoiten entwickeln (Rowe et al., 2009).

Aus den Merozoiten bilden sich die Ring-Stadien. Diese Phase dauert etwa 18 Stunden. In dieser Phase erscheint der Parasit mikroskopisch durch die Giemsa-Färbung als kleiner blauer Ring mit einem kleinen roten Punkt, der den Zellkern darstellt. Darauf folgt das Trophozoitenstadium, bei dem sich eine Nahrungsvakuole bildet (Wiser, 2024). Nach 34 Stunden gehen die Parasiten vom Trophozoitenstadium in das Schizontenstadium über. In diesem Stadium bilden sich bis zu 32 Merozoiten pro infizierte Erythrozyten (iEs). Sobald das letzte Stadium erreicht ist, werden die Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt und der Zyklus der Infektion beginnt erneut.

Während ein Teil der Parasiten sich weiter im Körper des Menschen verbreitet, entwickeln sich einige der Parasiten zu sexuellen Stadien, den Gametozyten. Diese werden während eines Stiches von der Mücke aufgenommen und reifen in ihr zu Sporozoiten heran, wodurch es zu einer Weitergabe der Parasiten kommt (Rowe et al., 2009).

1.3.1 Intraerythrozytärer Lebenszyklus und Wirtszellmodifikation

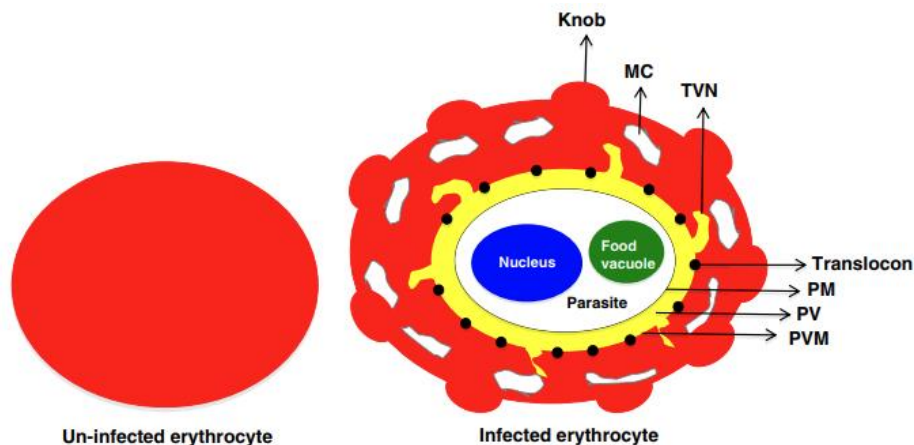


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines nicht infizierten und eines infizierten Erythrozyten. Bei einer Infektion durch *P.falciparum* durchlaufen Erythrozyten mehrere Strukturveränderungen, wie die Bildung von Maurer'schen Spalten (MC), dem tubulovesikulären Netzwerk, der parasitophoren Vakuole (PV), der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) sowie den *knobs* an der Zelloberfläche (Prajiapati & Singh, 2013).

Ein wichtiger Schritt im Lebenszyklus von *P. falciparum* ist die Invasion der Erythrozyten, die entscheidend für das Überleben des Parasiten im Wirt ist. Ein zentraler Vorteil dieser intrazellulären Lebensweise ist die Umgehung der Immunantwort, da Erythrozyten auf ihrer Oberfläche keine *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Rezeptoren besitzen. Durch das Fehlen des MHC-Rezeptors sind die Erythrozyten nicht in der Lage, Antigene zu präsentieren, wodurch der Parasit für das Immunsystem weitgehend unentdeckt bleibt (Gomes et al., 2016).

Trotz des Vorteils, die *P. falciparum* durch die Infektion der Erythrozyten erhält, muss der Parasit im intrazellulären Bereich auch verschiedene metabolische Herausforderungen bewältigen. Eine der Herausforderungen stellt die Nährstoffaufnahme dar. Im infizierten Erythrozyten stellt Hämoglobin die wichtigste Nährstoffquelle für den Parasiten dar. Da Hämoglobin jedoch die essentielle Aminosäure Isoleucin nicht enthält, kommt es zu einer Nährstofflimitierung für den Parasiten (Dhangadamajhi et al., 2010; Martin & Kirk, 2007). Um diese Herausforderung zu umgehen, verändert *P. falciparum* während seines intraerythrozytären Entwicklungszyklus die Struktur und Funktion der Wirtszelle. Dadurch werden sowohl die Nährstoffaufnahme als auch der Transport parasitärer Proteine erleichtert.

Die Modifikation der Wirtszelle beginnt mit dem Eintritt der Merozoiten in den Blutkreislauf. Dabei binden sie mithilfe der Merozoiten-Oberflächenproteinen (MSP) an die

Erythrozyten und richten ihr apikales Ende auf die Wirtszelle aus. Durch die MSP-vermittelte Bindung wird das Eindringen der Merozoiten in die Erythrozyten eingeleitet. Nach dem Eintritt in die Wirtszelle bildet sich eine parasitophore Vakuole (PV), die den Parasiten vor dem Zytoplasma der Wirtszelle abgrenzt. Der Parasit, der sich innerhalb der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) befindet, etabliert einen Mechanismus, um Nährstoffe aus dem Wirtszytosol und dem extrazellulären Raum aufzunehmen (siehe Abbildung 3).

Dafür werden neu gebildete Permeabilitätskanäle (NPPs; engl. *new permeability pathways*) aufgebaut, die die Aufnahme von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Vitaminen und Cholin ermöglichen (Counihan et al., 2021). Zusätzlich ermöglichen NPPs den Export von Stoffwechselabfällen des Parasiten aus der Zelle (Bouyer et al., 2020). Eine weitere Möglichkeit für die Nährstoffaufnahme ist die Ausbildung eines tubulovesikulären Netzwerkes (Tamez et al., 2008). Eine weitere Veränderung, die durch den Parasiten verursacht wird, ist die Bildung von Maurer'schen Spalten (MC; engl. *maurer's clefts*). Diese Spalten dienen dazu, die vom Parasiten ausgeschiedenen Proteine an die Oberfläche der Erythrozyten zu transportieren (Spycher et al., 2006; Wickert & Krohne, 2007).

1.4 Sequestrierung

Die Sequestrierung bezeichnet das Haften von infizierten Erythrozyten an den Gefäßwänden im Trophozoitenstadium. Das Haften an den Gefäßwänden führt zu einer Verringerung beziehungsweise Blockade des Blutflusses, das zu einer unzureichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie zu einer eingeschränkten Abfuhr von Stoffwechselabfallprodukten führt (van der Heyde et al., 2006). Die Zelladhäsion kann in drei unterschiedlichen Typen unterteilt werden: die Zytoadhäsion an Endothelzellen, die Rosettenbildung und das thrombozytenvermittelte Verklumpen (Rowe et al., 2009). Eine der Ursachen für die Zytoadhäsion von iEs an den Gefäßwänden ist ihre veränderte Struktur, die unter normalen Bedingungen zur Filtration durch die Milz führen würde. In der Milz werden abnormale Erythrozyten durch physikalische Selektion und immunvermittelte Erkennungsmechanismen identifiziert und anschließend von Makrophagen phagozytiert (Herricks et al., 2012). Insbesondere in dem Bereich der Milz, der als rote Pulpa bekannt ist, werden die infizierten Erythrozyten zurückgehalten. Innerhalb der roten Pulpa befindet sich ein Geflecht, das als retikuläres Netzwerk

bezeichnet wird. Dieses Netzwerk besteht aus Zellen und Fibrillen, wodurch die iEs zurückgehalten werden, während die normalen Erythrozyten diese passieren können (Safeukui et al., 2008).

Die Schwere der Malaria hängt vom Ort der Sequestrierung ab. Es hat sich gezeigt, dass die Adhäsion der iEs an das Endothel-Protein-C-Rezeptor zu zerebraler Malaria führt, einer der schwerwiegendsten Formen der Malaria (Bernabeu & Smith, 2017; Mosnier & Lavstsen, 2016). Ein weiterer Ort der zu schwerwiegenden Malaria führt, ist die Plazenta, die zu schwangerschaftsassoziierter Malaria (engl. *pregnancy-associated malaria*, PAM) oder Plazentamalaria (engl. *placental malaria*, PM) führt (Omer et al., 2021). Bei dieser Form binden die iEs an Chondroitin-Sulfat A (CSA), das überwiegend in der Plazenta vorkommt (Kidima, 2015). Dies führt zu einer Beeinträchtigung des Blutflusses, wodurch der Fötus nicht ausreichend mit Nährstoffen versorgt wird, was das Risiko für Totgeburten, Anämie der Mutter und geringes Geburtsgewicht erhöht (Maubert et al., 2000; Zakama et al., 2020).

1.5 Genetische Grundlage der antigenen Variation

1.5.1 Die *var*-Gen-Familie

Die *Plasmodium falciparum* Erythrozytenmembranprotein 1 (*PfEMP1*) werden durch die *var*-Gen-Familie kodiert, die aus ungefähr 60 Genen pro Parasitengenom besteht. Während jedes intraerythrozytären Zyklus, wird nur eines der 60 *var*-Gene im Ringstadium vom Parasiten exprimiert. Dabei werden die restlichen Gene abgeschaltet, was als *mutually exclusive expression* bezeichnet wird (Guizetti & Scherf, 2013). Dadurch wird jeweils nur ein *PfEMP1*-Protein an der Oberfläche von iEs ausgebildet. Dieses vermittelt die Bindung an das Endothel und trägt zur Umgehung der humoralen Immunantwort des Wirts bei, wodurch sich eine chronische Infektion etablieren kann (Sakoguchi & Arase, 2022). Die Struktur und Funktion von *PfEMP1* werden in Abschnitt 1.5.2 näher erklärt.

Der Parasit umgeht die Immunabwehr durch einen Transkriptionswechsel innerhalb der *var*-Genfamilie, wodurch stets neu exprimierte Sequenzen entstehen (Otto et al., 2019). Dieser kontinuierliche Sequenzwechsel hat im Laufe der Evolution zu einem ausgeprägten Polymorphismus geführt. Etwa 35 der 60 *var*-Gene befinden sich in den

subtelomerischen Regionen der Chromosomen, während die restlichen in Clustern lokalisiert sind.

Ein *var*-Gen ist ca. 6-13 kb groß und besteht aus zwei Exons. Das erste Exon ist verantwortlich für die Kodierung der hochvariablen extrazellulären Region des *PfEMP1*-Proteins sowie die Transmembrandomäne, während das zweite Exon für das konservierte intrazelluläre saure terminale Segment (ATS-Domäne) kodiert (Kyes et al., 2003; Smith et al., 1995). *Var*-Gene werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit und der 5'-Promotorregion in vier *upstream sequence*-Gruppen (Ups; A, B, C und E) unterteilt (Metwally et al., 2017; Rask et al., 2010). Die *var*-Gene, die dem UpsA- und UpsE-Typen zugehören, sind in den subtelomerischen Regionen lokalisiert und werden in Richtung des Telomers transkribiert. Die UpsC-*var*-Gene kommen im Zentrum des Chromosoms vor, während die UpsB-*var*-Gene überwiegend in subtelomerischen Regionen, aber auch im Zentrum, lokalisiert sind. Die UpsB- und UpsC-*var*-Gene werden vom Telomer weg transkribiert (Kraemer et al., 2007; Kyes et al., 2007; siehe Abbildung 4).

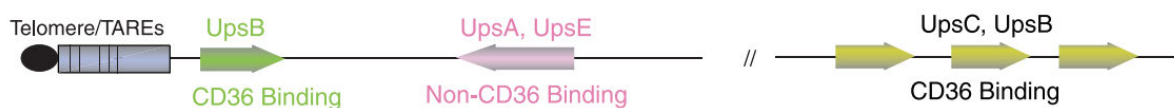


Abbildung 4: Chromosomale Anordnung der *var*-Gene.

Schematische Darstellung der Genorganisation verschiedener *var*-Gene von *P. falciparum*. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an. Die *var*-Gene der *upstream sequence* A (UpsA) und *upstream sequence* E (UpsE) befinden sich in subtelomerischen Regionen und werden in Richtung des Telomers transkribiert. *Upstream sequence* B (UpsB)-*var*-Gene kommen sowohl in subtelomerischen Regionen als auch im Zentrum des Chromosoms vor. Die *upstream sequence* C (UpsC) sind ebenfalls im Zentrum des Chromosoms lokalisiert. Sowohl UpsB als auch UpsC werden vom Telomer weg transkribiert. (Kyes et al., 2007)

1.5.2 *PfEMP1*

Die Bindung iEs an den Wirtszellen wird als Zytoadhärenz bezeichnet und beruht auf der Interaktion zwischen parasitären Liganden auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten und den Rezeptoren der Wirtszellen. Eine zentrale Rolle bei der Zytoadhärenz spielt die Proteinfamilie *PfEMP1* (Sherman et al., 2003). Ein besonderes Merkmal dieser Proteinfamilie ist ihre hohe antigene Variabilität, die von ungefähr 60 *var*-Genen kodiert wird (Dimonte et al., 2020).

PfEMP1 besteht aus einem N-terminalen Segment (NTS), *Duffy-binding like* Domäne (DBL), die in die Subtypen α , β , γ , δ , ζ und ϵ klassifiziert werden, *cystein-rich interdomain regions* (CIDR), die in α , β und γ eingeteilt werden, einer Transmembrandomäne (TMD) sowie einer intrazellulären *acidic terminal segment*-Domäne (ATS) (Smith et al., 1995). Der Aufbau eines *PfEMP1*-Moleküls wird in Abbildung 5 dargestellt.

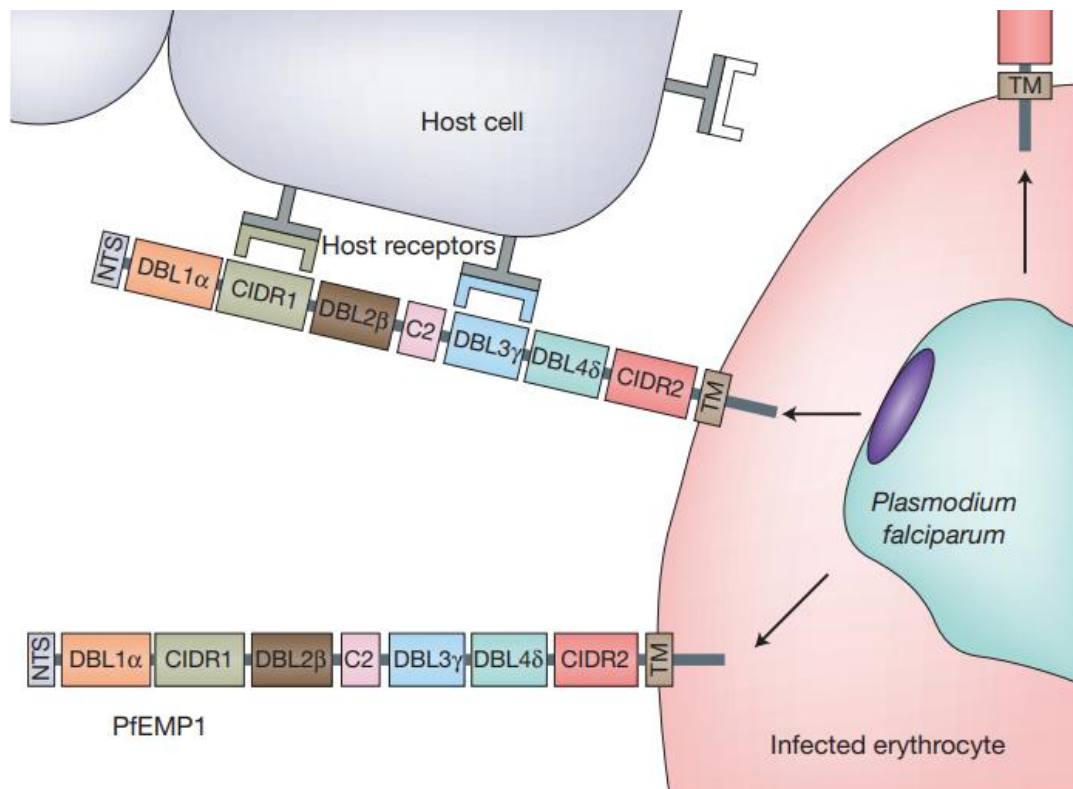


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines *PfEMP1*-exprimierenden infizierten Erythrozyten. *PfEMP1* besteht aus einem intrazellulären *acidic terminal segment* (ATS), einer *cystein-rich interdomain regions* (CIDR), einer *Duffy-binding-like* Domänen (DBL), sowie einem N-terminalen Segment (Rowe et al., 2009).

1.5.2.1 *PfEMP1*-Proteinvariante IT4-*var67*

Das IT4-Isolat stellt eine spezifische *PfEMP1*-Variante, die durch charakteristische Sequenzen und eine definierte Domänenkonfiguration gekennzeichnet ist. Eine bedeutende Vertreterin dieser Familie ist die Proteinvariante IT4-*var67*.



Abbildung 6: Schematischer Aufbau des *PfEMP1*-Proteins IT4-*var67* von *P. falciparum*. Gezeigt sind die aufeinanderfolgenden Domänen vom N-Terminus (NTS) über eine *DBLα*-Domäne und eine *CIDRα*-Domäne bis zu mehreren *DBLε*/*DBLζ*-Domänen (Bachmann et al., 2022).

Die Domänenanordnung von IT4-*var67* (siehe Abbildung 6) beginnt mit einem NTS, gefolgt von mehreren DBL- und CIDR-Domänen in einer spezifischen Reihenfolge. Typischerweise umfasst IT4-*var67* die Domänen DBL α 0.10, CIDR α 2.6, DBL ϵ 2, DBL ζ 3 und DBL ϵ 12. Jede Domäne besitzt spezifische Bindungseigenschaften, die zur Adhäsionsfähigkeit von iEs sowie zur Immunflucht von *P. falciparum* beitragen können (Bachmann et al., 2022).

1.5.3 knobs

Durch das Integrieren parasitärer Proteine von *P. falciparum* in die Membran der Erythrozyten wird ihre Membranstruktur so verändert, dass kleine Oberflächenstrukturen (*knobs*) entstehen. *Knobs* sind knopfartige Ausstülpungen (siehe Abbildung 7), die im Trophozoitenstadium entstehen (Dörpinghaus et al., 2020). Diese *knobs* sind entscheidend für die Zytoadhäsion von iEs an Gefäßendothelzellen. Eine Fehlbildung dieser Strukturen führt zu einer Verringerung der Anhaftung an die Gefäßwände und kann zu einem mildereren Krankheitsverlauf führen (Sharma, 1991; Wisner, 2023).

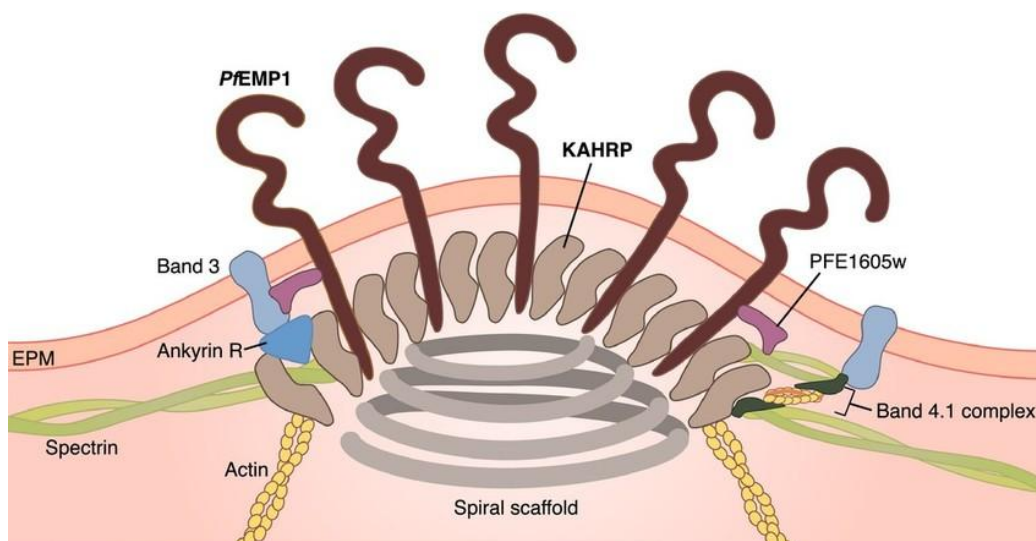


Abbildung 7: Darstellung der knob-Bildung in einem durch *Plasmodium* infizierten Erythrozyten. Der knob dient als Plattform für das Zytoadhäsionsprotein PfEMP1 und besteht aus Proteinen wie KAHRP, Aktin und Spektrin (Helms et al., 2016).

Eine weitere wichtige Funktion der *knobs* ist ihre Rolle als Plattform für die PfEMP1-Proteine, die zu den Adhäsionsmolekülen von *P. falciparum* gehören (Rug et al., 2006; Wickham et al., 2001). Ein wichtiger Bestandteil der *knobs* ist das knob-assoziierte histidinreiche Protein (KAHRP) (Crabb et al., 1997; Taylor et al., 1987). Das KAHRP

assoziiert mit Proteinen des erythrozytären Zytoskeletts, wie Spektrin und Aktin, sowie mit dem *PfEMP1* (Magowan et al., 2000; Oh et al., 2000; Pei et al., 2005; Waller et al., 1999).

1.6 Relevante humane Endothelrezeptoren

In dieser Arbeit wurde die Bindungseigenschaft von *P. falciparum* gegenüber verschiedenen humanen Endothelrezeptoren charakterisiert. Dafür wurden folgende Rezeptoren verwendet: CD36, ICAM-1, CD55, TNFR1, TNFR2, MDR1, VCAM-1, EPCR-K1, CD37, CD9 und CD81

1.6.1 CD36

Cluster of Differentiation (CD36) ist ein glykosyliertes Transmembranprotein, das zur Familie der Klasse-B-Scavenger-Rezeptor gehört. Dieser Rezeptor kommt auf Thrombozyten, Immunzellen, Adipozyten, Myozyten, Enterozyten, retinalen und mammären Epithelzellen sowie mikrovaskulären Endothelzellen vor. CD36 ist ein Rezeptor, das mit verschiedenen Liganden wie Thrombospondin-1, langkettigen Fettsäuren, Kollagenen, anionische Phospholipide, Sichelerythrozyten und weiteren Molekülen interagiert (Febbraio et al., 2001). Zudem spielt dieser Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Zytoadhäsion, die durch *P. falciparum* verursacht wird, da um die 75 % der *PfEMP1*-Proteine eine Bindungsdomäne zu CD36 besitzen. Bei der Bindungsdomäne handelt es sich dabei, um CIDR α 2-6-Domäne. (Bachmann et al., 2022). Die Bindung von *P. falciparum* an CD36 wird häufig mit einer milden Infektion in Verbindung gebracht.

1.6.2 ICAM-1

Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) ist ein Transmembran-Glykoprotein bestehend aus einer Immunoglobuline-ähnlichen Domänen, das zur Immunoglobulin-Familie gehört. ICAM-1 wird in geringen Mengen auf der Zelloberfläche von Immunzellen, Monozyten, Lymphozyten, Epithel- und Endothelzellen exprimiert. Zudem spielt dieser Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, der intrazellulären Signaltransduktion, der T-Zell-vermittelten Immunabwehr und der Entzündungsreaktion. Außerdem beeinflusst ICAM-1 die Adhäsion und Migration von Leukozyten an Endothelzellen. Durch Endotoxine und Zytokine, wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und

Interleukin-1, kann bei einer Infektion die Expression von ICAM-1 hochreguliert werden (Armah et al., 2005; Lennartz et al., 2015; G. D. Turner et al., 1994; van de Stolpe & van der Saag, 1996).

1.6.3 VCAM-1

Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) ist ein Adhäsionsmolekül und gehört ebenso wie ICAM-1 der Immunoglobulin-Familie an. VCAM-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und den Entzündungsprozessen. Zudem kann die Expression von VCAM-1 ebenfalls durch TNF- α hochgeregt werden (Ohnishi & Kimura, 2001).

1.6.4 EPCR

Der Endothel-Protein-C-Rezeptor (EPCR) wird auf Endothelzellen in den meisten Geweben exprimiert und bindet das Protein C. Durch die Bindung von Protein C an EPCR wird der Ligand in ein aktiviertes Protein C (APC) umgewandelt, dass die Protease aktivierten Rezeptor 1 (PAR1) spaltet. Dies löst einen entzündungshemmenden und zellschützenden Effekt aus. Verschiedene CIDR α 1-Domäne wurden als Bindungspartner von EPCR identifiziert. EPCR-bindenden Domänen wurden aus Proben von Kindern mit schwerer und zerebraler Malaria isoliert, was darauf hindeutet, dass EPCR und CIDR α 1 eine zentrale Rolle bei der Pathogenese schwerer Malaria spielen (L. Turner et al., 2013).

1.6.5 CD9, CD37, CD55, CD81

Cluster of differentiation 9 (CD9), cluster of differentiation 37 (CD37), cluster of differentiation (CD55) und cluster of differentiation 81 (CD81) gehören zur Tetraspanin-Familie, die aus vier Transmembrandomänen besteht.

CD9 ist ein Membranprotein, das auf verschiedenen Zelltypen exprimiert wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Signaltransduktion und bei der Immunregulation (Brousseau et al., 2018). Die Bindung von iEs an CD9, könnte negative Folge für die transendotheliale Lymphozyten-Migration haben, das einen schweren Krankheitsverlauf von Malaria begünstigt (Barreiro et al., 2005).

CD37, ein Glykoprotein, wird hauptsächlich auf B-Zellen exprimiert und interagiert mit einer Vielzahl von Adhäsionsmolekülen, Wachstums- und Signalrezeptoren sowie anderen Tetraspaninen, die an der Organisation der Zellmembran, der Signaltransduktion, dem Überleben der Zelle und der Apoptose beteiligt sind (Caulier et al., 2024).

CD55 ist ebenfalls Membranprotein, das durch Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert ist. CD55 spielt eine entscheidende Rolle bei *P. falciparum*, da es die Adhäsion und das Eindringen der Merozoiten in die Erythrozyten erleichtert (Ruiz-Argüelles & Llorente, 2007).

CD81 wird auf der Plasmamembran von Hepatozyten exprimiert. Es handelt sich dabei um einen entscheidenden Eintrittsrezeptor für die Sporozoiten von *P. falciparum* (Steel et al., 2025).

1.6.6 TNFR1, TNFR2

Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) und tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) sind Membranproteine, die der TNF-Rezeptor-Superfamilie angehören. Sie besitzen eine cysteinreiche Domäne auf ihrer extrazellulären Seite. Das Zytokin TNF- α bindet an diese Rezeptoren und vermittelt Signale für Entzündungen, Apoptose oder Zellüberleben (MacEwan, 2002).

1.6.7 MDR-1

Das multidrug resistance protein 1 (MDR1) ist ein ATP-abhängiger Transmembrantransporter, das für die Entgiftung von Geweben sowie für die Beteiligung der Resistenz von Tumorzellen gegenüber der Chemotherapie. In Immunzellen wird MDR1 exprimiert, das eine schützende Funktion gegenüber Xenobiotika und Toxine besitzt (Bossennec et al., 2018).

1.7 Bedeutung der Zytoadhäsion unter statischen und Flussbedingungen

Für die molekularen Mechanismen von Malaria sowie für die Effizienz der Zytoadhäsion zwischen den iEs und den Endothelzellen spielt das Strömungsverhältnis eine entscheidende Rolle. Die meisten *in vitro* Modelle simulieren eine statische Bindung

der iEs an die Endothelzellen. Dies führt zu einer schnelleren Adhäsion, aber stellt nicht die *in vivo* Bedingungen dar. Modelle unter dynamischen Flussbedingungen, wie mikrofluidische Systeme oder Flow-Assays, ermöglichen eine realitätsnahe Nachbildung der hämodynamischen Kräfte dar. Die Wechselwirkung zwischen iEs und Endothel werden durch mechanische Verformungen der Erythrozytenmembran und durch spezifische Bindungsdomänen moduliert, die unter Flussbedingungen aktiviert oder verstärkt werden. Zur detaillierten Analyse und Bestimmung der Adhäsionsmechanismen eignen sich insbesondere mikrofluidische Systeme und Flow-Assays, da sie den Einfluss von Flussgeschwindigkeiten und der Stärke der Scherkräfte auf die Zytoadhäsion nachvollziehbar machen. Die Ergebnisse aus den statischen und aus den dynamischen Systemen helfen bei der Entwicklung therapeutischer Ansätze (Kyes et al., 2007; Rask et al., 2010; Smith et al., 2013).

1.8 Motivation und Projektidee

Im Rahmen dieser Arbeit wird die *PfEMP1*-Variante IT4-*var67* untersucht. Ziel ist, die Bindungseigenschaften dieser Variante gegenüber verschiedenen humanen Endothelrezeptoren zu charakterisieren, die auf CHO-Zellen exprimiert werden. Dafür werden Bindungs-Assay unter statischen Bedingungen und unter physiologisch relevanten Flussbedingungen durchgeführt. Während die statischen Bindungs-Assay Informationen über mögliche Rezeptorbindungen liefern, ermöglichen Experimente unter Flussbedingungen eine genauere Analyse der Adhäsionsdynamik, bspw. hinsichtlich statischer oder rollender Bindung sowie des Einflusses von Scherkräften auf die Interaktion zwischen Parasiten und Wirtszellen.

Durch die Kombination dieser experimentellen Ansätze soll untersucht werden, an welche endothelialen Rezeptoren die *PfEMP1*-Variante IT4-*var67* bindet und welche Bindungseigenschaften⁵ dabei auftreten. Ein besseres Verständnis dieser Interaktion trägt dazu bei, die molekularen Mechanismen der Zytoadhäsion von *P. falciparum* weiter aufzuklären und langfristig zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze gegen schwere Malariaformen, wie *P. falciparum*, beizutragen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 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
Mirkoskop	EVOS XL	Thermo Scientific
pH-Meter	CG840	Satorius AG
Photometer	NanaDrop 2000	Thermo Scientific
Sterile Werkbank	Class II BSC	ESCO Labculture
Thermomixer	5355R	Eppendorf
Vortex Mixer	VF2	Janke & Kunkel
Waage	BP210S	Satorius
Wasserbad	SW20	Julabo
Zentrifuge	5427 R	Eppendorf
Zentrifuge	5415 D	Eppendorf
Zählkammer		Marienfeld Superior

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste aller verwendeten Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
24-Well-Zellkulturplatte	Sarstedt
1,5 ml/2 ml <i>safe-lock</i> Reaktionsröhrchen	Thermo Scientific
Autoklavierbeutel	Amcor
Zellkulturflasche T25/T75 mit Filter im Deckel	Thermo Scientific
Deckgläschen 13 mm (Plastik)	Sarstedt
Konische Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml	Falcon
Descosept Pur	Dr. Schumacher
Filterpipette 10/20/200/10000 µl	Sarstedt
Milipore Stericup	Merck
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Scientific
Parafilm	Bemis
Petrischale	Sarstedt
Serologische Pipette 5/10/25 ml	Sarstedt
Sterile FACS-Röhrchen 5 ml	Falcon
Sterile Vakuumfilter	Merck
Spritze 20 ml	B. Braun
Spitzenfilter 0,2 µm	Sarstedt

2.1.3 Biologische und chemische Substanzen

Tabelle 3: Liste aller verwendeten chemischen und biologischen Reagenzien

Name	Hersteller
Aceton	Roth
Accutase (500 ml)	Pan-Biotech
Albumax	Life Technologies
Ampicillin	Roth
Biocoll Trennlösung	Biochrom
Bovine Adult Serum (BSA)	Biomol
Chlorform	Roth
Dako Fluoreszenz Mounting Medium	Dako
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
D- Sorbitol	Sigma
Ethanol	Merck
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma
Neomycin (G418)	Greiner Bio-One
Gentamicin	Ratiopharm
Giemsa Lösung	Merck
Glucose	Roth
Glutaraldehyd (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 Biosystem
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⁺	ThermoFischer
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies
Percoll (17-0891-02)	GE Healthcare
RNase Away Spray Bottle	Roth
RPML-1640 + L-Glutamin; + 25 mM HEPES: - NaH-CHO ₃	AppliChem
Trizol Reagenz	Life Technologies

2.1.4 Puffer, Medien und weitere Lösungen

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Medien und Lösungen

Für CHO-Zellkultur	
Zellkulturmedium (Komplettmedium, steril filtriert)	
Ham's F12 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES	500 ml
Fetal bovine serum (inaktiviert bei 56 °C für 45 Min.)	50 ml
Penicillin/Streptomycin Mix (100 x)	5 ml
Lagerung bei 4°C für 3 Wochen	

Gefrierlösung für CHO-Zellen

CHO-Zellkulturmedium (Komplettmedium: Ham's F12)	45 ml
--	-------

DMSO (10 %, steril)	5 ml
---------------------	------

Vortexen

Sterilfiltration

Lagerung bei RT

Lagerung bei 4 °C

10 x PBS für die CHO-Zellkultur, autoklaviert

NaCl	80 g, 1,37 M
------	--------------

KCl	2 g, 27 mM
-----	------------

Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	14,4 g, 100 mM
---	----------------

KH ₂ PO ₄	2,4 g, 18 mM
---------------------------------	--------------

auffüllen mit dH ₂ O	1 l
---------------------------------	-----

autoklavieren

Lagern bei RT

1 x PBS für die CHO-Zellkultur

CHO-PBS (10 x)	100 ml
----------------	--------

auffüllen mit dH ₂ O	900 ml
---------------------------------	--------

autoklavieren

Lagerung bei RT

***P. falciparum*-Kultur**

**RPPI mit Albumax (Kultivierungsmedium), steril
filtriert**

RPPI 1640	16,4 g/l
-----------	----------

Hypoxanthine	0,05 g/l
NaHCO ₃	30 ml/l
Gentamicin (40 mg/ml)	250 µl
pH-Wert Einstellung mit NaOH	7,2
auffüllen mit dH ₂ O	1 l
Sterilfiltration	0,2 µm

Bindungsmedium (BM), steril filtriert

RPMI 1640	16,4 g
D-Glucose	20 g
auffüllen mit dH ₂ O	1 l
pH-Wert Einstellung mit NaOH	7,2
Sterilfiltration	0,2 µm
Lagerung bei 4 °C für 2 Wochen	

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

D-Sorbitol	5 g
Lösen in dH ₂ O	100 ml
Sterilfiltration	0,2 µm
Lagerung bei 4 °C	

Gefrierlösung (*malaria freezing solution* (MFS)), steril filtriert

D-Sorbitol	3 g
NaCl	0,65 g
Glycerol (autoklaviert)	72 ml
Lösen in dH ₂ O	28 ml

Sterilfiltration	0,2 µm
Lagerung bei 4 °C	16,4 g

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

NaCl	35 g
Lösen in dH ₂ O	1 l
Sterilfiltration	0,2 µm
Lagerung bei 4 °C	

Giemsalösung (10 %)

Giemsa	10 ml
Lösen in dH ₂ O	90 ml
Lagerung bei RT für max. 2 Tage	7,2

Medium für *knob-Enrichment*

RPMI 1640	16,4 g
Auffüllen mit dH ₂ O	1 l

**Gelatinelösung (1 %) für *knob-Enrichment*, steril
filtriert**

175 Bloom Gelatinepulver	1 g
Lösen in <i>P. falciparum</i> Kulturmedium	100 ml
Rühren bei 37 °C	
Sterilfiltration	0,22 µm
Lagerung bei 4 °C	

Weiser Buffer

Na ₂ HPO ₄	2,09 g
KH ₂ PO ₄	0,49 g

2.1.5 Verwendete Zelllinie

Zur Expression verschiedener humaner Endothelzellen wurden CHO-745 Zellen verwendet. Bei den CHO-745 Zellen handelt es sich um eine glykosaminoglykan-negativ mutierte CHO-Zelllinie, die durch einen Fehler in der Glykosaminoglykanketten-Synthese den Chondroitin-4-Sulfat (CSA)-Rezeptor nicht an ihrer Oberfläche exprimieren und folglich nicht *P. falciparum* iEs binden (Brehmer, 2021).

Die CHO-745-Zellen wurden mit dem Plasmid pAc-GFP1-N1_Erxy bzw. pEGFP-N1_ERxy, das einen mit GFP fusionierten Endothelrezeptor exprimiert, transfiziert. Bei dem entstandenen Fusionsprotein bildet der Rezeptor den extrazellulären Anteil, während GFP den intrazellulären Anteil ausmacht und die extrazelluläre Domäne nicht beeinträchtigt. Die als Negativkontrolle verwendete CHO-GFP Zelllinie, exprimiert ausschließlich den intrazellulären Anteil (GFP) ohne die extrazelluläre Domäne und diente dazu zu zeigen, dass GFP keinen Einfluss auf die Bindung der iEs hat (Brehmer, 2021)

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in Tabelle 5 aufgelistet. Die Zelllinie CHO-K1-EPCR wurde von T. Lavstsen (Universität Kopenhagen) zur Verfügung gestellt und alle anderen Zelllinien von J. Brehmer (BNITM, AG Bruchhaus).

Tabelle 5: Liste aller verwendeten CHO-Rezeptoren

Name	Rezeptor	Vektor
CHO-GFP	-	pAc-GFP1-N1
CHO-CD36	CD36	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-MDR1	MDR1	pAc-GFP1-N1
CHO-K1-EPCR	EPCR	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

Als Parasit wurde das *P. falciparum*-Isolat IT4 bzw. die daraus generierte *var67*-Transfektante verwendet. Der IT4-Stamm wurde im August 1967 aus einem Patienten in Westafrika isoliert und anschließend in Kultur weitergeführt (Jensen & Trager, 1978).

2.1.6 Software

Tabelle 6: Liste der verwendeten Softwares

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

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

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

Die verwendeten *P. falciparum*-Parasiten des IT4-Isolats wurden gemäß den Standardkulturmethoden nach Trager und Jensen (1976) kultiviert. Die Parasiten wurden in 5 ml oder 10 ml Kultivierungsmedium, bestehend aus RPMI 1640 und Albumax, bei einem Hämatokritwert von 5% kultiviert. Die Inkubation fand bei 37°C in einem Gasgemisch von 5% CO₂, 1 % O₂ und 94 % N₂ statt.

Das Kultivierungsmedium wurde täglich gewechselt, um die Parasiten mit Nährstoffen zu versorgen. Zusätzlich wurde die Parasitämie und der Hämatokritwert, wenn nötig reguliert. Zur Regulierung des Hämatokritwertes wurden Erythrozyten der Blutgruppe 0+ genutzt. Zur Aufrechterhaltung der Selektion wurde den SLI-Transfektanten 40 µl G418 pro 5 ml hinzugegeben. Dabei bestand die Stammlösung aus 50 mg/ml G418 in sterilfiltriertem RPMI-Medium.

2.2.2 Auftauen von *P. falciparum*

Die in Kryoröhrchen konservierten Plasmodien wurden in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C aufgetaut. Nach dem vollständigen Auftauen wurden die Plasmodien vollständig in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Zusätzlich wurde in

derselben Menge tropfenweise vorgewärmte Malaria Thawing Solution (MTS) zugegeben. Diese Suspension wurde für 2 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 2 bis 3 ml MTS gewaschen. Danach wurde erneut für 2 min bei 300 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange durchgeführt, bis der Überstand klar war. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet wurde tropfenweise durch vorgewärmten Kultivierungsmedium gelöst.

Zum Schluss überführte man die Plasmodien-Kultur in eine kleine Petrischale und gab 250 µl Blut hinzu. Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurde das Kulturmedium täglich gewechselt. Sobald die Parasiten sich vermehrt, überführte man die Kultur in eine große Petrischale.

2.2.3 Einfrieren von *P. falciparum*

Zum Einfrieren der *P. falciparum*-Kultur wurden ausschließlich Parasiten in den Ringstadien verwendet, da die Parasiten nur in diesem Stadium den Gefrierprozess überleben. Zudem war eine Parasitämie von mindestens 5% nötig, um ein späteres Auftauen und Hochzüchten der Parasiten zu erleichtern.

Die Kultur wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet tropfenweise mit 1 ml Malaria Freezing Solution (MFS) versetzt. Zum Schluss wurde das Gemisch in vorbereitete Kryoröhrchen überführt und gelagert für eine spätere Nutzung bei -80 °C.

2.2.4 Giemsa-Färbung

Um die Parasitämie und das Entwicklungsstadium der Parasiten zu bestimmen, wurde ein Blutaussstrich mit 1 µl der Kultur auf einem Objektträger durchgeführt. Der Objektträger wurde kurz luftgetrocknet und danach für ungefähr 30 Sekunden in einen Behälter mit Methanol gestellt, um die Zellen zu fixieren. Anschließend wurde der Objektträger in einer 10 %igen Giemsa-Lösung für 10 Minuten gefärbt. Nach der zehnminütigen Färbung wurde die restliche Lösung von dem Präparat mit Wasser abgespült und erneut getrocknet. Zum Schluss wurde mithilfe eines Lichtmikroskops die Parasitämie bestimmt.

2.2.5 Synchronisierung der *P. falciparum*-Kultur mit D-Sorbitol

Für eine synchrone Plasmodien-Kultur wurde ca. 1-mal wöchentlich eine Ringsynchronisation der Kultur mittels D-Sorbitol durchgeführt. Dabei lysiert D-Sorbitol die Trophozoiten und Schizonten in der Kultur, sodass nur die Ringstadien überleben und weiter angereichert werden können.

Für die Sorbitol-Ring-Synchronisation wurde die Plasmodien-Kultur in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet wurde mit der fünffachen Menge vorgewärmter 5 %igen-D-Sorbitol-Lösung resuspendiert. Das gelöste Pellet wurde für 10 bis 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und zwischendurch einige Male invertiert für eine gleichmäßige Durchmischung.

Nach der Inkubation wurde die Suspension wieder bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Um zu gewährleisten, dass auch nur Ringe in dem Pellet enthalten sind, wurde gemäß 2.2.4 eine Kontrolle durchgeführt. Im Anschluss wurde das Pellet mit 5 ml vorgewärmten Kulturmedium gewaschen und wie zuvor erneut zentrifugiert.

Zum Schluss wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 10 ml vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde in eine Petrischale überführt und mit frischem Blut versetzt.

2.2.6 *Knob-enrichment* mittels Gelatine

Um alle Versuche ausschließlich mit infizierten Erythrozyten, die *knobs* auf der Membran besaßen durchzuführen, wurde ein *knob-enrichment* durchgeführt. Für das *knob-enrichment* wurde eine 1 %ige Gelatinelösung genutzt, wodurch die nicht infizierten Erythrozyten und die iEs ohne *knobs* in der Lösung schneller sanken.

Auch für diese Methode wurde zuerst die Kultur in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde RPMI entsprechend dem Volumen an Pellet hinzugegeben, sowie die vierfache Menge an 1 %ige Gelatine. Das Pellet wurde vorsichtig resuspendiert ohne Luftbläschen zu verursachen und anschließend für 20 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand, in dem sich die iEs mit den *knobs* befinden, in ein neues 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert.

Um sicherzustellen, dass das *knob-enrichment* erfolgreich war, wurde ein Blutausschlag angefertigt. Anschließend wurde das Pellet mit 10 ml frischem vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Petrischale überführt. Auch hier wurde für optimale Wachstumsbedingungen frisches 400 µl Blut hinzugegeben.

2.2.7 In-vitro-Kultivierung von CHO-Zellen

Zur Kultivierung von den CHO-Zellen wurden Gewebekulturflaschen genutzt, die eine luftdurchlässige Filterkappe im Deckel besitzen. Diese Zellkulturflaschen sind besonders geeignet für adhärenz-wachsende Zellen. Es wurden T25 und T75 Flaschen verwendet. In den T25 Flaschen wurde 5 ml Medium und in den T75 10 bis 15 ml Medium zur Kultivierung verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C bei einer CO₂-Konzentration von 5% inkubiert. Um die Konfluenz und Vitalität der CHO-Zellen am Boden der Gewebekulturflaschen zu überprüfen, wurde ein inverses Mikroskop genutzt. Ab einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen regelmäßig passagiert.

Für die Zellpassage wurde zuerst das verbrauchte Medium aspiriert und dann wurden die Zellen mit 5 ml beziehungsweise 7 ml vorgewärmten CHO-PBS (1 x) gewaschen. Zur Dissoziation der Zellen wurde 0,5 ml bzw. 1,5 ml Accutase (T25 bzw. T75) verwendet und für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Klopfen der Flaschen gegen einen Tisch vom Boden gelöst. Dies wurde dann mithilfe eines inversen Mikroskops überprüft. Falls die Zellen sich nicht gelöst hatten, wurden die Zellen für einige Minuten weiter inkubiert. Um die Accutase zu inaktivieren wurden die Zellen mit 5 ml beziehungsweise 15 ml frischen vorgewärmten Ham's F12-Medium resuspendiert. Zum Schluss wurde die Zellsuspension je nach ihrer Zelldichte in eine neue Zellkulturflasche überführt und weiter kultiviert.

Für die Selektion der transgenen CHO-Zelllinien wurde 100 µl Neomycin (Neomycin: 50 mg/ml; Endkonzentration: 0,98 mg/ml) pro 5 ml Medium hinzugegeben und zur Selektion von den CHO-K1-EPCR-Zellen wurde 25 µl Zeocin (Zeocin: 100 mg/ml; Endkonzentration 0,5 mg/ml) pro 5 ml verwendet.

2.2.8 Einfrieren von CHO-Zellen

Zum Einfrieren der CHO-Zellen mussten die Zellen zunächst wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben von dem Boden der Kulturflasche gelöst werden. Danach wurden die

Zellen mit 5 ml frischen vorgewärmten Ham's F12-Medium aufgenommen und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Diese Suspension wurde dann für 2 Minuten bei 300 g abzentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Das Zellpellet wurde in 3 ml CHO-Freezing-Lösung resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden dann bei - 80°C gelagert.

2.2.9 Auftauen von CHO-Zellen

Für das Auftauen der CHO-Zellen wurde das Kryoröhrchen ungefähr für 1 Minute ins Wasserbad bei 37 °C gestellt. Danach wurden die Zellen aus dem Kryoröhrchen in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 ml frischen Ham's F12-Medium resuspendiert, um Rückstände der Gefrierlösung zu verdünnen. Diese Zellsuspension wurde für 2 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet wurde mit frischen Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine T25 Zellkulturflasche überführt und wie unter Punkt 2.2.7 weiterkultiviert.

2.3 Methoden zur Expressionsanalyse

2.3.1 RNA-Isolation zur Transkriptionsanalyse

Um eine Transkriptionsanalyse durchzuführen, wurde eine RNA-Isolation vollzogen. Dafür ist eine Parasitämie von 5-10% im Ringstadium von Nöten. Zu Beginn wurde das TRIzol™-Reagenz in einem Wasserbad bei 37°C vorgewärmt, um eine effiziente Zelllyse zu gewährleisten.

Im ersten Schritt wurde eine Ringsynchronisation wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Die *Plasmodium*-Kultur wurde in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet wurde in 5 ml frischem Kultivierungsmedium resuspendiert. Die Suspension wurde erneut unter denselben Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand wieder vorsichtig entfernt.

Für die Zelllyse wurde dem Pellet nun die fünffache Pelletmenge an TRIzol™ zugegeben und für 10 Sekunden geschüttelt, um die Zellen zu lysieren. Die Zellsuspension

wurde bei 37°C für 5 Minuten inkubiert und anschließend bei -80 °C eingefroren, um die RNA vor einem Abbau von RNase zu schützen.

Am Tag der Isolation wurde TRIzol-Probe aufgetaut und in 1 ml RNase-freien Aliquots aufgeteilt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Aliquots 15 Sekunden lang stark geschüttelt und anschließend bei Raumtemperatur für 3 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifugen bei 12000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der RNA-haltige Überstand wurde anschließend in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß, das auf Eis stand, überführt. Dem Überstand wurde das gleiche Volumen an 70 %igem Ethanol zugegeben und vorsichtig einige Male invertiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte gemäß dem Protokoll der PureLink RNA mini Kits.

Die RNA wurde mit 25 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Abschließend wurde die Konzentration der isolierten RNA mithilfe eines NanoDrop bestimmt. Die Probe wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente dazu eine geringe Menge an DNA präzise zu vervielfältigen und anschließend zu analysieren. Diese Methode wurde durch die Arbeitsgruppe Bachmann am BNITM durchgeführt.

2.3.3 Trypsin-Assay

Um die proteolytische Aktivität in dem SLI-Transfektanten zu analysieren, wurde ein Trypsin-Assay durchgeführt. Die Parasitenkultur, die 20 bis 30 Stunden alte Trophozoiten enthielt, wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 500 µl reduziert, während das Zellpellet zweimal mit 10 ml PBS (pH 7,4, ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) gewaschen und anschließend in 500 µl resuspendiert wurde. Darauf folgte eine Trophozoiten-Anreicherung mittels Percoll-Gradienten, bei der der Percoll-Gradient mit den Konzentrationen 80 %, 60 % und 40 % in einem 2-ml-Eppendorf-Röhrchen geschichtet wurden. Auf den Percoll-Gradienten wurde das Zellpellet vorsichtig aufgegeben und bei höchster Zentrifugalkraft für 5 Minuten zentrifugiert. Der Trophozoiten-Anteil im Pellet wurde mit einer 1000-µl-

Pipette in kreisförmigen Bewegungen aufgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die Trophozoiten-Fraktion wurde zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und nach jedem Waschschrift für 5 Minuten bei maximaler Zentrifugalkraft sedimentiert.

Für die Trypsin-Verdauung wurde das Pellet in zwei Ansätze aufgeteilt. Eine Fraktion diente als Kontrollprobe und wurde ausschließlich mit PBS versetzt, während der zweite Ansatz mit Trypsin, das eine Endkonzentration von 125 µg/ml enthält, versetzt wurde. Beide Ansätze wurden bei 37 °C für 30 bis 45 Minuten inkubiert.

Durch Zugabe von Soybean Trypsin Inhibitor (STI 1 mg/ml, 1:50) und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die proteolytische Reaktion gestoppt. Anschließend erfolgte erneut ein Waschschrift mit PBS und eine Zugabe eines Proteaseinhibitor-Cocktails bestehend aus STI, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 100 mM), sowie einem *protease inhibitor cocktail* (PIC). Die zugesetzte Menge wurde an das Volumen des verwendeten Lysepuffers angepasst. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden die Proben mit Lysepuffer versetzt und gut vermengt. Die Lysate wurden entweder weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

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

2.4 Methoden zur Analyse des Bindungsverhaltens

2.4.1 Panning-Verfahren

Das Panning-Verfahren diente der selektiven Anreicherung von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten mit spezifischer Adhäsion an CHO-Zellen. Für dieses Verfahren wurde eine Parasitämie der *Plasmodium*-Kultur von 1 – 5 % und Parasiten im Trophozoitenstadium benötigt, die mittels Mikroskopie bestimmt wurde. Zudem wurde die Konfluenz der CHO-Zellen überprüft, das für dieses Verfahren bei ca. 70 % liegen sollte.

Die *Plasmodium*-Kultur wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig entfernt und mit dem Zellpellet gemäß Abschnitt 2.2.6 ein *knob-enrichment* durchgeführt.

Nach der Inkubation wurde der Überstand mit den *knobs* in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des

Überstandes wurde ein Blutausstrich durchgeführt, um sicherzustellen, dass die *knob*-Anreicherung erfolgreich war und man eine Parasitämie von mindestens 50 % erzielt hat. Danach wurde das Zellpellet mit 5 ml Bindungsmedium resuspendiert, um die Zellen zu waschen, und es wurde erneut wie zuvor zentrifugiert.

Währenddessen wurden die CHO-Zellen für die Bindung mit den Parasiten vorbereitet. Dafür wurde das Medium der CHO-Zellen entfernt und mit Bindungsmedium ersetzt. Diese wurden dann für 5 Minuten in den Inkubator gestellt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet mit 3 ml Bindungsmedium resuspendiert. Anschließend wurde das Bindungsmedium von den CHO-Zellen entfernt und die Suspension mit den Parasiten wurde über die CHO-Zellen gegeben.

Das Kulturgefäß wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und alle 15 Minuten vorsichtig in alle sechs Richtungen geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und die CHO-Zellen wurden 3- bis 5-mal mit Bindungsmedium gewaschen, um nicht gebundene infizierte Erythrozyten zu entfernen. Anschließend wurden eine Kontrolle und Dokumentation mittels Mikroskopie durchgeführt. Im letzten Schritt wurde der Gewebekulturflasche 3 ml frisches vorgewärmtes Kultivierungsmedium und 100 µl Blut 0+ hinzugegeben. Zum Schluss wurde die Flasche in eine Plasmodien-Kulturbox gegeben und mit einem Gasgemisch von 5% CO₂, 1 % O₂ und 94 % N₂ begast.

2.4.2 Ernte der Ringform

Das Kulturgefäß aus dem Panning-Verfahren (siehe 2.4.1) wurde geerntet. Dafür wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 7 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Zusätzlich wurde ein weiteres Zentrifugenröhrchen mit 7 ml Biocoll-Lösung vorbereitet. Die Zellsuspension wurde dann auf die Biocoll-Lösung vorsichtig pipettiert, sodass man zwei klare Phasen erhält.

Anschließend wurde das Röhrchen für 20 Minuten bei 1300 g ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde erneut mit 7 ml Kulturmedium resuspendiert, um es erneut für 5 min bei 800 g zu zentrifugieren. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurde das Zellpellet mit 10 ml Kulturmedium und 400 µl Blut

resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine Petrischale überführt und unter Standardbedingungen weiterkultiviert.

2.4.3 Bindungs-Assay

Aussaat der CHO-Zellen 48 Stunden vor dem Versuch

Das Bindungs-Assay wurde zwei Tage zuvor vorbereitet. Dafür wurde zunächst sichergestellt, dass die Plasmodien-Kultur am Versuchstag aus Parasiten im Trophozoiten-Stadium bestand, indem ein Blutausstrich angefertigt wurde, sowie dass die CHO-Zellen eine Konfluenz von 90% aufwiesen.

Sind beide Kriterien erfüllt, so wurden die CHO-Zellen ausgesät. In die Wells einer 24-well-Platte wurden mit einer sterilen Pinzette sterile Plastik-Deckgläser reingelegt und je drei Wells der Platte wurden einem Rezeptor zugeordnet. Die CHO-Zellen, die maximal zwei Wochen in Kultur waren, wurden wie in 3.7 beschrieben von dem Boden der Kulturflaschen gelöst

Danach wurden die abgelösten Zellen mit 5 ml Ham's F12-Medium aufgenommen und bei 300 g für 4 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet wurde mit 3 ml Medium resuspendiert.

Um die Zellkonzentration zu bestimmen, wurde ein Zellzahlgerät verwendet. Die Zellsuspension wurde resuspendiert und 10 µl in eine NanoEntek-Zählkammer pipettiert. Mittels Zellzählgerät wurde dann die Zellkonzentration bestimmt. Die Zellen wurden mit Medium auf eine Zielkonzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt und anschließend wurden 0,5 ml der Zellsuspension in die Wells gegeben. Nach dem Pipettieren der CHO-Zellen wurde mithilfe einer Pipettenspitze das Deckgläschen heruntergedrückt, um Luftblasen zu vermeiden. Für eine homogene Verteilung der Zellen wurde die Well-Platte vorsichtig in alle Richtungen gedreht und im Anschluss bei 37 °C inkubiert. Ein Tag vor dem Hauptversuch wurde das Medium der Wells durch frisches Medium ersetzt.

Tag des Bindungs-Assay

Am Versuchstag wurde zu Beginn kontrolliert, ob die Zellen in den Wells eine Konfluenz von mindestens 80% hatten. Dann erfolgte ein *knob*-Enrichment wie unter Punkt 3.6 beschrieben. Zusätzlich wurde auch hier mit 1 µl des Pellet von der *knob*-Anreicherung ein Blutausstrich durchgeführt und die Parasitämie bestimmt. Anschließend wurde mit 2 ml Bindungsmedium das Pellet resuspendiert. Um die Konzentration der Parasiten zu bestimmen, wurde eine Zellzählung mit einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Dafür wurde 10 µl einer 1:100 Verdünnung in die Zählkammer pipettiert. Die Parasitämie wurde mit der Konzentration der Zellen verrechnet, um die iEs/ml in der Suspension zu bestimmen. Anschließend wurde die Suspension so verdünnt, dass man eine Zielkonzentration von $2 \cdot 10^6$ iEs/ml erhält.

Das Medium der CHO-Zellen aus der 24-well-Platte wurde entfernt, gegen 0,5 ml Bindungsmedium ausgetauscht und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Bindungsmedium mit jeweils 0,5 ml der Parasitensuspension ausgetauscht. Die Platte wurde in alle Richtungen geschwenkt und für 75 Minuten bei 37 °C inkubiert. Alle 15 Minuten wurde die Platte herausgeholt und leicht in alle Richtungen geschwenkt, um eine homogen verteilte Bindung der Parasiten an die CHO-Zellen zu gewährleisten.

Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen gewaschen. Dafür wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette vorsichtig entnommen und dreimal in ein Becherglas mit Bindungsmedium getunkt, an einem Tuch vorsichtig abgetropft, dann in ein weiteres Becherglas mit Bindungsmedium eingetaucht und erneut abgetropft. Als nächstes wurden die Deckgläser mit der Oberseite nach unten in eine neue 24-well-Platte gelegt. Die Platte enthielt 0,6 ml Bindungsmedium und wurde in einem 45° Winkel aufgestellt. Die Deckgläser wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Fixieren der Zellen wurde eine weitere 24-well-Platte verwendet, die 0,5 ml 1 %iges Glutaraldehyd in 1 x PBS enthielt, verwendet. Die *coverslips* wurden mit ihrer Oberseite nach oben in die Platte gelegt und wurden ebenfalls bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Um die *coverslips* zu färben, wurde in eine neue 24-well-Platte 0,3 ml einer filtrierten 10 %igen GiemsaLösung in 1 x PBS dazugegeben. Die Deckgläser wurden für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann in destilliertem Wasser gründlich gewaschen.

Nach dem Waschen wurden die *coverslips* auf ein Tuch zum Trocknen gelegt. Nach der Trocknung wurden je drei Deckgläser mit ihrer Oberseite nach unten auf einen Objektträger mit einem Tropfen CV-Mount (Leica) befestigt.

2.4.4 Bindungs-Assay unter Flussbedingungen

Aussaat der CHO-Zellen 48 Stunden zuvor

Auch für das Bindungs-Assay unter Flussbedingungen wurde zwei Tage zuvor das Experiment vorbereitet. Wie auch bei dem statischen Bindungs-Assay wurde die CHO-Zellen dissoziiert und mithilfe eines Zählgeräts die Zellkonzentration bestimmt. Die CHO-Zellen wurden danach auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/200 µl verdünnt. Anschließend wurden 200 µl der Suspension in die µ-Slide (0.8 Luer) pipettiert und bei 37 °C inkubiert.

Ein Tag vor dem Versuchstag wurde das alte Medium aus der Flusskammer gegen frisches Ham's F12-Medium ausgetauscht und bis zum Versuchstag weiter bei 37 °C inkubiert.

Tag des Bindungs-Assays unter Flussbedingungen

Im ersten Schritt wurde die Fluidikeinheit (Ibidi) gemäß den Herstellerangaben vorbereitet. Um das System zu kalibrieren wurde 12 ml Bindungsmedium in beide Behälter der Fluidikeinheit injiziert. Dabei war zu beachten, dass der Flüssigkeitsstand in beiden Behältern gleich hoch war. Damit man die störenden Luftbläschen in den Schläuchen loswird, wurde für 5 Minuten das Programm „*remove air bubbles*“ gestartet. Mit diesem Programm wurden nicht nur die Luftblasen entfernt, sondern zeitgleich auch die CHO-Zellen gewaschen.

Die verwendeten Parasiten müssen mindestens eine Parasitämie von 5 % aufweisen und im Trophozoitenstadium sein. Mit den Parasiten wurde, wie unter Punkt 3.6 beschrieben, ein *knoB-enrichment* durchgeführt, um sicherzustellen, dass man nur mit Trophozoiten arbeitet. Nach der Anreicherung wurde ein Blutaussstrich angefertigt und die Parasitämie bestimmt. Zusätzlich wurde aus dem *knoB* eine 1:100 Verdünnung gemacht und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Im Anschluss wurden die Parasiten so vorbereitet, dass man eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ iEs/ml hat, indem die Zellen mit Bindungsmedium verdünnt wurden. Als nächstes wurde das System, das die Flusskammer und das Mikroskop enthält, aufgebaut. Die Haube, unter der das Experiment stattfindet, wurde auf 37 °C aufgeheizt. Die μ -Slide, die die CHO-Zellen enthält, wurde so platziert, dass unter dem Mikroskop (EVOS FL Auto) eine zusammenhängende Fläche zu sehen ist. Sobald alles aufgebaut wurde, wurden die Parasiten in die Fluidikeinheit übertragen. Das Mikroskop macht alle 3 Sekunden ein Bild und zeitgleich wurde das Programm für die Pumpensteuerungssoftware gestartet.

Aufbau des Experiments

In Abbildung 7 ist der Versuchsaufbau des Bindungs-Assay unter Flussbedingungen zu sehen.

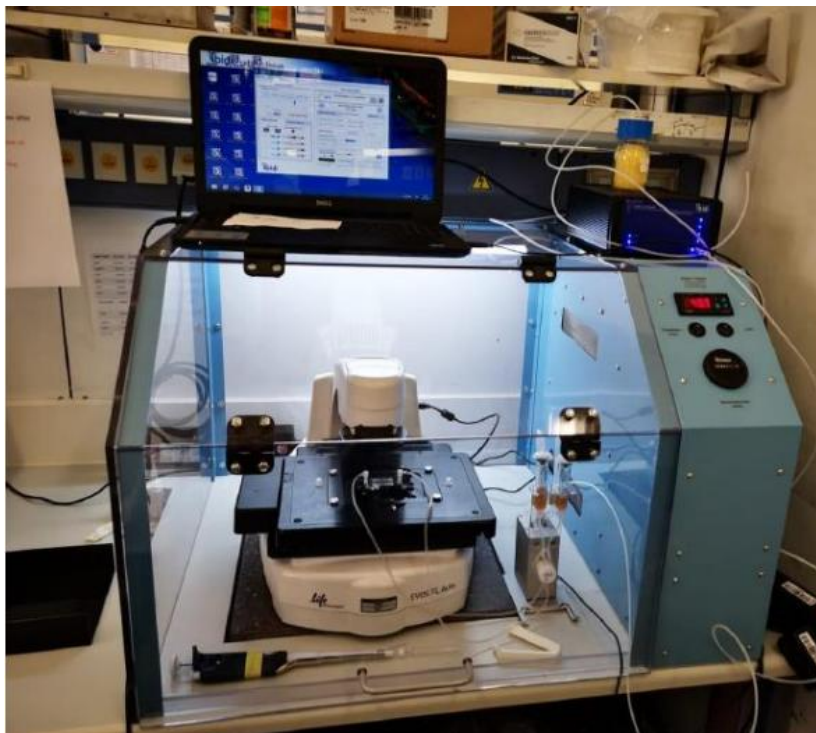


Abbildung 8: Allgemeiner Aufbau des Bindungs-Assay unter Flussbedingungen.

Das Mikroskop wurde in einer Haube platziert, in der die Temperatur je nach experimentellen Anforderungen reguliert werden konnte. Die Fluidikeinheit wurde für eine konstante Temperatur von 37 °C unter die Haube positioniert. Die Pumpe befand sich oben rechts im Bild, während der Laptop mit der Pumpensteuerungssoftware oben links platziert war.

Durch die Verwendung des Ibidi Pumpensystem wurde eine laminare Strömung mit unterschiedlichen Flussraten erzeugt. Die Flussrate ist proportional zu dem Scherstress, das in dyn/cm^2 gemessen wird. Die verschiedenen Scherstressraten wurden

durch das Pumpensteuerungssoftware programmiert und sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Bewegung und Adhäsion der iEs an dem interessierenden Rezeptor wurde durch die R-Software „trackdem“ verfolgt.

Tabelle 7: Parameter für den Bindungs-Assay unter Flussbedingungen

Scherkraft [dyn/cm²]	Zeit [min]
6	10
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

3. Ergebnisse

3.1 PCR-Analyse von IT4-*var67* zur Genotypbestimmung

Das PCR-Verfahren des *var67*-Gens diente einerseits dem Genotyp-Nachweis innerhalb der Parasitenlinie und andererseits der Überprüfung, ob das durchgeführte Panning-Verfahren eine Veränderung in der Zusammensetzung der *var*-Genpopulation bewirkte. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der PCR dargestellt.

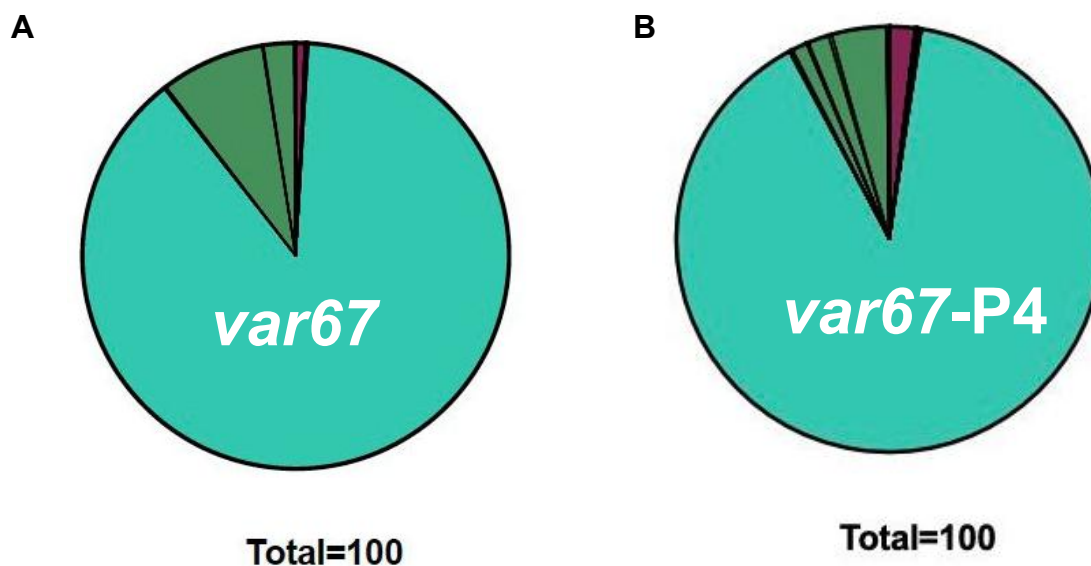


Abbildung 9: Ergebnisse der PCR von *var67* und *var67*-P4.

Dargestellt sind zwei Kreisdiagramme (A und B) mit jeweils insgesamt 100 % (Total = 100), die die Ergebnisse einer PCR-Analyse der Variante IT4-*var67* (A) und IT4-*var67*-P4 (B) zeigen. In Türkis sind *var67* bzw. *var67*-P4 dargestellt, während andere *var*-Gene in unterschiedlichen Farben sichtbar sind.

Abbildung 9 (A) zeigt, dass die in dieser Arbeit untersuchten Parasitenkultur überwiegend die IT4-*var67*-Variante exprimiert. Zwar sind auch andere *var*-Genvarianten nachweisbar, jedoch ist deren Anteil sehr gering. Zudem zeigt sich anhand von Abbildung 9 (B), dass das durchgeführte Panning-Verfahren zu keiner Veränderung der *var*-Genexpression führte. Somit ist die Dominanz der *var67*-Variante auch nach dem Panning-Verfahren weiterhin nachweisbar.

3.2 Statischer Bindungs-Assay mit IT4-*var67*

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaft von *var67* wurde ein statischer Bindungs-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die transgenen CHO-745-Zellen, die den jeweiligen Endothelrezeptor exprimieren, in eine 24-*well* Platte mit Deckgläschen

ausgesät. Für die ersten Testungen wurde das Bindungs-Assay mit den Rezeptoren CD36, ICAM-1 und GFP als Negativkontrolle durchgeführt. Nach einer zweitägigen Inkubation waren die Zellen konfluent gewachsen und die iEs, mit denen ein *knob-enrichment* durchgeführt wurde, wurden auf die CHO-Zellen gegeben. Diese wurden anschließend koinkubiert. Im nächsten Schritt wurden die nicht gebundenen iEs von den Deckgläschen abgewaschen, um die Zellen anschließend zu fixieren und zu färben. Nach der Färbung erfolgte eine mikroskopische Auswertung.

In jedem Durchlauf wurden drei Replikate durchgeführt. Von jedem einzelnen Replikat wurden jeweils 10 Bilder mikroskopisch aufgenommen, sodass von jedem Rezeptor pro Durchlauf 30 Bilder analysiert wurden. Für eine aussagekräftige Analyse der Ergebnisse wurde das Experiment dreimal durchgeführt. In Abbildung 10 sind repräsentative Mikroskopaufnahmen der Bindungsstudie dargestellt.

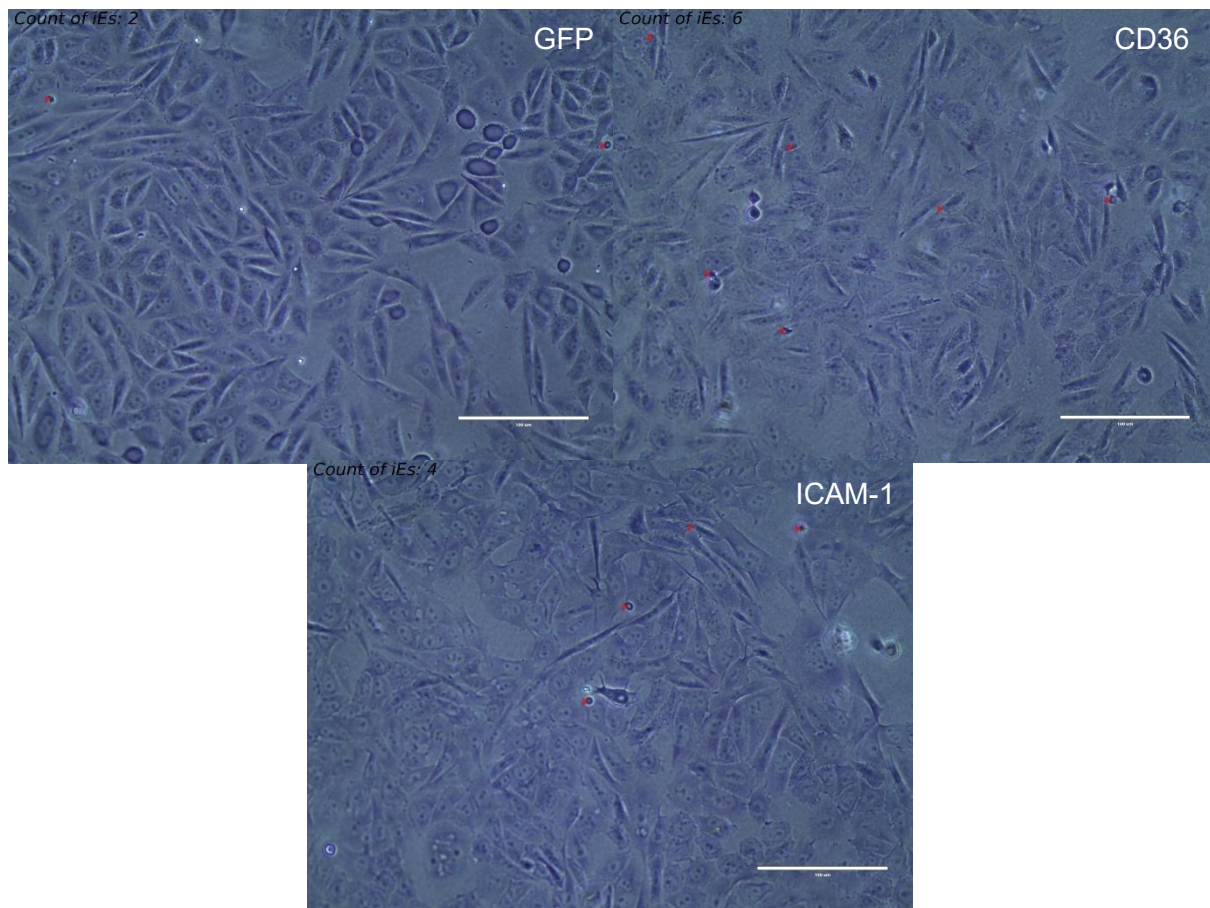


Abbildung 10: Beispielhafte Mikroskopiebilder für CHO-Zelllinien, die verschiedene menschliche Endotherezeptoren exprimieren, sowie daran gebundene iEs.

Zusehen sind die gebundenen iEs (rote Punkte) an den Rezeptoren GFP, CD36 und ICAM-1. GFP ist dabei die Negativkontrolle. Oben links in jedem Bild ist die Anzahl der gebundenen iEs zu sehen.

Es ist erkennbar, dass nahezu keine iEs an GFP gebunden haben, während bei CD36 und ICAM-1 eine Bindung der iEs vorhanden ist. Die aufgenommenen Bilder wurden quantifiziert, indem die Anzahl der infizierten Erythrozyten, die an den jeweiligen CHO-Zellen gebunden haben, ausgezählt wurden. Mit diesen Werten wurde anschließend ein Balkendiagramm erstellt, um die Bindung genauer zu betrachten. Dieses Diagramm ist in Abbildung 11 dargestellt.

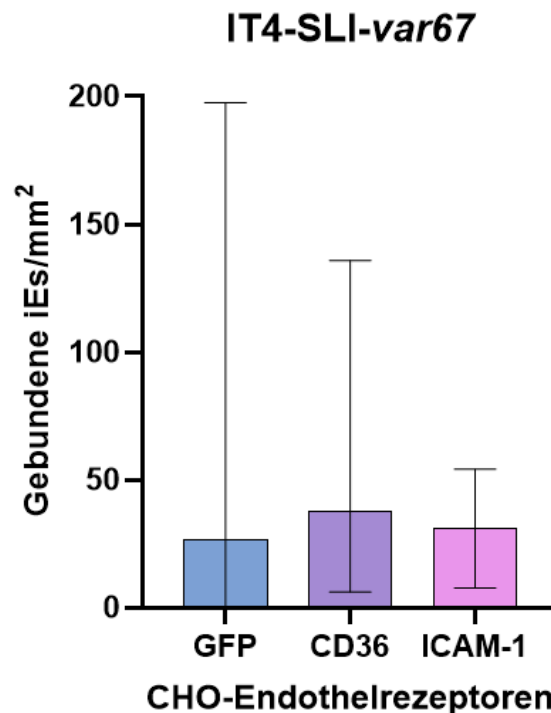


Abbildung 11: Bindung von IT4-SLI-*var67*-iEs an CHO-Zellen mit unterschiedlichen Endothelrezeptoren.

Die humanen Endothelrezeptoren wurden auf der Oberfläche transgener CHO-745-Zellen exprimiert. Für jeden Ansatz wurden drei Replikate durchgeführt. Von jedem Replikat wurden jeweils 10 Mikroskopaufnahmen an unterschiedlichen Positionen aufgenommen. Die Grafik zeigt die Anzahl gebundener iEs pro Quadratmillimeter (iEs/mm²) an CHO-Zellen, die unterschiedliche Rezeptoren exprimieren. Die Balken stellen die Mittelwerte einschließlich der Standardabweichung dar. CHO-GFP dient als Negativkontrolle, da diese Zellen keinen humanen Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer One-way-ANOVA im Vergleich zur Negativkontrolle.

Erwartet wurde, dass *var67* eine Bindung an den CHO-CD36-Zellen hat. Die *one-way* ANOVA zur Analyse von Gruppen mit einer unabhängigen Variable zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (GFP) und der CD36-Kultur, was die Erwartung bestätigt. CD36 wies einen Mittelwert von 38 (+/- 21) iEs/mm² auf und bindet somit signifikant stärker als GFP (27 (+/- 31) iEs/mm²). ICAM-1 zeigte zwar mit 31 (+/- 23) iEs/mm² einen höheren Mittelwert als GFP, dieser Unterschied war jedoch aufgrund der hohen Variabilität der Messwerte statistisch nicht signifikant. Insgesamt

liegt die Bindung an CD36 über der Negativkontrolle GFP, jedoch etwas niedriger als ursprünglich erwartet.

3.3 Panning IT4-*var67* über CHO-745-CD36

Aufgrund der geringen Bindungseigenschaft von *var67* an CD36 wurde ein Panning-Verfahren durchgeführt. Mit dem Panning-Verfahren (siehe 2.4.1) wurden die mit *PfEMP1*-Protein *var67* infizierten Erythrozyten auf die CHO-Zellen, die den Endothelrezeptor CD36 exprimieren, angereichert. Das Panning-Verfahren wurde für *var67* viermal durchgeführt, um eine hohe Anreicherung zu erzielen. Nach jedem Anreicherungsdurchlauf wurden mittels Mikroskop Bilder aufgenommen.

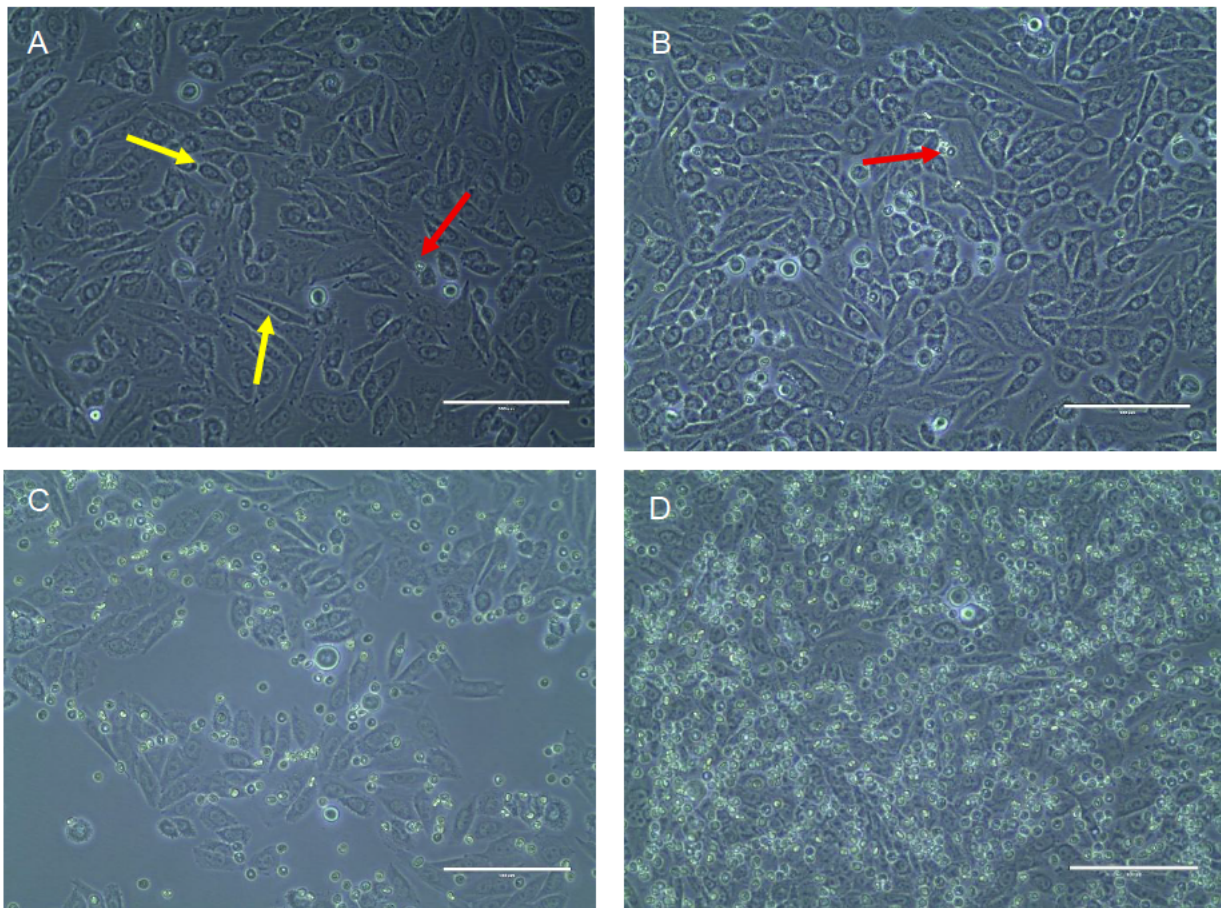


Abbildung 12: Selektive Anreicherung *var67*-exprimierender iEs über den CD36-Rezeptor durch serielles Panning auf CHO-Zellen.

Die Abbildung zeigt die schrittweise Anreicherung von *var67*-exprimierenden Parasiten durch vier aufeinanderfolgende Panning-Durchgänge auf CD36-exprimierenden CHO-Zellen. (A-D) repräsentieren die Panning-Runden 1 bis 4. In den frühen Runden (A, B) sind noch vergleichsweise wenig gebundene iEs sichtbar, während sich in den späteren Runden (C, D) eine deutliche Zunahme der Bindung zeigt. Die Roten Pfeile markieren infizierte Erythrozyten, die spezifisch an den CHO-CD36-Zellen gebunden sind. Die gelben Pfeile kennzeichnen die CHO-Zellen selbst.

In Abbildung 12 sind die Bilder aus dem Panning-Verfahren dargestellt. Wie in den Abbildungen (A) bis (D) zu sehen ist, liegen die CHO-Zellen als Monolayer vor und

bedecken die gesamte Oberfläche der Kulturflasche (gelbe Pfeile in Abbildung 12 (A)). Zudem sind auch kleinere bis ovale Formen zu sehen, die das Isolat IT4-*var*67 darstellen (rote Pfeile in Abbildung 12 (A) und (B)).

Über die einzelnen Panning-Runden zeigt sich eine deutliche Zunahme der an CHO-Zellen gebundenen infizierten Erythrozyten. Im ersten Panel (A) sind nur wenige infizierte Erythrozyten sichtbar, die an den CHO-Zellen gebunden haben. Der Monolayer der CHO-Zellen ist deutlich erkennbar. Im zweiten Panel (B) sind bereits mehr iEs zu erkennen. Auch hier ist die Zellmorphologie weiterhin klar erkennbar, während einige infizierte Erythrozyten verstreut vorliegen. Im dritten Panel (C) nimmt die Anzahl der iEs weiter zu. Der Großteil der Fläche im Bild ist von infizierten Erythrozyten bedeckt, die sich zwischen und auf den CHO-Zellen befinden. Dennoch sind die CHO-Zellen weiterhin sichtbar. Im letzten Panel (D) ist eine hohe Dichte an infizierten Erythrozyten zu beobachten. Die Zellschicht ist weiterhin erkennbar, jedoch in mehreren Bereichen von den infizierten Erythrozyten bedeckt.

Insgesamt ist festzustellen, dass über den Verlauf der Anreicherungsrounds von Panning 1 bis 4 eine Steigerung der Parasitenbindungen an CD36 zu erkennen ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Anreicherung über CHO-CD36 erfolgreich war.

3.4 Western-Blot-Analyse des Trypsin-Assays von *var67* und *var67*-P4

Zur Analyse der proteolytischen Aktivität von *var67* und *var67*-P4 wurde ein Trypsin-Assay durchgeführt. Nach dem Trypsinverdau wurden die resultierenden Proteinfragmente mittels Western Blot analysiert, um diese sichtbar zu machen und Rückschlüsse auf die Domänenstruktur des *PfEMP1* zu ziehen. In Abbildung 15 ist der Western Blot des Trypsin-Assays dargestellt.

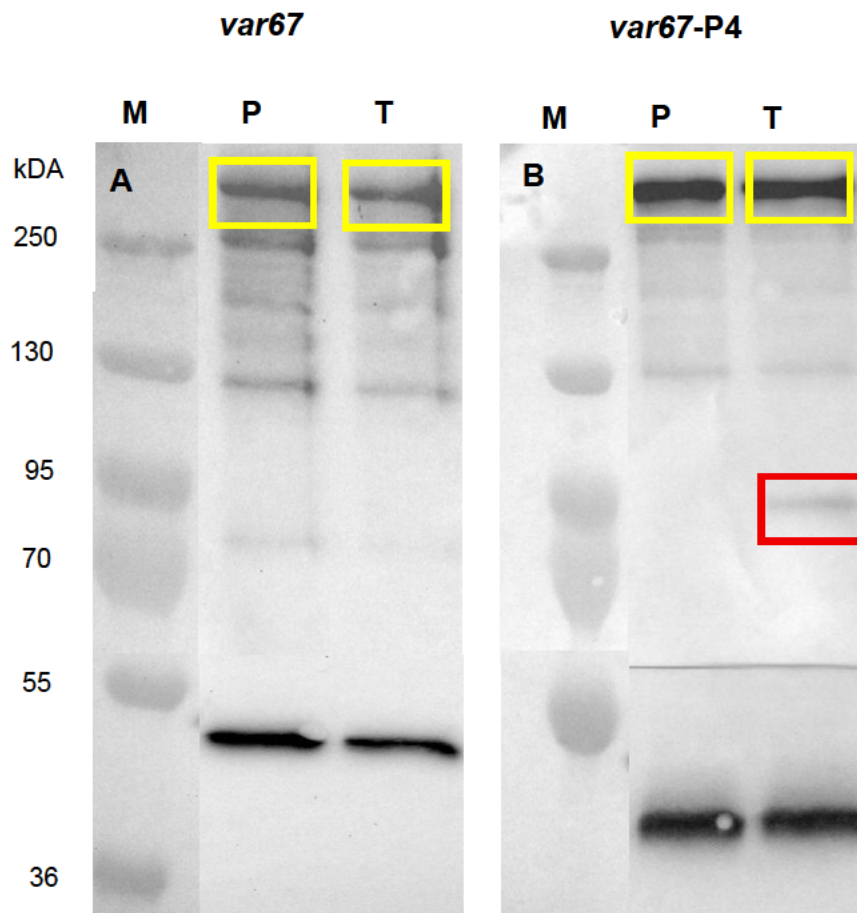


Abbildung 13: Nachweis der trypsinvermittelten Spaltung von *PfEMP1* in *var67*-exprimierenden iEs mittels Western Blot.

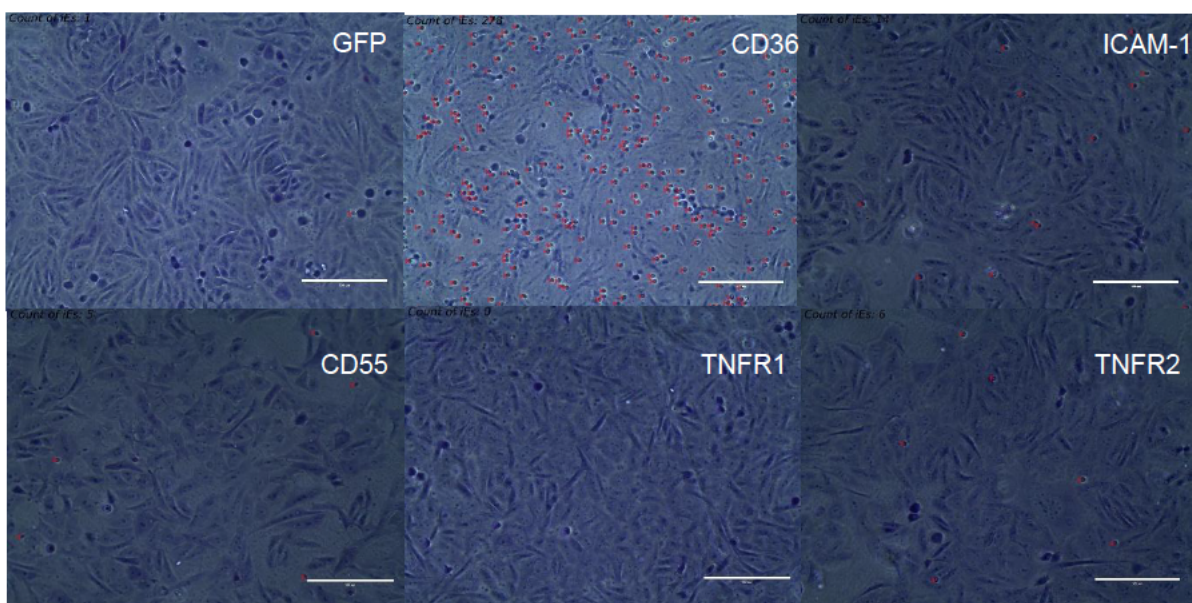
Western Blot nach Trypsinbehandlung von *var67* (A) und *var67*-P4 (B). P: PBS-Kontrolle, T: Trypsin, M: Marker. Die gelb markierten Banden zeigen das vollständige *PfEMP1*-Protein. Die rot markierte Bande entspricht dem intrazellulären Fragment von *PfEMP1*, das nach Trypsinverdau bestehen bleibt.

Der Trypsin-Assay wurde aufgrund von Zeitmangel von S. Ofori, BTA des BNITM, durchgeführt. In Abbildung 15 wird in Panel A der Trypsin-Assay von *var67* und in Panel B der Trypsin-Assay von *var67*-P4 dargestellt. In beiden Gelen sind jeweils ein Marker (M), die entsprechende Probe nach PBS-Behandlung (P) als Negativkontrolle und nach der Trypsinbehandlung (T) gezeigt.

In beiden Gelen sind bei etwa 300 kDa deutliche Banden sichtbar, die darauf hinweisen, dass beide Proben das *PfEMP1*-Molekül exprimieren (200 -350 kDa) (Baruch et al., 1995). Im Panel B ist bei der Probe P zusätzlich bei etwa 95-kDa eine schwache Bande zu erkennen. Diese entspricht dem intrazellulären Teil des *PfEMP1*-Moleküls, der nach dem Verdau des extrazellulären Anteils durch Trypsin verbleibt. Diese Bande ist in der ungepannten Probe (T) im Panel A nicht nachweisbar, obwohl das vollständige Protein (300 kDa) vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, dass das Molekül nicht oder nur unzureichend für Trypsin zugänglich war, was auf eine fehlende oder unzureichende Oberflächenexposition schließen lässt. In den Spuren P in Panel A und B erfolgte kein proteolytischer Verdau, sodass der extrazelluläre Anteil von *PfEMP1* erhalten bleibt und folglich kein 95-kDa Fragment nachweisbar ist.

3.5 Statischer Bindungs-Assay mit IT4-var67-P4

Im nächsten Schritt wurde der statische Bindungs-Assay mit dem gepannten *var67*-Isolat durchgeführt. Dafür wurden die Rezeptoren CD36, ICAM-1, CD55, TNFR1, TNFR2, MDR1, VCAM-1, K1-EPCR, CD37, CD9, CD81 und GFP als Negativkontrolle auf Bindungen getestet. Auch hier wurden bei jedem Assay je Rezeptor drei Replikate durchgeführt. Von jedem Replikat wurden 10 Bilder aufgenommen. In Abbildung 13 sind die mikroskopisch aufgenommenen Beispielbilder der einzelnen Rezeptoren dargestellt.



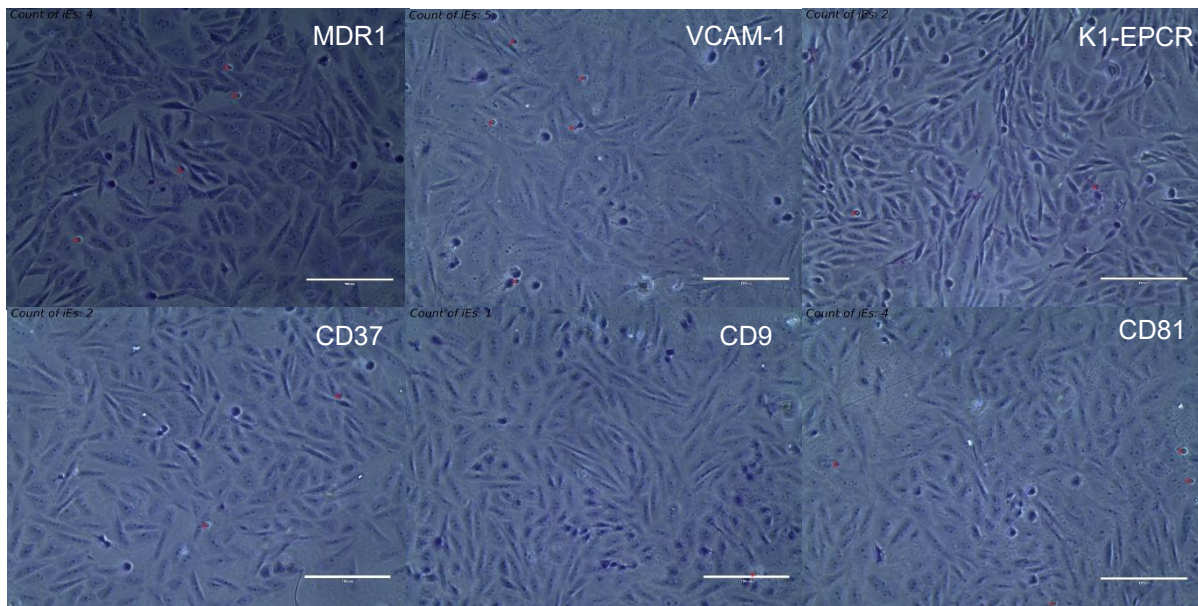


Abbildung 14: Beispielfotografien von CHO-Zelllinien, die verschiedene menschliche Endotherezeptoren exprimieren, sowie daran gebundene iEs.

Zusehen sind die gebundenen iEs (rote Punkte) an den Rezeptoren GFP, CD36, ICAM-1, CD55, TNFR1, TNFR2, MDR1, VCAM-1, K1-EPCR, CD37, CD9 und CD81. GFP ist dabei die Negativkontrolle. Oben Links in jedem Bild ist die Anzahl der gebundenen iEs zusehen.

Im Vergleich zu allen anderen Rezeptoren und der Negativkontrolle GFP zeigt *var67* eine starke Bindung an dem Rezeptor CD36, was in Abbildung 13 (rote Punkte) zu erkennen ist. Zur Veranschaulichung wurde die Anzahl der gebundenen iEs an die jeweiligen Rezeptoren bestimmt und diese in Abbildung 14 gegenübergestellt.

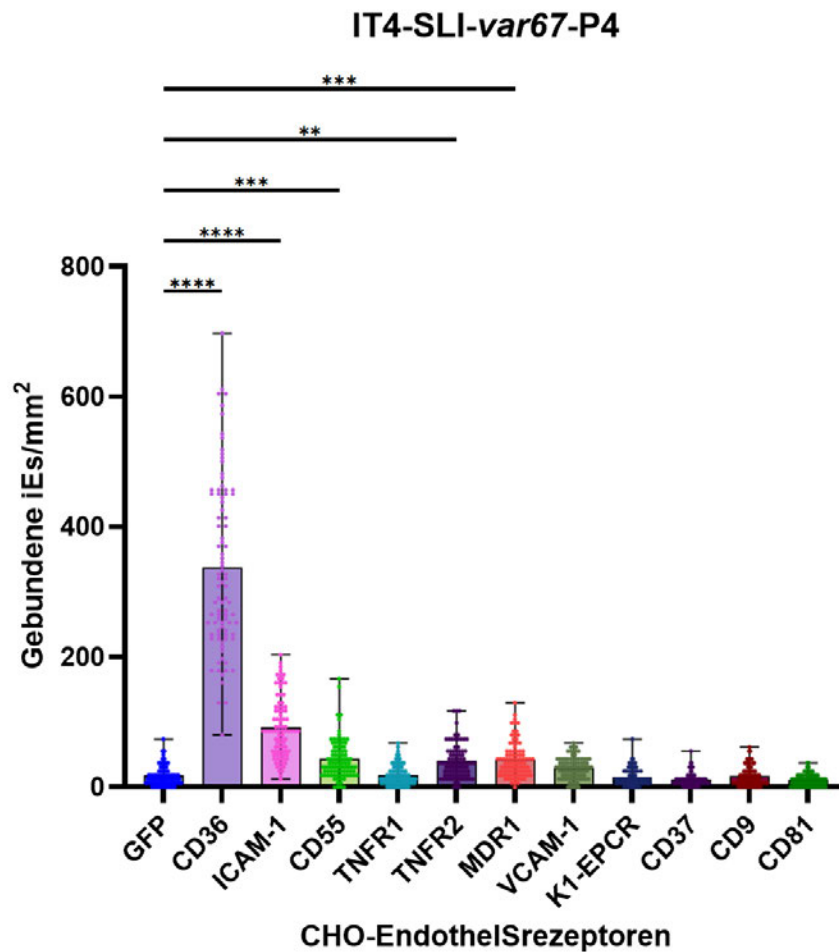


Abbildung 15: Breites Adhärenzprofil von IT4-SLI-*var67*-P4 iEs an verschiedenen CHO-Endothelrezeptoren.

Die Abbildung zeigt die Bindung von *var67*-P4-iEs an CHO-745-Zellen, die unterschiedliche humane Endothelrezeptoren exprimieren. Dargestellt ist die Anzahl gebundener iEs pro mm² (iEs/mm²) für verschiedene Rezeptoren (u. a. CD36, ICAM-1, CD55, TNFR1, TNFR2, MDR1, VCAM-1, K1-EPCR, CD37, CD9, CD81) sowie die Negativkontrolle GFP. Einzelne Messwerte sind als Punkte dargestellt, während die Balken die Mittelwerte mit Standardabweichung repräsentieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer gewöhnlichen One-way-ANOVA im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Signifikanzen sind in der Grafik angegeben (ns = $p > 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$).

Abbildung 14 zeigt, dass das *var67*-P4 eine hohe Bindung an CD36 hat mit 336 (+/- 130) iEs/mm² aufweist, was auch erwartet wurde, da das *PfEMP1* eine Bindungsdomäne für CD36 enthält (Bachmann et al., 2022). CD36 ist mit einer mittleren Differenz von 319 und einem P-Wert von $< 0,0001$ hochsignifikant. Neben CD36 hat *var67*-P4 auch eine signifikante Bindung an ICAM-1 mit 91 (+/- 46) iEs/mm². Zudem zeigten CD55, MDR1 und TNFR2 ebenfalls eine signifikante Bindung. Dabei zeigten CD55 mit 43 (+/- 30) iEs/mm² und MDR1 mit 42 (+/- 27) iEs/mm² eine höhere Signifikanz als TNFR2 (39 (+/- 26) iEs/mm²).

Die Rezeptoren TNFR1 (18 (+/- 15) iEs/ mm²), VCAM-1 (29 (+/- 16) iEs/ mm²), K1-EPCR (15 (+/- 13) iEs/ mm²), CD37 (11 (+/- 10) iEs/ mm²), CD9 (16 (+/- 15) iEs/ mm²) und CD81 (11 (+/- 9) iEs/ mm²) zeigen keinen signifikanten Unterschied und sind demzufolge keine möglichen Bindungspartner für *var67*.

3.6 Bindungs-Assay von IT4-*var67*-P4 unter Flussbedingungen

Zytoadhäsion ist der Mechanismus, bei dem durch *P. falciparum* infizierte Erythrozyten an humane Endothelzellen der Blutgefäße in verschiedenen Organen, wie dem Gehirn, der Plazenta oder der Lunge haften (Autino et al., 2012; Franke-Fayard et al., 2010) maßgeblich für den schweren Krankheitsverlauf von Malaria verantwortlich ist. Um diese Interaktion genau zu verstehen, wurden in dieser Arbeit CHO-Zellen, die humane Endothelrezeptoren exprimieren, verwendet (Wassmer et al., 2015).

Der statische Bindungs-Assay aus den vorherigen Versuchen zeigte das Bindungsverhältnis der *var67*-Variante gegenüber Endothelrezeptoren, stellte jedoch keine realitätsnahe Nachbildung der hämodynamischen Kräfte dar. Aus diesem Grund wurde die Bindungseigenschaft der infizierten Erythrozyten gegenüber dem Endothelrezeptor CD36, der auf CHO-Zellen exprimiert wird, analysiert.

Die infizierten Erythrozyten wurden unter definierten Scherkräften auf die transgenen CHO-Zellen mit dem CD36-Rezeptor gegeben. Das Ziel dieses Experiments war es, zu untersuchen, ob *var67*-P4 die gleichen Bindungseigenschaften wie im statischen Assay aufweist.

Bevor das Experiment durchgeführt wurde, wurde ebenfalls ein *knob-enrichment* mit den infizierten Erythrozyten vollzogen, um nur mit iEs zu arbeiten, die die knob-Struktur auf ihrer Oberfläche exprimieren. In jedem Experiment wurden $1 \cdot 10^7$ iEs verwendet und diese wurden für 10 Minuten unter Scherstressbedingungen (0,9 bis 8,5 dyn/cm²) analysiert. Diese Scherkräfte wurden ausgewählt, da diese Scherkräfte dem menschlichen Blutfluss entsprechen (Ballermann et al., 1998; Paszkowiak & Dardik, 2003). Das Mikroskop wurde auf eine zelldichte Stelle fokussiert und mithilfe der R-Software wurden alle drei Sekunden Bilder aufgenommen, um die Bewegung der iEs zu verfolgen.

Für die Negativkontrolle wurden die CHO-GFP-Zellen verwendet, die keinen Rezeptor exprimieren. Trotz verschiedener Scherkräfte konnte keine Bindung der infizierten Erythrozyten nachgewiesen werden.

Das Experiment mit *var67*-P4 wurde unter definierten Scherkräften auf CHO-Zellen mit dem Rezeptor CD36-Rezeptor durchgeführt. Für die Analyse wurden insgesamt zwei Durchläufe ausgewertet. In Abbildung 16 sind die mikroskopisch aufgenommenen Bilder der gebundenen iEs dargestellt.

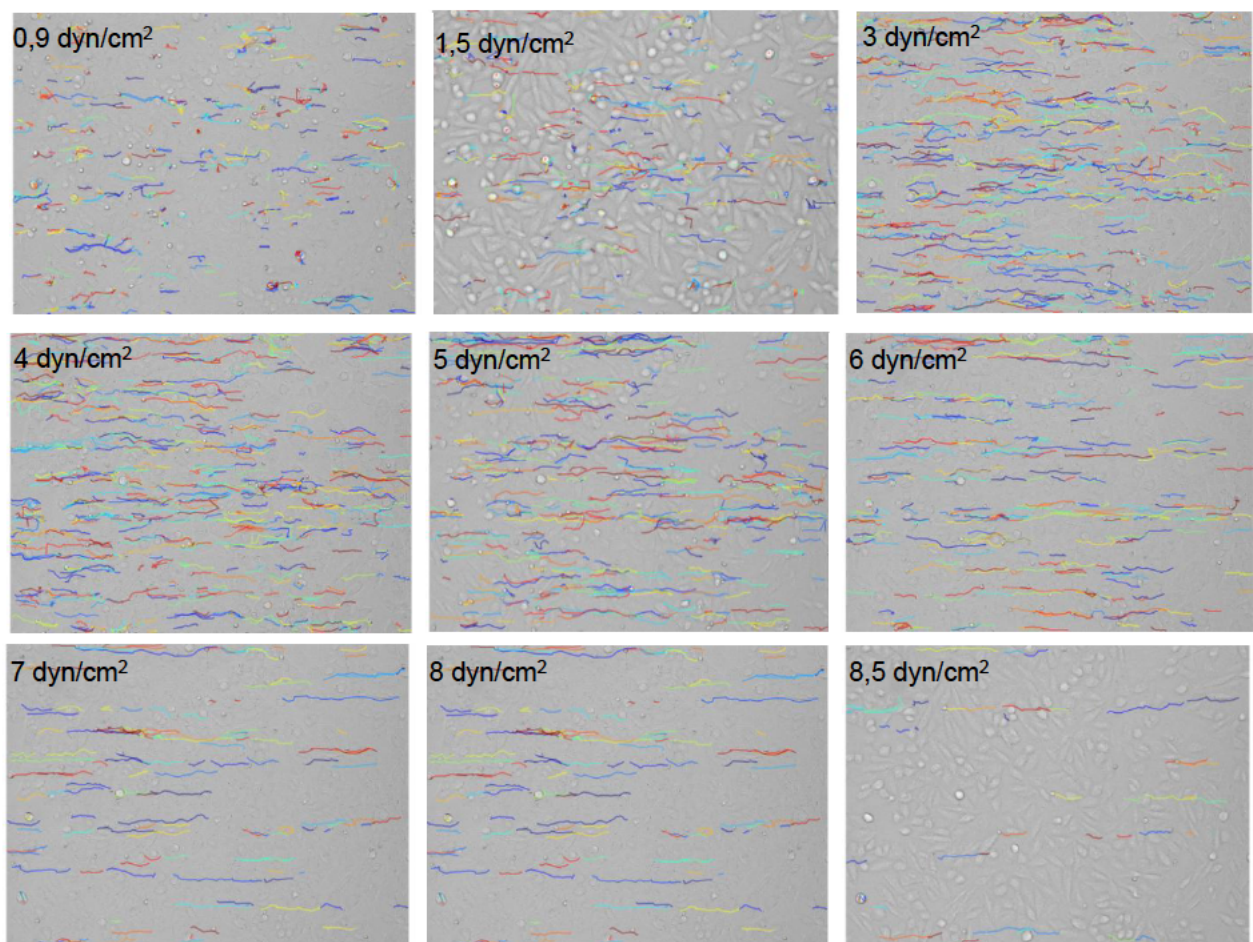


Abbildung 16: Analyse der Adhärenz von IT4-*var67*-P4 an CD36 unter Flussbedingungen.

Die iEs wurden mit unterschiedlichen Scherstresstärken (0,9, 1,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8,5 dyn/cm²) jeweils für 10 Minuten über die CHO-CD36-Zellen gepumpt. Ziel war es zu untersuchen, ob und wie effizient eine Bindung an CD36 unter Flussbedingungen stattfindet. Die Bewegungsbahn der iEs wurde mithilfe der R-Software trackdem analysiert. Für die Detektion der iEs wurde ein Schwellenwert von 0,1 sowie ein Pixelbereich von 30-500 festgelegt. Die Bildaufnahme erfolgte alle 3 Sekunden mit einem EVOS FL Auto Mikroskop.

Anhand der mikroskopischen Bilder (s. Abbildung 16) ist zu erkennen, dass die Parasiten der *var67*-P4-Variante auch unter Flussbedingungen in der Lage sind, eine Bindung an CD36 einzugehen. Im zuvor durchgeführten statischen Bindungs-Assay zeigte *var67*-P4 eine statische Bindung an CD36. Zusätzlich wurde unter

Flussbedingungen eine rollende Bindung von *var67*-P4 an CD36 beobachtet. In Abbildung 17 wurden die gebundenen iEs den verschiedenen Scherkräften gegenübergestellt.

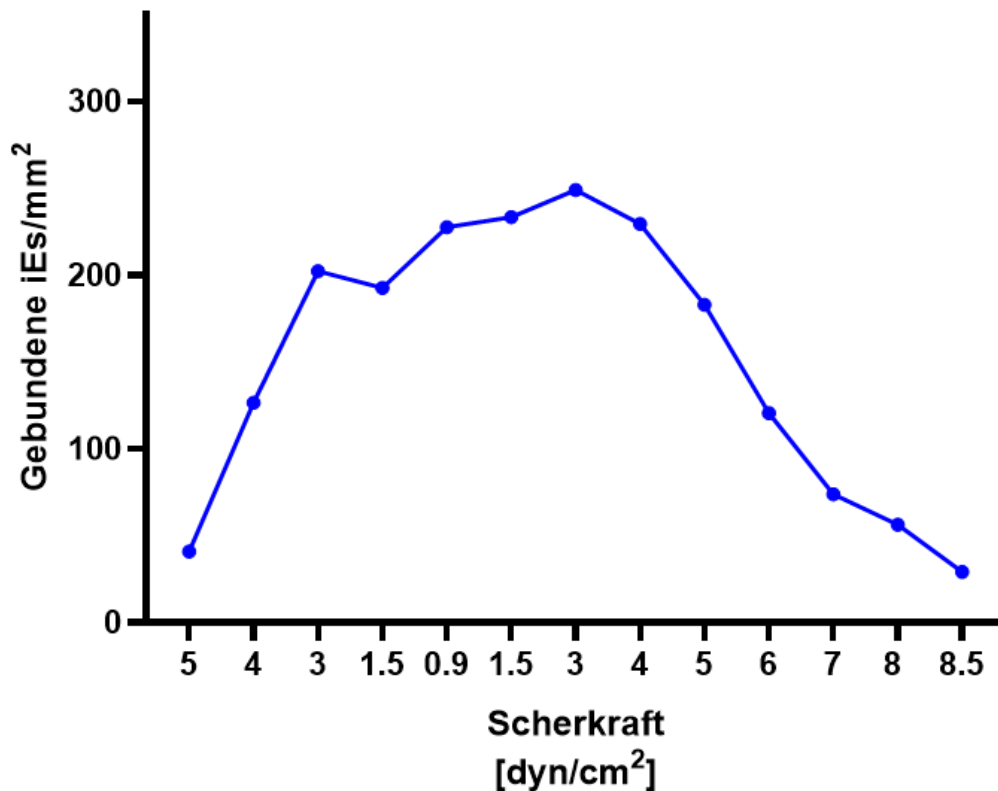


Abbildung 17: Bindung von IT4-*var67*-P4 iEs an CHO-CD36-Zellen unter Flussbedingungen.

Die Anzahl gebundener iEs pro mm² wurde nach 10 Minuten bei variierenden Scherkräften (0,9, 1,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8,5 dyn/cm²) erfasst. Gezeigt sind die Mittelwerte der Daten.

Aus Abbildung 17 ist ersichtlich, dass bei niedriger Scherkraft eine höhere Bindung an den Rezeptor erfolgt als bei hoher Scherkraft. Die höchste Bindung der iEs erfolgte bei 3 dyn/cm² mit 249 iEs/mm². Bei 1,5 dyn/cm² banden 193 und 233 iEs/mm², während bei 0,9 dyn/cm² 228 iEs/mm² gebunden waren. Mit steigender Scherkraft nahm die Anzahl der gebundenen iEs deutlich ab, bis hin zu einer Scherkraft von 8,5 dyn/cm², bei der 29 iEs/mm² gebunden waren.

Für die Scherkraft von 1,5 dyn/cm² konnten im zweiten Durchlauf aufgrund eines Fokussierungsfehlers des Mikroskops keine Daten erfasst werden. Daher ist die Vergleichbarkeit der Messwerte in diesem Bereich eingeschränkt. Insgesamt zeigt sich allerdings ein klarer Trend einer abnehmenden Bindung mit zunehmender Scherkraft.

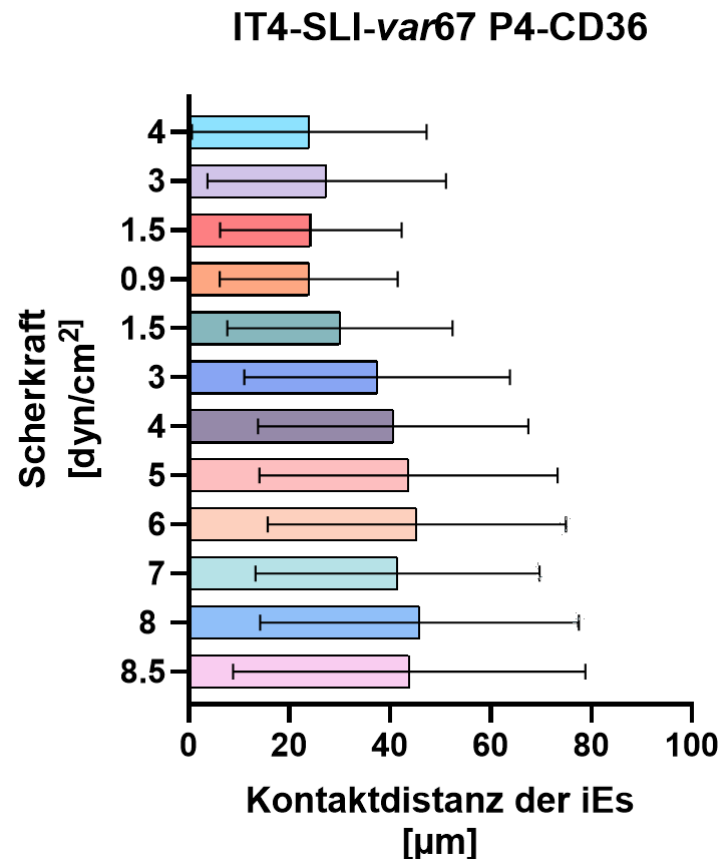


Abbildung 18: Mittlere Kontaktdistanz [µm] von IT4-var67-P4 iEs entlang von CD36 bei variierenden Scherkräften.

Gezeigt wird die durchschnittliche zurückgelegte Distanz der iEs bei unterschiedlichen Scherkräften (0,9, 1,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, und 8,5 dyn/cm²). Die Wegstrecke beschreibt die Strecke, die die Zellen nach ihrer Anheftung an die CD36-Rezeptoren der CHO-Zellen entlang der Oberfläche zurücklegen, während sie mit der Software trackdem verfolgt werden.

Abbildung 18 zeigt die Kontaktdistanz der durch *var67*-P4 infizierten Erythrozyten bei unterschiedlichen Scherkräften (0,9, 1,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 8,5 dyn/cm²). Es wird deutlich, dass die Kontaktdistanz mit zunehmender Scherkraft zunächst ansteigt. Die geringste mittlere Kontaktdistanz wurde bei 0,9 dyn/cm² mit 24 (+/- 25) µm beobachtet. Bei einer Erhöhung auf 1,5 dyn/cm² stieg die Kontaktdistanz auf 30 (+/- 22) µm an und erreichte bei 4 dyn/cm² eine mittlere Kontaktdistanz von 41 (+/- 27) µm. Das Maximum wurde bei 6 dyn/cm² mit 45 (+/- 30) µm erreicht. Bei einer weiteren Erhöhung auf 8,5 dyn/cm² nahm die Kontaktdistanz auf 44 (+/- 35) µm ab. Die Kontaktdistanz stieg von niedrigen zu mittleren Scherkräften an und blieb bei höheren Scherkräften weitgehend konstant.

In der nachfolgenden Abbildung wurde die mittlere Geschwindigkeit der infizierten Erythrozyten, die über die CHO-Zellen rollen, bei unterschiedlichen Scherkräften (0,9, 1,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, und 8,5 dyn/cm²) dargestellt.

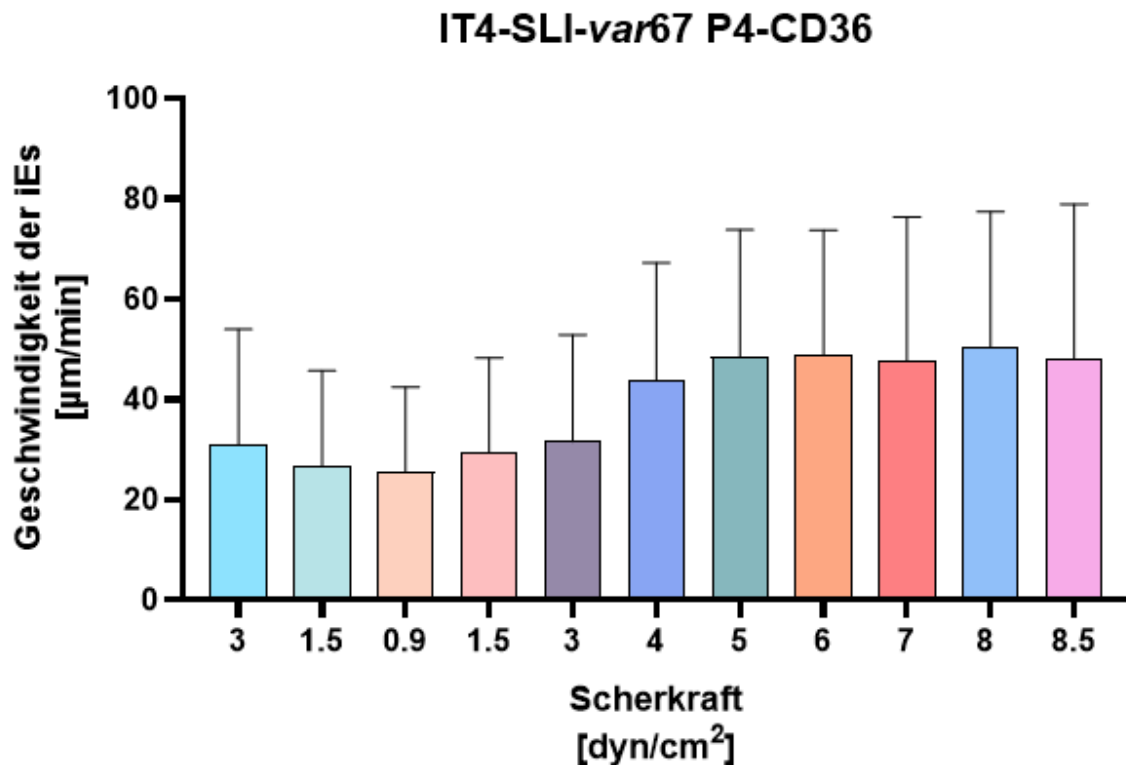


Abbildung 19: Mittlere Geschwindigkeit [μm/min] von IT4-var67-P4 iEs entlang von CHO-CD36 bei variierenden Scherkräften.

Dargestellt ist die durchschnittliche Geschwindigkeit der iEs auf der CD36-exprimierenden CHO-Zelloberfläche unter unterschiedlichen Scherkräften (0,9, 1,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, und 8,5 dyn/cm²).

Die geringste Geschwindigkeit der gebundenen iEs wurde bei 0,9 dyn/cm² mit 25 (+/- 17) μm/min beobachtet. Bei einer Scherkraft von 1,5 dyn/cm² lag die Geschwindigkeit der iEs bei 29 (+/- 19) μm/min und stieg bei 3 dyn/cm² auf 32 (+/- 21) μm/min an. Mit weiter zunehmender Scherkraft erhöhte sich die Geschwindigkeit auf 44 (+/- 23) μm/min bei 4 dyn/cm² sowie auf 48 (+/- 25) μm/min bei 5 dyn/cm². Die maximale Geschwindigkeit wurde bei 8 dyn/cm² mit 50 (+/- 27) μm/min erreicht. Bei einer weiteren Erhöhung auf 8,5 dyn/cm² zeigt sich eine leichte Abnahme auf 48 (+/- 31) μm/min. Insgesamt lässt sich ein Trend erkennen, dass die Geschwindigkeit der iEs mit steigender Scherkraft zunimmt und bei sehr hohen Scherkräften ein Plateau erreicht.

4. Diskussion

4.1 Nachweismethoden mittels PCR und Trypsin-Assay

In dieser Arbeit wurde der Transfektant IT4-SLI-*var67* mittels PCR analysiert, um festzustellen, ob ausschließlich das gewünschte *var*-Gen exprimiert wird. Die PCR zeigte, dass das *var67*-Gen eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abbildung 9 A). Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich für die Parasitenlinie *var67*-P4, die zuvor über den Endothelrezeptor CD36 mittels Panning-Verfahren angereichert wurde.

In beiden Proben konnten jedoch geringe Anteile anderer *var*-Gene nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Mechanismus von *P. falciparum*, der in der Lage ist, zu einem bestimmten Zeitpunkt seine *var*-Gen-Expression zu wechseln (Frank et al., 2007). Aus diesem Grund kann eine 100 %-ige Expression eines einzelnen *var*-Gens nicht erreicht werden, was die beobachteten geringen Abweichungen von der reinen *var67*-Expression erklären könnte.

Die Ergebnisse des Trypsin-Assays zeigen, dass das *PfEMP1*-Protein in beiden Parasitenlinien (*var67* und *var67*-P4) exprimiert wird, was durch die Bande bei etwa 300 kDa bestätigt wird. Allerdings weisen beide Proben einen Unterschied hinsichtlich der Trypsinzugänglichkeit auf. Während in der *var67*-P4-Probe ein zusätzliches Fragment bei etwa 95 kDa detektiert werden konnte, fehlt dieses in der ungepannten Probe.

Das Auftreten des 95-kDa-Fragments nach dem Trypsinverdau wird als membranständiges Restfragment von *PfEMP1* interpretiert, das nach der Abspaltung der extrazellulären Domäne verbleibt. Dies deutet darauf, dass das *PfEMP1* in der *var67*-P4 Population an der Oberfläche exponiert und somit für Trypsin zugänglich ist. Dahingegen ist das *PfEMP1* in der *var67*-Probe zwar vorhanden, jedoch liegt es nicht in einer Form vor, die zu einer proteolytischen Spaltung führt.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine unzureichende oder fehlende Oberflächenexposition von *PfEMP1* in der ungepannten Probe (Waterkeyn et al., 2000). Dies könnte auf Unterschiede in der Membranverankerung oder der Präsentation auf der Erythrozytenoberfläche zurückzuführen sein (Rug et al., 2014). Da die Oberflächenexposition eine zentrale Voraussetzung für die Adhärenz iEs an Endothelrezeptoren ist, könnte dies zu einer geringen oder sogar fehlenden Zytoadhärenz führen, wie die Ergebnisse des Bindungs-Assays mit der ungepannten Probe darlegten. Aus dem Grund wurde

das *var67*-P4 zur Analyse der Bindungseigenschaft genutzt, da das *var67*-PfEMP1-Protein auf der Oberfläche der iEs exprimiert wurde.

4.2 Panning zur Selektion von IT4-*var67* an CD36

Die Ergebnisse des Panning-Verfahrens zeigen eine Anreicherung von iEs mit exprimiertem *var67*-PfEMP1 aus einer Population, in der das entsprechende PfEMP1 zuvor nicht oder nur schwach exprimiert wurde. Im Laufe der Panning-Runden ist eine Zunahme der Bindung von iEs an CD36 zu erkennen. Zu Beginn (Abbildung 12 (A) und (B)) wurde eine geringe Bindung mikroskopisch nachgewiesen, während in den letzten Runden (Abbildung 12 (C) und (D)) eine höhere bzw. stärkere Bindung beobachtet wurde.

Typischerweise ist eine solche Zunahme der Bindungseigenschaft mit einer Selektion von Parasiten in Verbindung zu bringen, die eine hohe Affinität zu dem jeweiligen Rezeptor aufweisen (Ralph et al., 2005). Die in Abschnitt 3.1 dargestellten Ergebnisse zeigen jedoch auf, dass sowohl vor als auch nach dem Panning überwiegend *var67* exprimiert wurde. Das bedeutet, dass ein Wechsel der *var*-Genexpression in den einzelnen Panning-Runden nicht stattgefunden hat und somit nicht die Ursache der Zunahme der Bindungseigenschaft an CD36 ist. Daraus lässt sich schließen, dass das Panning-Verfahren ausschließlich die bestehende Hauptpopulation von *var67*-Parasiten angereichert hat. Um jedoch eindeutig sicherzustellen, dass kein *var*-Genwechsel stattgefunden hat, sollte mit *var67*-P2 und *var67*-P3 ebenfalls eine PCR durchgeführt werden.

Die Durchführung des Panning-Verfahrens führte zu einer stabileren, homogenen Kultur, die für nachfolgende Analysen verwendet werden konnte. Das Verfahren ermöglicht somit eine gezielte Anreicherung bestimmter Subpopulationen, liefert jedoch keine quantitativen Informationen über die Bindungsstärke der Parasiten und stellt *in vitro* nur einen vereinfachten Selektionsdruck dar, da ausschließlich CD36 betrachtet wird.

Insgesamt zeigt das Ergebnis, dass das Panning eine effektive Methode zur gezielten Anreicherung einer Parasitenpopulation darstellt, ohne neue Varianten zu selektieren oder das Expressionsprofil wesentlich zu verändern.

4.3 Charakterisierung von IT4-*var67* durch statische Bindungs-Assays

Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Bindungs-Assay zeigte eine Bindung von *var67* an CD36, die jedoch unzureichend war. Ein möglicher Grund hierfür könnte die unzureichende Oberflächenexposition des *PfEMP1*-Moleküls sein, was sich durch das durchgeführte Trypsin-Assay (siehe 3.4) bestätigen lässt.

Aus dem Grund wurde das Bindungs-Assay nach dem Panning-Verfahren erneut durchgeführt. Das Bindungs-Assay mit *var67*-P4 liefert neue Erkenntnisse über die Zytoadhäsion von *P. falciparum* im Wirt. Die Ergebnisse aus dem durchgeführten Bindungs-Assay zeigen, dass die *var67*-P4-Variante im Vergleich zur Negativkontrolle (GFP) eine signifikante Bindung an den Endothelrezeptor CD36 aufweist. Diese Bindung war zu erwarten, da die CIDR α 2.6-Domäne des *var67*-*PfEMP1* als entscheidend für die Bindungsaffinität an den CD36-Rezeptor gilt (Bachmann et al., 2022). Die Zytoadhäsion von iEs an CD36 spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Malaria, da sie zur Sequestrierung in den Gefäßen beitragen und mit eher milden Krankheitsverläufen assoziiert sind (Smith et al., 2013).

Zusätzlich konnte eine signifikante Bindung von *var67*-P4 an die Rezeptoren ICAM-1, CD55, TNFR2 und MDR1 nachgewiesen werden. Eine Interaktion mit ICAM-1 könnte zu einer Gefäßverstopfung beitragen und dem Parasiten helfen der Immunabwehr zu entgehen (G. D. Turner et al., 1994; van de Stolpe & van der Saag, 1996). Die Bindung an CD55 könnte ebenfalls eine Rolle bei der Modulation der Immunantwort spielen (Kang et al., 2024). TNFR2, als Rezeptor für den Tumornekrosefaktor, spielt eine entscheidende Rolle in entzündlichen Signalwegen. Eine Bindung durch *var67*-iEs an TNFR2 könnte daher zur Stabilisierung der Sequestrierung an aktivierten Endothelzellen beitragen und lokale Entzündungsprozesse verstärken (Piguet et al., 2002).

Im Gegensatz dazu ist die funktionelle Rolle von MDR1 bislang unklar. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass MDR1 eher einen alternativen Bindungspartner darstellt, der die Adhäsionsflexibilität des Parasiten widerspiegelt.

Obwohl die CHO-Zellen konfluent ausgesät waren, erfolgte die mikroskopische Auswertung anhand ausgewählter Bereiche mit hoher Zelldichte und geringem Anteil toter Zellen. Solche Bereiche waren jedoch nur in geringer Anzahl vorhanden, weshalb die Analyse nicht flächendeckend erfolgte. Da Bindungsereignisse bevorzugt in diesen Bereichen beobachtet wurden, könnte dies zu einer Überschätzung der

Gesamtbindung geführt haben. Die signifikante Bindung an ICAM-1, CD55, TNFR2 und MDR1 sollte daher durch weitere Versuche bestätigt werden.

Die restlichen Rezeptoren TNFR1, VCAM-1, K1-EPCR, CD37, CD9 und CD81 zeigten keinen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppe und scheinen daher keine relevante Rolle in der Interaktion mit *var67* zu spielen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Zytoadhäsion von *P. falciparum* gezielt und Rezeptorspezifisch erfolgt und einen wichtigen Beitrag zur Pathogenese der Malaria leistet.

4.4 Charakterisierung von *IT4-var67* durch Bindungs-Assays unter Flussbedingungen

Die Ergebnisse des Bindungs-Assays unter Flussbedingungen zeigen, dass *var67* an CD36 bindet und dabei eine rollende Adhäsion aufweist. Die höchste Bindung der iEs wurde bei 3 dyn/cm² beobachtet, während mit zunehmender Scherkraft eine kontinuierliche Abnahme der Bindung auftrat. Eine deutliche Abnahme der gebundenen iEs zeigt sich bereits bei 4 dyn/cm². Diese Beobachtung steht im Einklang mit bereits vorliegenden Studien, die zeigen, dass die CD36-vermittelte Adhäsion empfindlich gegenüber Strömungskraften ist und unter höheren Flussbedingungen weniger stabil wird (Herricks et al., 2013).

Zusätzlich wurde die Kontaktdistanz der iEs analysiert. Dabei zeigte sich, dass die zurückgelegte Strecke der iEs bei einem Scherstress von 0,9 dyn/cm² am geringsten war. Dahingegen wurde bei einem Scherstress von 8 dyn/cm² die größte Strecke zurückgelegt. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil der iEs auch unter hohen Scherstressbedingungen eine stabile Bindung an CD36 aufrechterhalten kann. Gleichzeitig steigt die Geschwindigkeit der iEs mit zunehmender Scherkraft. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die iEs bei höheren Scherkräften weiter entlang der Oberfläche rollen können. Damit wird die Hypothese unterstützt, dass die Bindungseigenschaften von CD36 unter physiologischen Bedingungen von der Scherkraft abhängen (Herricks et al., 2013).

Die physiologische Relevanz dieser Ergebnisse wird durch die unterschiedlichen Scherkräfte in Blutgefäßen unterstrichen. Eine Scherkraft unter 1 dyn/cm² kommt meistens in Venen vor, während höhere Scherkräfte in Arteriolen zu finden sind

(Ballermann et al., 1998). Die beobachtete rollende Adhäsion entspricht daher eher den Bedingungen in kleineren Gefäßen mit höherer Strömung.

Eine Limitation der vorliegenden Daten liegt in der Messmethode, da bei den Scherkräften 3 bis 5 dyn/cm² Unterschiede zwischen den Doppelbestimmungen auftraten. Der Grund dafür lag vermutlich darin, dass die Bewegung der iEs aufgrund der Bildaufnahmeintervalle von drei Sekunden nicht vollständig aufgenommen werden konnte, da sich die iEs zu schnell bewegt haben. Eine weitere Limitation stellt die Anzahl der durchgeführten Durchläufe des Experiments dar. Für eine höhere statische Aussagekraft wären mindestens drei unabhängige Wiederholungen erforderlich gewesen. In dieser Arbeit konnten jedoch aufgrund von Zeitmangel nur zwei Durchläufe in die Auswertung einbezogen werden, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt ist.

Im Hinblick auf die Pathogenese deutet, die beobachtete rollende Adhäsion darauf hin, dass iEs, die an CD36 binden, weniger stabil sequestriert werden und somit weiterhin durch die Milz zirkulieren können. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit ihrer Eliminierung durch die Milz und könnte mit einem mildereren Krankheitsverlauf assoziiert werden (Bachmann et al., 2022; Robinson et al., 2003; Thylur et al., 2017). Die Beobachtung steht im Einklang mit Studien, die zeigen, dass eine stabile, statische Bindung an Rezeptoren wie ICAM-1 mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert werden, während die hier beobachtete dynamische bzw. rollende Interaktion mit CD36 eher mit einem mildereren Krankheitsverlauf verbunden ist.

Im Gegensatz dazu begünstigt die stabile Bindung an ICAM-1 eine verstärkte Sequestrierung, sodass die iEs nicht von der Milz eliminiert werden können und es zu einer schweren Verlaufsform kommt (Cunningham et al., 2017; Tuikue Ndam et al., 2017).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse die Wichtigkeit der Scherkräfte für die Bindungseigenschaft des *Pf*EMP1-Moleküls von *var67* und der Pathogenese von Malaria unterstreichen.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindungseigenschaft von IT4-SLI-*var67* gegenüber verschiedenen endothelialen Rezeptoren umfassend untersucht, wobei ausschließlich eine spezifische *PfEMP1*-Variante exprimiert wurde. Zur Analyse der Adhärenzeigenschaften wurden sowohl statische Bindungs-Assays als auch Bindungs-Assays unter Flussbedingungen durchgeführt.

Aufgrund einer zunächst unzureichenden Oberflächenexposition von *PfEMP1* wurde *var67* mehrfach über CD36 selektioniert (*var67*-P4). Nach dem Panning konnte eine deutlich erhöhte Bindungsfähigkeit gegenüber CD36 nachgewiesen werden. Das statische Bindungs-Assay zeigte, dass *var67* eine hohe Bindungsaffinität gegenüber CD36 besitzt. Darüber hinaus wurden auch für die Rezeptoren ICAM-1, CD55, TNFR2 und MDR1 Bindungseigenschaften beobachtet, deren funktionelle Relevanz jedoch durch weiterführende Experimente, insbesondere unter Flussbedingungen, bestätigt werden sollte. Die unter Flussbedingungen durchgeführten Bindungs-Assays lieferten zusätzlich Einblicke in die Interaktionsdynamik und zeigten für CD36 eine ausgeprägte rollende Adhärenz.

Um ein umfassenderes Verständnis der Adhärenzmechanismen infizierter Erythrozyten zu erlangen, erscheint es sinnvoll, zukünftig Experimente mit primären Endothelzelllinien durchzuführen, um physiologisch relevante Bedingungen abzubilden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass nicht nur die Expression, sondern auch die korrekte Oberflächenexposition von *PfEMP1* entscheidend für die Adhärenzeigenschaften infizierter Erythrozyten ist.

6. Literaturverzeichnis

- Armah, H., Wired, E. K., Dodoo, A. K., Adjei, A. A., Tettey, Y., & Gyasi, R. (2005). Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(1), 123–131. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005010123>
- Autino, B., Corbett, Y., Castelli, F., & Taramelli, D. (2012). Pathogenesis of Malaria in Tissues and Blood. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1), e2012061. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.061>
- Bachmann, A., Metwally, N. G., Allweier, J., Cronshagen, J., Del Pilar Martinez Tauler, M., Murk, A., Roth, L. K., Torabi, H., Wu, Y., Gutsman, T., & Bruchhaus, I. (2022). CD36-A Host Receptor Necessary for Malaria Parasites to Establish and Maintain Infection. *Microorganisms*, 10(12), 2356. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122356>
- Ballermann, B. J., Dardik, A., Eng, E., & Liu, A. (1998). Shear stress and the endothelium. *Kidney International*, 54, S100–S108. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.06720.x>
- Barreiro, O., Yáñez-Mó, M., Sala-Valdés, M., Gutiérrez-López, M. D., Ovalle, S., Higginbottom, A., Monk, P. N., Cabañas, C., & Sánchez-Madrid, F. (2005). Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood*, 105(7), 2852–2861. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3606>
- Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., Taraschi, T. F., & Howard, R. J. (1995). Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, 82(1), 77–87. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90054-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90054-3)
- Beck, T. (2006). Will malaria soon be a thing of the past? In *Coffee Break: Tutorials for NCBI Tools [Internet]*. National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5951/>
- Bernabeu, M., & Smith, J. D. (2017). EPCR and Malaria Severity: The Center of a Perfect Storm. *Trends in Parasitology*, 33(4), 295–308. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.004>
- Bossennec, M., Di Roio, A., Caux, C., & Ménétrier-Caux, C. (2018). MDR1 in immunity: Friend or foe? *Oncoimmunology*, 7(12), e1499388. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1499388>
- Bouyer, G., Barbieri, D., Dupuy, F., Marteau, A., Sissoko, A., N'Dri, M.-E., Neveu, G., Bedault, L., Khodabux, N., Roman, D., Houzé, S., Siciliano, G., Alano, P., Martins, R. M., Lopez-Rubio, J.-J., Clain, J., Duval, R., Egée, S., & Lavazec, C. (2020). Plasmodium falciparum sexual parasites regulate infected erythrocyte permeability. *Communications Biology*, 3(1), 726. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01454-7>
- Brehmer, J. (2021). *Analyse der Bindungseigenschaften zwischen P. falciparum infizierten Erythrozyten und verschiedenen Endothelrezeptoren.*

- Brosseau, C., Colas, L., Magnan, A., & Brouard, S. (2018). CD9 Tetraspanin: A New Pathway for the Regulation of Inflammation? *Frontiers in Immunology*, 9, 2316. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02316>
- Caulier, B., Joaquina, S., Gelebart, P., Dowling, T. H., Kaveh, F., Thomas, M., Tandarić, L., Wernhoff, P., Katyayini, N. U., Wogsland, C., Gjerstad, M. E., Fløisand, Y., Kvalheim, G., Marr, C., Kobold, S., Enserink, J. M., Gjertsen, B. T., McCormack, E., Inderberg, E. M., & Wälchli, S. (2024). CD37 is a safe chimeric antigen receptor target to treat acute myeloid leukemia. *Cell Reports. Medicine*, 5(6), 101572. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101572>
- Counihan, N. A., Modak, J. K., & de Koning-Ward, T. F. (2021). How Malaria Parasites Acquire Nutrients From Their Host. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 649184. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.649184>
- Crabb, B. S., Cooke, B. M., Reeder, J. C., Waller, R. F., Caruana, S. R., Davern, K. M., Wickham, M. E., Brown, G. V., Coppel, R. L., & Cowman, A. F. (1997). Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell*, 89(2), 287–296. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80207-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80207-x)
- Cunningham, D. A., Lin, J.-W., Brugat, T., Jarra, W., Tumwine, I., Kushinga, G., Ramesar, J., Franke-Fayard, B., & Langhorne, J. (2017). ICAM-1 is a key receptor mediating cytoadherence and pathology in the Plasmodium chabaudi malaria model. *Malaria Journal*, 16(1), 185. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1834-8>
- Dhangadamajhi, G., Kar, S. K., & Ranjit, M. (2010). The survival strategies of malaria parasite in the red blood cell and host cell polymorphisms. *Malaria Research and Treatment*, 2010, 973094. <https://doi.org/10.4061/2010/973094>
- Dimonte, S., Bruske, E. I., Enderes, C., Otto, T. D., Turner, L., Kremsner, P., & Frank, M. (2020). Identification of a conserved var gene in different Plasmodium falciparum strains. *Malaria Journal*, 19(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03257-x>
- Doolan, D. L., Dobaño, C., & Baird, J. K. (2009). Acquired immunity to malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 13–36, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08>
- Dörpinghaus, M., Fürstenwerth, F., Roth, L. K., Bouws, P., Rakotonirinalalao, M., Jordan, V., Sauer, M., Rehn, T., Pansegrau, E., Höhn, K., Mesén-Ramírez, P., Bachmann, A., Lorenzen, S., Roeder, T., Metwally, N. G., & Bruchhaus, I. (2020). Stringent Selection of Knobby Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes during Cytoadhesion at Febrile Temperature. *Microorganisms*, 8(2), 174. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020174>
- Febbraio, M., Hajjar, D. P., & Silverstein, R. L. (2001). CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 785–791. <https://doi.org/10.1172/JCI14006>
- Frank, M., Dzikowski, R., Amulic, B., & Deitsch, K. (2007). Variable switching rates of malaria virulence genes are associated with chromosomal position and gene

- subclass. *Molecular microbiology*, 64(6), 1486–1498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05736.x>
- Franke-Fayard, B., Fonager, J., Braks, A., Khan, S. M., & Janse, C. J. (2010). Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: Can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001032. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001032>
- Gomes, P. S., Bhardwaj, J., Rivera-Correa, J., Freire-De-Lima, C. G., & Morrot, A. (2016). Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1617. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01617>
- Gozalo, A. S., Robinson, C. K., Holdridge, J., Franco Mahecha, O. L., & Elkins, W. R. (2024). Overview of Plasmodium spp. And Animal Models in Malaria Research. *Comparative Medicine*, 74(4), 205–230. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-24-000019>
- Guizetti, J., & Scherf, A. (2013). Silence, activate, poise and switch! Mechanisms of antigenic variation in Plasmodium falciparum. *Cellular Microbiology*, 15(5), 718–726. <https://doi.org/10.1111/cmi.12115>
- Hartung, N. (2025, April 25). Malaria im Fokus: Fortschritte sichern - Rückschritte vermeiden. *Deutsche Stiftung Weltbevölkerung*. <https://www.dsw.org/malaria-im-fokus-fortschritte-sichern-rueckschritte-vermeiden/>
- Helms, G., Dasanna, A. K., Schwarz, U. S., & Lanzer, M. (2016). Modeling cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and leukocytes-common principles and distinctive features. *FEBS Letters*, 590(13), 1955–1971. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12142>
- Herricks, T., Avril, M., Janes, J., Smith, J. D., & Rathod, P. K. (2013). Clonal variants of Plasmodium falciparum exhibit a narrow range of rolling velocities to host receptor CD36 under dynamic flow conditions. *Eukaryotic Cell*, 12(11), 1490–1498. <https://doi.org/10.1128/EC.00148-13>
- Herricks, T., Seydel, K. B., Molyneux, M., Taylor, T., & Rathod, P. K. (2012). Estimating physical splenic filtration of Plasmodium falciparum-infected red blood cells in malaria patients. *Cellular Microbiology*, 14(12), 1880–1891. <https://doi.org/10.1111/cmi.12007>
- Jensen, J. B., & Trager, W. (1978). Plasmodium Falciparum in Culture: Establishment of Additional Strains. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27(4), 743–746. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.743>
- Kang, L., Kohen, M., McCarthy, I., Hammelef, E., Kim, H. S., Bapputty, R., Gubitosi-Klug, R., Orge, F. H., Kern, T., & Medof, M. E. (2024). Critical Role of CD55 in Controlling Wound Healing. *Journal of Immunology*, 212(7), 1142–1149. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2300628>
- Kidima, W. B. (2015). Syncytiotrophoblast Functions and Fetal Growth Restriction during Placental Malaria: Updates and Implication for Future Interventions. *BioMed Research International*, 2015, 451735. <https://doi.org/10.1155/2015/451735>
- Kraemer, S. M., Kyes, S. A., Aggarwal, G., Springer, A. L., Nelson, S. O., Christodoulou, Z., Smith, L. M., Wang, W., Levin, E., Newbold, C. I., Myler, P. J., & Smith, J. D. (2007). Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in

- Plasmodium falciparum*: Comparisons of geographically diverse isolates. *BMC Genomics*, 8, 45. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-45>
- Kyes, S. A., Christodoulou, Z., Raza, A., Horrocks, P., Pinches, R., Rowe, J. A., & Newbold, C. I. (2003). A well-conserved *Plasmodium falciparum* var gene shows an unusual stage-specific transcript pattern. *Molecular Microbiology*, 48(5), 1339–1348. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03505.x>
- Kyes, S. A., Kraemer, S. M., & Smith, J. D. (2007). Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: Gene organization and regulation of the var multigene family. *Eukaryotic Cell*, 6(9), 1511–1520. <https://doi.org/10.1128/EC.00173-07>
- Lennartz, F., Bengtsson, A., Olsen, R. W., Joergensen, L., Brown, A., Remy, L., Man, P., Forest, E., Barfod, L. K., Adams, Y., Higgins, M. K., & Jensen, A. T. R. (2015). Mapping the Binding Site of a Cross-Reactive *Plasmodium falciparum* PfEMP1 Monoclonal Antibody Inhibitory of ICAM-1 Binding. *Journal of Immunology*, 195(7), 3273–3283. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501404>
- MacEwan, D. J. (2002). TNF ligands and receptors—A matter of life and death. *British Journal of Pharmacology*, 135(4), 855–875. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704549>
- Magowan, C., Nunomura, W., Waller, K. L., Yeung, J., Liang, J., Van Dort, H., Low, P. S., Coppel, R. L., & Mohandas, N. (2000). *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 associates with the band 3 binding domain of ankyrin in the infected red cell membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1502(3), 461–470. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00069-7)
- Malaria*. (2000, Mai 19). https://www.rki.de/DE/Aktuelles/Publikationen/RKI-Ratgeber/Ratgeber/Ratgeber_Malaria.html
- Martin, R. E., & Kirk, K. (2007). Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood*, 109(5), 2217–2224. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-026963>
- Maubert, B., Fievet, N., Tami, G., Boudin, C., & Deloron, P. (2000). Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the human placenta. *Parasite Immunology*, 22(4), 191–199. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00292.x>
- Metwally, N. G., Tilly, A.-K., Lubiana, P., Roth, L. K., Dörpinghaus, M., Lorenzen, S., Schuldt, K., Witt, S., Bachmann, A., Tidow, H., Gutschmann, T., Burmester, T., Roeder, T., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2017). Characterisation of *Plasmodium falciparum* populations selected on the human endothelial receptors P-selectin, E-selectin, CD9 and CD151. *Scientific Reports*, 7(1), 4069. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04241-3>
- Mosnier, L. O., & Lavstsen, T. (2016). The role of EPCR in the pathogenesis of severe malaria. *Thrombosis Research*, 141 Suppl 2(Suppl 2), S46-49. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(16\)30364-4](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(16)30364-4)
- Oh, S. S., Voigt, S., Fisher, D., Yi, S. J., LeRoy, P. J., Derick, L. H., Liu, S., & Chishti, A. H. (2000). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein

- in the erythrocyte skeleton. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 108(2), 237–247. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(00\)00227-9](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(00)00227-9)
- Ohnishi, K., & Kimura, K. (2001). Serum levels of vascular cell adhesion molecule 1 in the early post-treatment defervescent phase of falciparum malaria. *Parasitology Research*, 87(1), 67–69. <https://doi.org/10.1007/s004360000298>
- Omer, S., Franco-Jarava, C., Noureldien, A., Omer, M., Abdelrahim, M., Molina, I., & Adam, I. (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. *Malaria Journal*, 20(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03580-x>
- Otto, T. D., Assefa, S. A., Böhme, U., Sanders, M. J., Kwiatkowski, D., Pf3k consortium, Berriman, M., & Newbold, C. (2019). Evolutionary analysis of the most polymorphic gene family in falciparum malaria. *Wellcome Open Research*, 4, 193. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15590.1>
- Paszkowiak, J. J., & Dardik, A. (2003). Arterial wall shear stress: Observations from the bench to the bedside. *Vascular and Endovascular Surgery*, 37(1), 47–57. <https://doi.org/10.1177/153857440303700107>
- Pei, X., An, X., Guo, X., Tarnawski, M., Coppel, R., & Mohandas, N. (2005). Structural and functional studies of interaction between Plasmodium falciparum knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and erythrocyte spectrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31166–31171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505298200>
- Philpott, J., & Keystone, J. S. (1987). Severe falciparum malaria. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 137(2), 135–136.
- Piguet, P. F., Kan, C. D., & Vesin, C. (2002). Role of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in cerebral malaria in mice. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 82(9), 1155–1166. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000028822.94883.8a>
- Prajapati, S. K., & Singh, O. P. (2013). Remodeling of human red cells infected with Plasmodium falciparum and the impact of PHIST proteins. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 51(3), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.06.003>
- Predicting the Impact of Climate Change on Malaria*. (2024, November 12). BCG Global. <https://www.bcg.com/publications/2024/predicting-impact-climate-change-on-malaria>
- Ralph, S. A., Bischoff, E., Mattei, D., Sismeiro, O., Dillies, M.-A., Guigon, G., Coppee, J.-Y., David, P. H., & Scherf, A. (2005). Transcriptome analysis of antigenic variation in Plasmodium falciparum—Var silencing is not dependent on antisense RNA. *Genome Biology*, 6(11), R93. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-11-r93>
- Rask, T. S., Hansen, D. A., Theander, T. G., Gorm Pedersen, A., & Lavstsen, T. (2010). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes—Divide and conquer. *PLoS Computational Biology*, 6(9), e1000933. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000933>
- Robinson, B. A., Welch, T. L., & Smith, J. D. (2003). Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members

- to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Molecular Microbiology*, 47(5), 1265–1278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03378.x>
- Rowe, J. A., Claessens, A., Corrigan, R. A., & Arman, M. (2009). Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, e16. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001082>
- Rug, M., Cyrklaff, M., Mikkonen, A., Lemgruber, L., Kuelzer, S., Sanchez, C. P., Thompson, J., Hanssen, E., O'Neill, M., Langer, C., Lanzer, M., Frischknecht, F., Maier, A. G., & Cowman, A. F. (2014). Export of virulence proteins by malaria-infected erythrocytes involves remodeling of host actin cytoskeleton. *Blood*, 124(23), 3459–3468. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-583054>
- Rug, M., Prescott, S. W., Fernandez, K. M., Cooke, B. M., & Cowman, A. F. (2006). The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood*, 108(1), 370–378. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4624>
- Ruiz-Argüelles, A., & Llorente, L. (2007). The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmunity Reviews*, 6(3), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2006.09.008>
- Safeukui, I., Correas, J.-M., Brousse, V., Hirt, D., Deplaine, G., Mulé, S., Lesurtel, M., Goasguen, N., Sauvanet, A., Couvelard, A., Kerneis, S., Khun, H., Vigan-Womas, I., Ottone, C., Molina, T. J., Tréluyer, J.-M., Mercereau-Puijalon, O., Milon, G., David, P. H., & Buffet, P. A. (2008). Retention of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. *Blood*, 112(6), 2520–2528. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-146779>
- Sakoguchi, A., & Arase, H. (2022). Mechanisms for Host Immune Evasion Mediated by *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocyte Surface Antigens. *Frontiers in Immunology*, 13, 901864. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901864>
- Sato, S. (2021). *Plasmodium*—A brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *Journal of Physiological Anthropology*, 40, 1. <https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9>
- Sharma, Y. D. (1991). Knobs, knob proteins and cytoadherence in *falciparum* malaria. *The International Journal of Biochemistry*, 23(9), 775–789. [https://doi.org/10.1016/0020-711x\(91\)90061-q](https://doi.org/10.1016/0020-711x(91)90061-q)
- Sherman, I. W., Eda, S., & Winograd, E. (2003). Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: Defining the ties that bind. *Microbes and Infection*, 5(10), 897–909. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00162-x](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00162-x)
- Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G., Roberts, D. J., Hudson-Taylor, D. E., Peterson, D. S., Pinches, R., Newbold, C. I., & Miller, L. H. (1995). Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*, 82(1), 101–110. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90056-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90056-x)

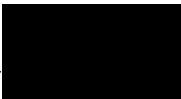
- Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K., & Lavstsen, T. (2013). Malaria's deadly grip: Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cellular Microbiology*, 15(12), 1976–1983. <https://doi.org/10.1111/cmi.12183>
- Spycher, C., Rug, M., Klonis, N., Ferguson, D. J. P., Cowman, A. F., Beck, H.-P., & Tilley, L. (2006). Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 26(11), 4074–4085. <https://doi.org/10.1128/MCB.00095-06>
- Steel, R. W. J., Schepis, A., Nguyen, T., Milstein, S., Yucius, K., Tu, H. C., Fishilevich, E., Haslett, P., & Kappe, S. H. I. (2025). Protection from malaria infection using liver-targeted siRNA. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 33(3), 101516. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2025.101516>
- Tamez, P. A., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Hiller, N. L., Llinás, M., Balu, B., Adams, J. H., & Haldar, K. (2008). An erythrocyte vesicle protein exported by the malaria parasite promotes tubovesicular lipid import from the host cell surface. *PLoS Pathogens*, 4(8), e1000118. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000118>
- Taylor, D. W., Parra, M., Chapman, G. B., Stearns, M. E., Renner, J., Aikawa, M., Uni, S., Aley, S. B., Panton, L. J., & Howard, R. J. (1987). Localization of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 in the erythrocyte skeleton under knobs. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 25(2), 165–174. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(87\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(87)90005-3)
- Thylur, R. P., Wu, X., Gowda, N. M., Punmath, K., Neelgund, S. E., Febbraio, M., & Gowda, D. C. (2017). CD36 receptor regulates malaria-induced immune responses primarily at early blood stage infection contributing to parasitemia control and resistance to mortality. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(22), 9394–9408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.781294>
- Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., & Prabhu, R. M. (2003). Clinical review: Severe malaria. *Critical Care*, 7(4), 315–323. <https://doi.org/10.1186/cc2183>
- Tuikue Ndam, N., Moussiliou, A., Lavstsen, T., Kamaliddin, C., Jensen, A. T. R., Mama, A., Tahar, R., Wang, C. W., Jespersen, J. S., Alao, J. M., Gamain, B., Theander, T. G., & Deloron, P. (2017). Parasites Causing Cerebral *Falciparum* Malaria Bind Multiple Endothelial Receptors and Express EPCR and ICAM-1-Binding PfEMP1. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(12), 1918–1925. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix230>
- Turner, G. D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T. M., Looareesuwan, S., Buley, I. D., Gatter, K. C., Newbold, C. I., Pukritayakamee, S., & Nagachinta, B. (1994). An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *The American Journal of Pathology*, 145(5), 1057–1069.
- Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E. V., Avril, M., Brazier, A. J., Freeth, J., Jespersen, J. S., Nielsen, M. A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J. D., Higgins, M. K., & Theander, T. G. (2013). Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*, 498(7455), 502–505. <https://doi.org/10.1038/nature12216>

- van de Stolpe, A., & van der Saag, P. T. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Molecular Medicine*, 74(1), 13–33. <https://doi.org/10.1007/BF00202069>
- van der Heyde, H. C., Nolan, J., Combes, V., Gramaglia, I., & Grau, G. E. (2006). A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: Sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends in Parasitology*, 22(11), 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.002>
- Waller, K. L., Cooke, B. M., Nunomura, W., Mohandas, N., & Coppel, R. L. (1999). Mapping the binding domains involved in the interaction between the *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand P. *falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23808–23813. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23808>
- Wassmer, S. C., Taylor, T. E., Rathod, P. K., Mishra, S. K., Mohanty, S., Arevalo-Herrera, M., Duraisingh, M. T., & Smith, J. D. (2015). Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(3 Suppl), 42–56. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0841>
- Waterkeyn, J. G., Wickham, M. E., Davern, K. M., Cooke, B. M., Coppel, R. L., Reeder, J. C., Culvenor, J. G., Waller, R. F., & Cowman, A. F. (2000). Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *The EMBO Journal*, 19(12), 2813–2823. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2813>
- Wickert, H., & Krohne, G. (2007). The complex morphology of Maurer's clefts: From discovery to three-dimensional reconstructions. *Trends in Parasitology*, 23(10), 502–509. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.008>
- Wickham, M. E., Rug, M., Ralph, S. A., Klonis, N., McFadden, G. I., Tilley, L., & Cowman, A. F. (2001). Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *The EMBO Journal*, 20(20), 5636–5649. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.20.5636>
- Wiser, M. F. (2023). Knobs, Adhesion, and Severe *Falciparum* Malaria. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(7), 353. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070353>
- Wiser, M. F. (2024). The Digestive Vacuole of the Malaria Parasite: A Specialized Lysosome. *Pathogens*, 13(3), 182. <https://doi.org/10.3390/pathogens13030182>
- World malaria report 2025: Addressing the threat of antimalarial drug resistance.* (2025).
- Zakama, A. K., Ozarslan, N., & Gaw, S. L. (2020). Placental Malaria. *Current Tropical Medicine Reports*, 7(4), 162–171. <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00213-2>

7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Samantha Yogendran, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind in allen Fällen unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Hamburg, den 02.04.2026


Samantha Yogendran

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die mich während meines Studiums und insbesondere bei der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Julien Béthune, der sich trotz seines vollen Terminkalenders bereit erklärt hat, die Betreuung und Korrektur meiner Bachelorarbeit zu übernehmen. Es ist keine Selbstverständlichkeit, so viel Zeit und Engagement zu investieren – umso mehr schätze ich Ihre Unterstützung und Begleitung.

Ein herzliches Dankeschön geht ebenfalls an Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus, die mich direkt in der Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Möglichkeit gegeben hat, sowohl mein Praxissemester als auch meine Bachelorarbeit in der AG zu absolvieren. Durch diese Zeit konnte ich wertvolle praktische Erfahrungen sammeln und viel lernen – dafür danke ich dir von Herzen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer David Danicic-Rauchberger, der sich direkt bereit erklärt hat, mich bei dieser Arbeit zu unterstützen. Ich danke dir herzlich für die engagierte Betreuung und die Zusammenarbeit an diesem Projekt. Durch dich konnte ich viele neue fachliche und persönliche Erkenntnisse gewinnen. Besonders schätze ich auch die zahlreichen Gespräche über meine berufliche Zukunft, die mir neue Perspektiven eröffnet haben. Wer weiß, vielleicht führt mich mein Weg ja doch noch in Richtung Patentanwaltschaft. Deine Anregungen und dein offenes Ohr haben mich auf jeden Fall sehr inspiriert.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Team der AG Bruchhaus, das mich von Beginn an herzlich aufgenommen hat. Die angenehme und unterstützende Arbeitsatmosphäre hat mir das Arbeiten und Lernen in der AG zu einem großen Vergnügen gemacht.

Ein großer Dank geht an meine Freunde, die mich während meines Studiums unterstützt haben und immer für mich da waren. Euer Rückhalt war ein wesentlicher Grund dafür, dass ich mein Studium erfolgreich abschließen konnte.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Danke an meine Eltern, die ihr Leben in ihrer Heimat hinter sich gelassen haben und nach Deutschland gekommen sind, um mir und meinen Geschwistern eine gute Zukunft zu ermöglichen. Ohne eure bedingungslose Unterstützung, euer Vertrauen und eure Liebe wäre ich nicht da, wo ich heute stehe.

Außerdem danke ich meinen Brüdern, die mir stets ein Vorbild waren, mir Orientierung gegeben haben und mich während des Studiums unterstützt haben.