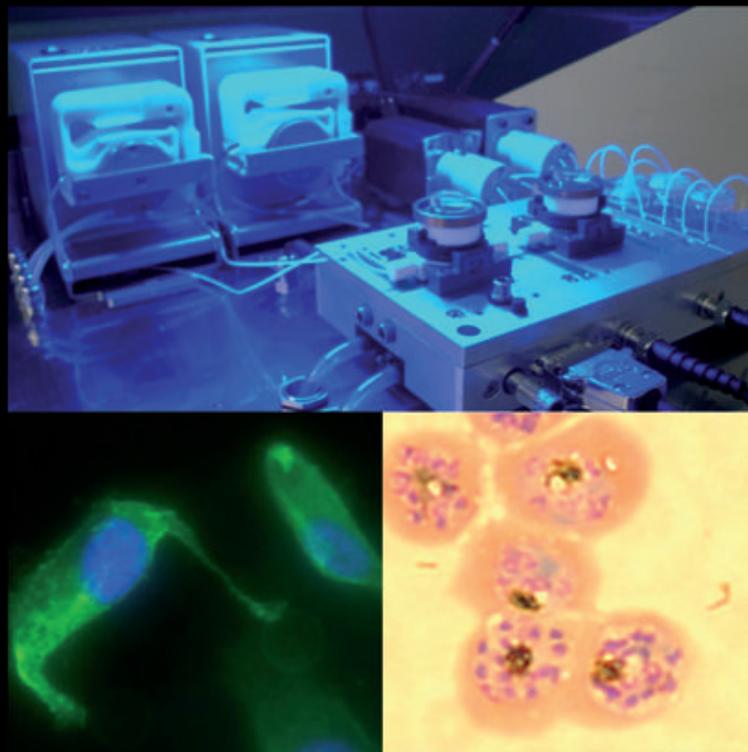


Daniela Kömpf

**Entwicklung eines Schwingquarz-
basierten Assays zur Detektion der
PfEMP1-vermittelten Zytoadhäsion
von *Plasmodium falciparum***



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

**Entwicklung eines Schwingquarz-basierten Assays zur
Detektion der PfEMP1-vermittelten Zytoadhäsion von
*Plasmodium falciparum***

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Daniela Kömpf
aus Böblingen

Tübingen
2011

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2011

Zugl.: Tübingen, Univ., Diss., 2011

978-3-86955-721-2

Tag der mündlichen Qualifikation:	16.02.2011
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hinnak Northoff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Oliver Betz

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2011

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2011

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-721-2

Diese Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin innerhalb der Biosensorik-Gruppe (AG Gehring) des Instituts für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Dr. rer. nat. Frank K. Gehring. Die Begutachtung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. H. Northoff, Universität Tübingen, und Prof. Dr. O. Betz, Universität Tübingen, übernommen.

Kurzfassung

Malaria ist heutzutage nach wie vor die häufigste aller Tropenkrankheiten, die besonders im Fall der Malaria tropica schwerwiegende Krankheitserscheinungen auslösen kann. Bei dieser Form führt die parasitäre Infektion unter anderem zu Schädigungen des Gehirns, Anämien und im Falle der plazentalen Malaria zu Fehlgeburten. Verantwortlich für die Ausbildung derart ernster Symptome ist das ausschließlich bei *Plasmodium falciparum* auftretende Phänomen der Sequestrierung. Dabei adhären späte Blutstadien über verschiedene parasitäre Proteine an das Endothel postkapillärer Venolen und können im peripheren Blut nicht mehr nachgewiesen werden. Der dabei wichtigste Ligand ist das parasitäre Protein *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen auf der Schwingquarzsensitiv basierenden Adhäsionsassay zu entwickeln, um neue Einsichten in den Vorgang der Adhäsion infizierter Zellen bzw. einzelner PfEMP1-Domänen an die Rezeptoren CD36, Chondroitin-Sulfat A (CSA) und ICAM-1 zu gewinnen.

Um dies zu realisieren, wurden verschiedene Schichtsysteme zur Immobilisierung funktionsfähiger Rezeptoren auf den Sensoren entwickelt. Dazu wurden hinsichtlich der Rezeptoren CD36 und ICAM-1 Membranen verschiedener Zelllinien eingesetzt, die diese Rezeptoren trugen. Mit diesen Schichten war es sowohl möglich die spezifische Adhäsion infizierter Zellen an die CD36-tragenden Membranen, als auch die spezifische Bindung einzelner PfEMP1-Domänen an CD36 bzw. ICAM-1 nachzuweisen. Hinsichtlich der Domänen konnten dabei bestehende Kenntnisse bestätigt und neue Kenntnisse gewonnen werden, da neue ICAM-1-bindende Domänen identifiziert werden konnten. Zudem waren unterschiedliche Affinitäten bzw. Bindungsstärken einzelner Domänen für den Rezeptor ICAM-1 festzustellen, was bisher mit konventionellen Methoden nicht möglich ist. Im Hinblick auf die Untersuchung der Adhäsion infizierter Zellen an CSA wurde ein von den in der Malariaforschung gängigen Immobilisierungsmethoden abweichendes CSA-Beschichtungsmodell entwickelt, mit dem eindeutig spezifische Bindungsereignisse nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren war zu verzeichnen, dass die zwischen den infizierten Zellen und den Rezeptoren CD36 und CSA aufgebauten Bindungen unterschiedlich stark ausgeprägt waren.

Die Technologie der Schwingquarz-Biosensorik besitzt konventionellen Methoden gegenüber somit ein enormes Potential für die Malaria-Forschung. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse stellen dabei die Basis für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Sequestrierung, der Diagnostik und der Medikamentenentwicklung dar.

Abstract

Until today, malaria is the most common tropical infectious disease and leads to serious symptoms especially in the case of malaria tropica. Once complicated malaria has established the parasitic infection can generate cerebral impairments as well as anemia and in the case of pregnancy malaria associated abort. The principle reason for the formation of such serious complications is the phenomenon of sequestration, which only occurs in infections with *Plasmodium falciparum*. Thereby late blood stages adhere to the endothelium of postcapillary venules and thus cannot be detected in the peripheral blood stream any longer. The most important ligand in this process is the parasitic protein *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). The aim of the present dissertation was to establish a new assay which allows real-time analysis of the processes involved in adhesion of parasites using a biosensor on the basis of oscillating quartz crystals (QCM).

Therefore different coating systems for immobilization of functionally intact receptors were developed. Concerning CD36 and ICAM-1, membranes of different cell lines expressing these receptors were used. These coatings allowed detection of specific adhesion of infected cells to membranes of CD36-expressing cells as well as specific binding of single PfEMP1 domains to CD36 and ICAM-1. Regarding the domains, existing knowledge could be confirmed. Furthermore new, hitherto unknown ICAM-1 binding domains were identified. In contrast to existing conventional methods, our assay also delivered information on different affinities or binding strengths between the domains and the receptor ICAM-1. In the case of adhesion of infected cells to CSA a new CSA coating system, different from the one commonly used in malaria research for immobilization was developed. Altogether our system enabled the verification of specific binding events, and also yielded information on the variable binding strength between the infected cells and the receptors CD36 and CSA. This is not possible with conventional methods.

So the technology of biosensors based on oscillating crystals exhibits an enormous potential for malaria research. The results gained in the present work are the basis for further investigations on basic research in the range of sequestration processes as well as on diagnostics and drug development.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	iv
1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeine Aspekte der Malaria	1
1.1.1 Malaria – wichtige Fakten	1
1.1.2 Vorkommen und Epidemiologie – früher und heute.....	3
1.1.3 Biologie von <i>Plasmodium sp.</i>	5
1.1.3.1 Systematische Einordnung	5
1.1.3.2 Lebenszyklus.....	6
1.1.3.3 Morphologie, Umwandlung der Erythrozytenmembran	9
1.2 Zytoadhäsion an das Endothel	12
1.2.1 Überblick über die Moleküle auf der Membran infizierter Erythrozyten und deren diverse Rezeptoren	12
1.2.2 <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) & antigene Varianz.....	17
1.2.2.1 Genetik und Aufbau von PfEMP1	17
1.2.2.2 Antigenvariation	19
1.2.3 Die Rezeptoren ICAM-1, CSA und CD36 und deren Bedeutung für die zerebrale und plazentale Malaria	20
1.2.3.1 Zerebrale Malaria	21
1.2.3.2 Plazentale Malaria	23
1.2.3.3 CD36	27
1.3 Bisherige Untersuchungsmethoden der Zytoadhäsion	29
1.4 Biosensorik & Schwingquarze	31
1.4.1 Piezoelektrischer Effekt.....	32
1.4.2 Schwingquarzsensoren	32
1.4.3 Anwendung von Schwingquarzsensoren	35
1.4.4 Sensorplattform FidgeType 1 und deren bisherige Anwendung.....	39
1.5 Zielsetzung.....	41
2. Material und Methoden	43
2.1 Material	43
2.1.1 Parasiten.....	43
2.1.2 C32 amelanotische Melanom-Zellen	44
2.1.3 Chinese hamster ovary-Zellen (CHO)	44
2.1.4 PfEMP1-Domänen	44
2.1.5 Schwingquarze.....	45
2.2 Methoden.....	46

2.2.1 Kultivierung der C32-Zellen.....	46
2.2.2 Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	47
2.2.2.1 Auftauen und Kultivierung.....	48
2.2.2.2 Synchronisierung der Kultur.....	49
2.2.2.3 Selektion der Parasiten auf einen spezifischen Adhäsions-Phänotypen.....	50
2.2.2.4 Akkumulation später asexueller Stadien über magnetic cell sorting (MACS).....	51
2.2.2.5 Einfrieren der Parasitenkultur.....	51
2.2.3 Schichtentwicklungen.....	52
2.2.3.1 Reinigung der Sensoroberfläche.....	52
2.2.3.2 Basisbeschichtungen der Sensoroberfläche.....	52
2.2.3.3 CD36-Immobilisierung.....	53
2.2.3.4 CSA-Immobilisierung.....	55
2.2.3.5 ICAM-1-Immobilisierung.....	56
2.2.3.6 Immunfluoreszenztest (IFT).....	56
2.2.3.7 QCM-Messungen zur Überprüfung der Schichten.....	59
2.2.3.8 Externe Anbindung von iRBCs an CD36 und CSA.....	60
2.2.4 Messungen zur Zytoadhäsion mit iRBCs.....	61
2.2.4.1 Langzeitmessung über nahezu 24 Stunden.....	62
2.2.4.2 Adhäsionsassay mit höherer Zelldichte („Kurzzeitmessung“).....	63
2.2.4.3 Messungen mit einem geschlossenen fluidischen System.....	64
2.2.5 Kontrollmessungen mit Erythrozytenkonzentrat.....	64
2.2.6. Prüfung der Spezifität der Standardmethode bzgl. CSA.....	65
2.2.7 Adhäsionsmessungen mit PfEMP1-Domänen.....	66
2.2.8 Auswertung der QCM-Messungen.....	67
2.3 Verwendete Materialien. Lösungen und Geräte.....	68
2.3.1 Materialien und Lösungen.....	68
2.3.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungen.....	68
2.3.1.2 Zellkultur und fraktionelle Zentrifugation.....	69
2.3.1.3 Quarze und Beschichtungen.....	72
2.3.1.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	72
2.3.1.5 QCM-Messungen.....	73
2.3.2 Geräte.....	74
3. Ergebnisse.....	75
3.1 Immobilisierung von CD36.....	75
3.1.2 Überprüfung der PLL-Schicht mittels QCM-Messungen.....	78
3.2 Immobilisierung von CSA.....	80
3.2.1 Immobilisierung von biotinyliertem CSA (bCSA) über NeutrAvidin (NAV).....	80
3.2.2 Immobilisierung von CSA auf Polystyrol (PS).....	81
3.2.3 Immobilisierung von CSA über Poly-L-Lysin (PLL).....	81
3.3 Externe Anbindung von iRBCs an CD36/CSA.....	83

3.4 Nachweis der Zytoadhäsion von 3D7 und FCR3-CD36 an CD36.....	86
3.4.1 Ergebnisse der Langzeitmessungen über Nacht	87
3.4.2 Ergebnisse des verkürzten Adhäsionsassays.....	89
3.4.3 Ergebnisse der Messungen mit geschlossener Fluidik	90
3.5 Nachweis der Zytoadhäsion von FCR3-CSA an CSA.....	93
3.5.1 Ergebnisse der Langzeitmessungen über Nacht an bCSA bzw. CSA.....	93
3.5.2 Ergebnisse des verkürzten Adhäsionsassays.....	98
3.5.3 Kontrollmessungen zur Prüfung der Spezifität	99
3.5.4 Ergebnisse der Messungen mit geschlossener Fluidik	102
3.6 Vergleich des Bindungsverhaltens an CD36 und CSA.....	104
3.7 Ergebnisse der Kontrollmessungen mit Erythrozytenkonzentrat	105
3.8 Überprüfung der Standardmethode zur CSA-Zytoadhäsion	107
3.9 Detektion der Bindung einzelner PfEMP1-Domänen an CD36 bzw. ICAM-1	108
4. Diskussion.....	113
5. Zusammenfassung und Ausblick	129
Literaturverzeichnis	133
Danksagung	145
Lebenslauf	147

Abkürzungsverzeichnis

ATS	Acidic Terminal Segment
bBSA	biotinyliertes BSA
bCSA	biotinyliertes CSA
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CD	Cluster Determinants
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIDR	Cystein-Rich Interdomain Region
CLAG	Cytoadherence-Linked Asexual Gene protein
CR	Complement Receptor
CS	Chondroitin-Sulfat
CSA	Chondroitin-Sulfat A
CSC	Chondroitin-Sulfat C
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenyindolilactate
DBL	Duffy binding like
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELAM	Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FBS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm, bzw. Gravitationskonstante
GalNAc	n-Acetylgalactosamin
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GuHCl	Guanidin Hydrochlorid
H	Hämozoin
HA	Hyaluronsäure
HexA	Hexuronsäure
HS	Heparan-Sulfat
HSA	Humanes SerumAlbumin
Hz	Hertz

ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
IFN γ	Interferon γ
IFT	Immunfluoreszenztest
IL-1	Interleukin-1
iRBC	infizierter Erythrozyt (infected Red Blood Cell)
KAHRP	Knob-Assoziiertes Histidin-Reiches Protein (knob-associated histidine-rich protein)
kb	Kilobasen
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogen-phosphat
LFA	Leukocyte Function Antigen
M	C32-Membran bzw. Merozoit
MACS	MAGnetic Cell Sorting
MHz	Megahertz
MW	Molekulargewicht
N	Nukleus/Zellkern
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	di-Natriumhydrogen-phosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOCl	Natriumhypochlorit
NAV	NeutrAvidin
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NEAA	Non-Essential Amino Acids
NO	Stickstoffmonoxid
NTS	Nicht Translatierte Sequenz
PAM	Schwangerschafts-assoziierte Malaria (Pregnancy-Associated Malaria)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM-1	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PFA	Paraformaldehyd
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PfEMP3	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 3
PLL	Poly-L-Lysin
PS	Polystyrol
PV	Parasitophore Vakuole

QCM	Quarzmikrowaage (Quartz Crystal Microbalance)
R	Rosette bzw. Autoaggregat
REM	Rasterelektronenmikroskop
Rif	Repetitive Interspersed Family
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
S	Schizont
SAM	Self-Assembling Monolayer
Stevor	sub-telomeric open reading frames
T	Trophozoit
TARE	Tandem-Assoziiertes Repeat-Element
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TM	Transmembrandomäne
TNF α	Tumor Nekrose-Faktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tris HCl	Trizma Hydrochlorid
TSP	Thrombospondin
TZA	Tochterzellanlage
uiRBC	nicht infizierter Erythrozyt (uninfected red blood cell)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VSG	Variant Surface Glycoprotein
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der beim Malaria-Erreger *Plasmodium (Laveriana) falciparum* (Welch 1897) auftretenden Zytoadhäsion an das Endothel mittels Schwingquarzsensoren. In den folgenden Kapiteln werden die dieser Arbeit zugrunde liegenden theoretischen Grundlagen erläutert. Aufgrund der Komplexität der Malaria-Biologie werden zunächst allgemeine Aspekte der Malaria dargestellt. Im Folgenden wird detaillierter auf die bei der Malaria tropica auftretende Zytoadhäsion eingegangen. Die letzten beiden Unterkapitel befassen sich mit den bisher in der Malaria-Forschung eingesetzten Untersuchungsmethoden bzgl. der Zytoadhäsion sowie mit einer ausführlicheren Beschreibung der in diesem Bereich neuartigen Schwingquarzsensoren.

1.1 Allgemeine Aspekte der Malaria

Um einen Einblick in die Parasitose zu bekommen, befassen sich die folgenden Abschnitte mit einer allgemeinen Einführung in die Krankheit der Malaria. Daran schließt sich eine Erläuterung der Historie und Epidemiologie, als auch der Biologie der entsprechenden Krankheitserreger im Allgemeinen.

1.1.1 Malaria – wichtige Fakten

Bei der Krankheit Malaria (früher bekannt als Sumpf- oder auch Sommerfieber) handelt es sich um eine Parasitose, die heutzutage von den Industrieländern aufgrund des fehlenden Auftretens in gemäßigten Gebieten relativ unbeachtet ist und auch unterschätzt wird. Dabei ist diese Krankheit regelmäßig mit schweren Symptomen oder Tod verbunden. Zu diesen schweren Symptomen sind Hypoglykämie, Atemnot, Kreislaufkollaps und Schock, Störungen im Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt, „Schwarzwasserfieber“ (verursacht durch Nierenversagen) und Blutgerinnungsstörungen (disseminierte intravaskuläre Blutgerinnung, spontane Blutungen) zu zählen [1-4]. Ernste Folgen davon sind Schädigungen des Nervensystems (Gehirn), schwere Anämien und, bezogen auf die plazentale Malaria, Abort. All diese Symptome manifestieren sich auf verschiedenste Art und Weise und beeinflussen sich gegenseitig, wodurch sich das Krankheitsbild mannigfaltig darstellen lässt (s. Abbildung 1).

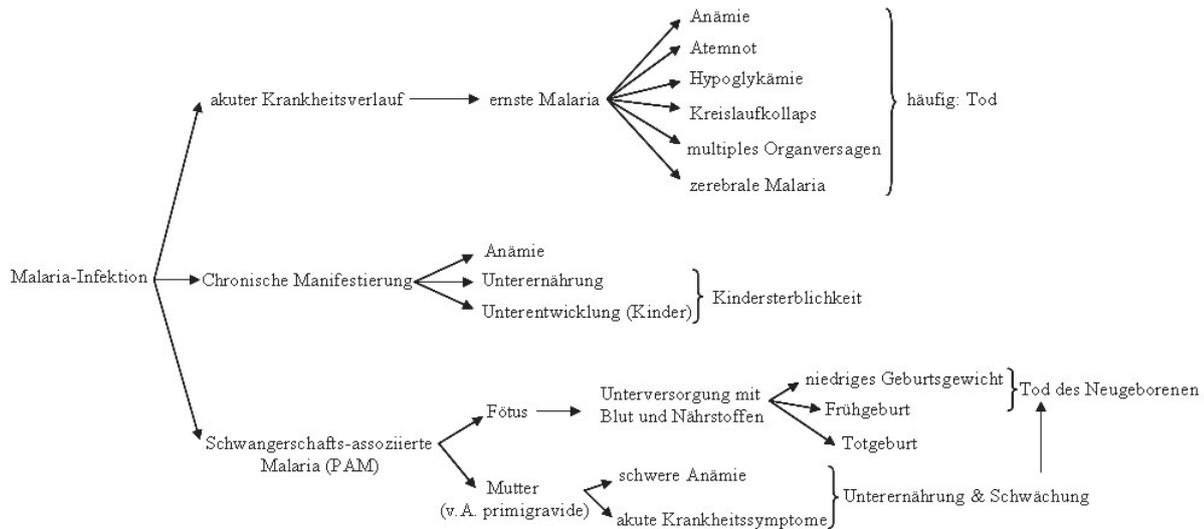


Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Ausprägungsformen der Malaria, modifiziert nach [5].

Die Zahl der infizierten Menschen pro Jahr wird auf etwa 10-500 Millionen geschätzt, und es sterben etwa 2,7 Millionen jährlich an dieser Parasitose. Besonders betroffen sind hierbei Kinder im Alter von 0-5 Jahren, Schwangere, sowie nicht immune Reisende. Etwa 70-90% der weltweiten Erkrankungen an Malaria treten in Afrika auf, etwa 25% der Erkrankungen sind in Süd-Ost-Asien anzufinden (s. Abbildung 2), wobei die Sterberaten in Afrika bedeutend höher sind als in Süd-Ost-Asien und dem West-Pazifik [1, 3, 5-7].

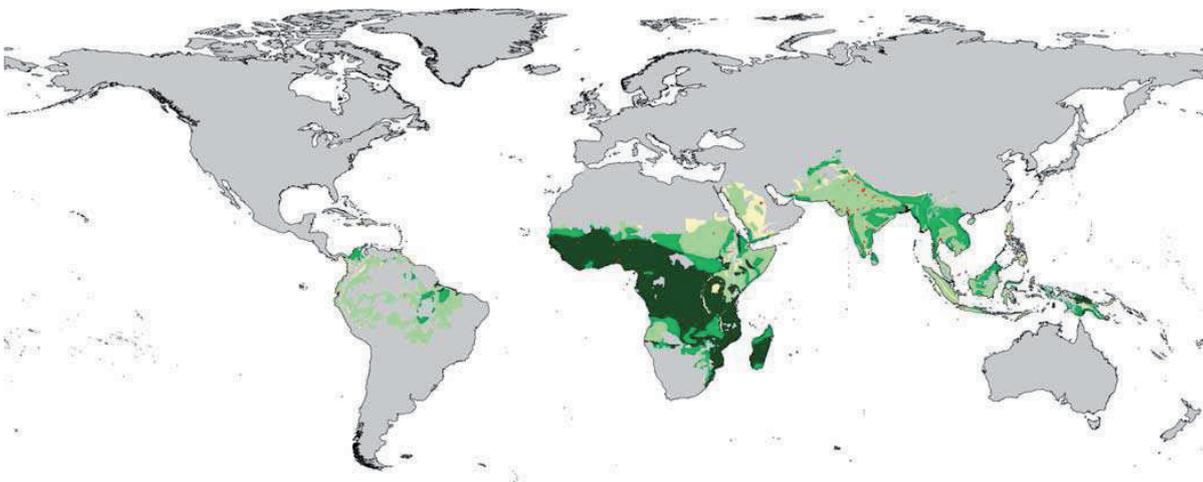


Abbildung 2: Heutige Verbreitung der Malaria. Dargestellt sind die verschiedenen Endemiegebiete; hellgrün: hypoendemisch (Infektionsrate unter 10%), mittelgrün: mesoendemisch (Infektionsraten zwischen 11 und 50%), dunkelgrün: hyper- und holoendemisch (Infektionsraten $\geq 50\%$), gelb: nicht klassifiziert, grau: kein Infektionsrisiko [7].

Eine Besonderheit dieser Parasitose ist eine sog. Semiimmunität, die auf ständigen Infektionen beruht. Daher ist in Endemiegebieten häufig nur ein kleiner Teil der Infizierten von der Ausbildung schwerer, ernster Komplikationen betroffen, auf die im Kapitel 1.2.3 näher eingegangen wird [8]. Bleiben diese wiederkehrenden Infektionen aus, endet diese Form der Immunität. Die aggressivsten Formen der Malaria tropica treten charakteristischerweise in hoch endemischen Gebieten (Gebiete, in denen die Zahl der Fälle meist konstant ist) auf, da hier die Menschen bedeutend mehr Stiche infizierter Moskitos zu ertragen haben als in weniger endemischen Gebieten [9, 10].

Interessant ist auch, dass bestimmte Bluterkrankungen einen gewissen Schutz bilden, weil sich die Parasiten in den Erythrozyten nicht mehr entwickeln oder diese erst gar nicht befallen können. Zu diesen Krankheiten gehört zum einen die Sichelzellenanämie, die in homozygoter Form letal ist, jedoch in heterozygoter Form in Afrika besonders häufig vorkommt. Weiter sind Thalassämie und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel in endemischen Malaria-Gebieten weit verbreitet [5, 11-13]. Auch scheint sich ein leichter Selektionsvorteil für die Blutgruppe 0 im Vergleich zur Blutgruppe A herausgestellt zu haben. Denn es ist auffällig, dass in Gebieten mit Malaria die Blutgruppe 0 gehäuft vorkommt als die Blutgruppe A, in den heute Malaria-freien Gebieten ist dagegen vermehrt die Blutgruppe A etabliert [12].

1.1.2 Vorkommen und Epidemiologie – früher und heute

Auch wenn heute die Malaria ein Problem besonders in Afrika, Südamerika und Süd-Ost-Asien darstellt, darf im Zeitalter der globalen Erwärmung nicht vergessen werden, dass diese Krankheit in Europa und den USA erst vor 40 Jahren endgültig ausgerottet wurde.

Die Epidemiologie der Krankheit ist immer abhängig von Ökologie und Verhalten sowohl des Wirts (also des Menschen) als auch des Überträgers. Daher hängt die regionale Verbreitung der Malaria unmittelbar mit dem Lebensraum des Vektors *Anopheles* zusammen. So waren z.B. in Albanien Gebiete 0-600m über dem Meeresspiegel besonders stark von Malaria betroffen, höhere Lagen (1201-2700m) hingegen nicht mehr, da hier keine Überträger mehr vorzufinden sind. Einen weiteren Gesichtspunkt stellt wahrscheinlich auch der Immunstatus des Wirts, bzw. der ganzen Wirtpopulation dar.

Auch haben verschiedene klimatische Bedingungen wie Temperatur, Regenhäufigkeit und Luftfeuchtigkeit eine Auswirkung auf den Grad der Ausbreitung der Parasitose. Entscheidend für das Überleben des Vektors sind milde Winter bzw. das Vorhandensein warmer menschlicher Behausungen, weshalb die Malaria trotz teils eisiger Winter mit Temperaturen unter -51°C (Lapland) in Europa vorkam. Somit könnte die Temperatur in manchen europäischen Ländern lediglich ein limitierender Faktor in Bezug auf die Entwicklung der

Parasiten in den Vektoren sein (vgl. Tabelle 1), denn je kälter die Außentemperatur, desto langsamer geht die Entwicklung in der *Anopheles*-Mücke vonstatten.

Eine erstmalige Beschreibung der Krankheit erfolgte durch Hippokrates (460-370 v. Chr.), der bereits die charakteristischen Fieberschübe beobachten konnte. Darauf basierend beschrieb dann Celsus (25 v. Chr. – 54 n. Chr.) seinerseits verschiedene Formen der Malaria, wie in Tabelle 1 dargestellt: tertiana, quartana und semitertiana (heute: tropica). Bereits im antiken Rom wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Krankheit hauptsächlich in den Sommermonaten und dem Vorhandensein stehender Gewässer hergestellt. Da allerdings davon ausgegangen wurde, dass die Ursache der Krankheit in den Ausdünstungen der Gewässer und Sümpfe, also der schlechten Luft (mal'aria) lag, erhielt diese ihren bis heute noch feststehenden Namen.

Art	Typus	Abstand: Fieber- anfälle	Alter der parasitierten Erythrozyten	Ausbildung ernster Komplikationen	Entwicklungs- zeit in der Mücke
<i>P. vivax</i>	Tertiana	48h, synchron	jung (Reticulozyten)	-	20°C: 15-16d; 28°C: 8-10d
<i>P. ovale</i>	Tertiana	48h, synchron	jung (Reticulozyten)	-	?
<i>P. malariae</i>	Quartana	72h, synchron	reif	-	20°C: 30-35d; 28°C: ≥14d
<i>P. falciparum</i>	Semitertiana / Tropica	48h, nicht synchron	alle	+++	20°C: 22d; 28°C: 9-10d

Tabelle 1: Charakteristika der verschiedenen *Plasmodium*-Arten, kombiniert nach [11, 14, 15]

Aufgrund der verbesserten hygienischen Verhältnisse, der verbesserten Versorgung mit Medikamenten und Veränderungen in der Landwirtschaft, welche einen negativen Einfluss auf die Brutbedingungen der Überträger hatten, war die Krankheit in Europa bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts verschwunden [5, 11, 13, 14, 16-22].

Das Vorkommen der humanpathogenen Malaria-Erreger konzentriert sich heutzutage auf feucht-warme Länder zwischen dem 40. Grad nördlicher und dem 30. Grad südlicher Breite, also auf die Tropen und Subtropen (s. Abbildung 2). In Bezug auf die Vektoren ist zu erwähnen, dass es weltweit etwa 400 bekannte *Anopheles*-Arten gibt, von denen lediglich 60 Arten als Überträger fungieren können. Im Vergleich dazu existieren in Europa etwa 18 Arten, die teilweise Überträgerpotential besitzen. Besondere Bedeutung kommt heute dem *An. gambiae*-Komplex zu, der in Afrika zu finden ist.

Die Entwicklung der verschiedenen *Anopheles*-Arten ist in Abbildung 3 dargestellt. Diese ist immer wassergebunden, wobei ruhige oder langsam fließende Gewässer (Süß- oder Salzwasser) als Brutgewässer bevorzugt werden. Hierbei legt das Weibchen die Eier einzeln auf der Wasseroberfläche ab und die daraus schlüpfenden Larven grasen diese während der Nahrungssuche ab. Auch die Metamorphose über die bewegliche Puppe findet im Wasser statt.

Aufgrund der dort herrschenden und für die Überträger optimalen Entwicklungsbedingungen sind daher heutzutage feucht-warme Gebiete bzgl. des Vorkommens der Plasmodien besonders stark betroffen [5, 11, 17, 23].

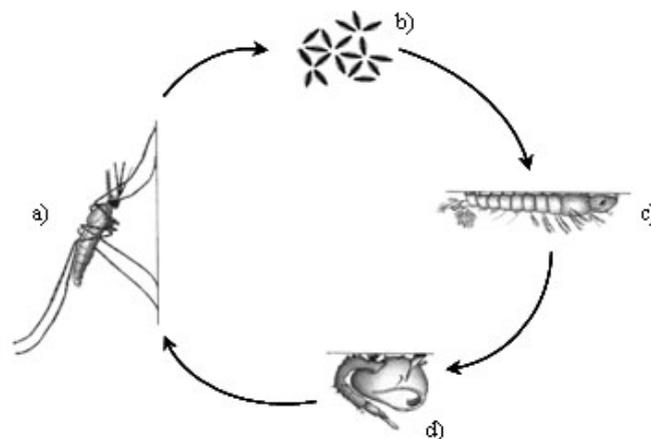


Abbildung 3: Lebenszyklus von *Anopheles sp.* [15]. Die Entwicklung dieser Mücken ist immer an Gewässer gebunden. So legt das adulte Weibchen **a)** die Eier **b)** einzeln auf der Oberfläche stehender oder nur sehr langsam fließender Gewässer ab. Die geschlüpfen Larven **c)** heften sich waagrecht an die Wasseroberfläche an und grasen diese ab. Die Metamorphose im Puppenstadium **d)** findet ebenfalls im Wasser statt.

1.1.3 Biologie von *Plasmodium sp.*

1.1.3.1 Systematische Einordnung

Bei den Erregern der Malaria handelt es sich um einzellige Parasiten, die dem Stamm der Alveolata und dort dem Unterstamm Apicomplexa zuzuordnen sind. Hierbei handelt es sich ausschließlich um obligat intrazelluläre Endoparasiten. Weiterhin werden die Parasiten in die Klasse der Haematozoa [15], die Ordnung der Haemosporida und dort in die Familie der Plasmodiidae eingeordnet. Neben der Gattung *Plasmodium* umfasst die Familie der Plasmodiidae zudem die beiden Gattungen *Leukozytozoon* (Parasiten von Vögeln) und *Haemoproteus* (Parasiten von Vögeln und Reptilien). Charakteristisch für die Haemosporiden ist die Besiedlung von Blutkörperchen und die Übertragung durch Arthropoden auf

Wirbeltiere [24]. Das bedeutet, dass diese Parasiten heteroxen zwischen blutsaugenden Dipteren (Endwirt) und Wirbeltieren wie Säuger, Reptilien und Vögel (Zwischenwirt) wechseln.

Die medizinisch größte Bedeutung unter den Haematozoa besitzen die Plasmodien, da hierzu die Erreger der Malaria beim Menschen und bei Primaten zu zählen sind. Bei den humanpathogenen *Plasmodium*-Arten gibt es mit Ausnahme weniger Affenarten kein Erregerreservoir, d.h. die Parasiten werden nur von Mensch zu Mensch übertragen, Vektoren sind immer weibliche *Anopheles*-Mücken. Insgesamt gibt es 4 humanpathogene *Plasmodium*-Arten: *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium vivax* und *ovale*, die Erreger der Malaria tertiana, und *Plasmodium malariae*, der Erreger der Malaria quartana (s. auch Tabelle 1). Die aggressivste Art ist dabei *Plasmodium falciparum*.

1.1.3.2 Lebenszyklus

Der recht komplexe Lebenszyklus der Plasmodien, schematisch dargestellt in Abbildung 4, lässt sich wie bei allen Apicomplexa in 3 Abschnitte gliedern. Dabei erfolgt ein Generationswechsel von der ungeschlechtlichen Schizogonie, gefolgt von der geschlechtlichen Gamogonie bis zur wiederum ungeschlechtlichen Sporogonie. Da hierbei die meisten Stadien haploid sind, zählen die gesamten Apicomplexa zu den Haplonten. Das einzige diploide Stadium ist die Zygote.

Der Zyklus der Plasmodien beginnt mit dem Stich der weiblichen *Anopheles*-Mücke. Diese injiziert bei der Blutmahlzeit mit ihrem Speichel zwischen 10 und 100 Sporozoiten in die menschliche Blutbahn, die jedoch bereits nach spätestens 30 Minuten aus dem Blut in die Leber einwandern. Dabei werden zunächst mehrere Leberparenchymzellen sowie Kupffer'sche Sternzellen durchwandert, bevor die Parasiten in eine letzte Leberparenchymzelle eindringen. Dort findet die sogenannte exoerythrozytäre Schizogonie statt, die nach 6-16 Tagen mit der Bildung von bis zu 30.000 Merozoiten (im Fall von *Plasmodium falciparum*) endet. Eine Besonderheit hierbei tritt bei den Arten *P. vivax* und *P. ovale* auf, denn dort werden in der Leber so genannte Ruhestadien (Hypnozoiten) gebildet, die erst nach mehreren Monaten oder Jahren weiter heranreifen.

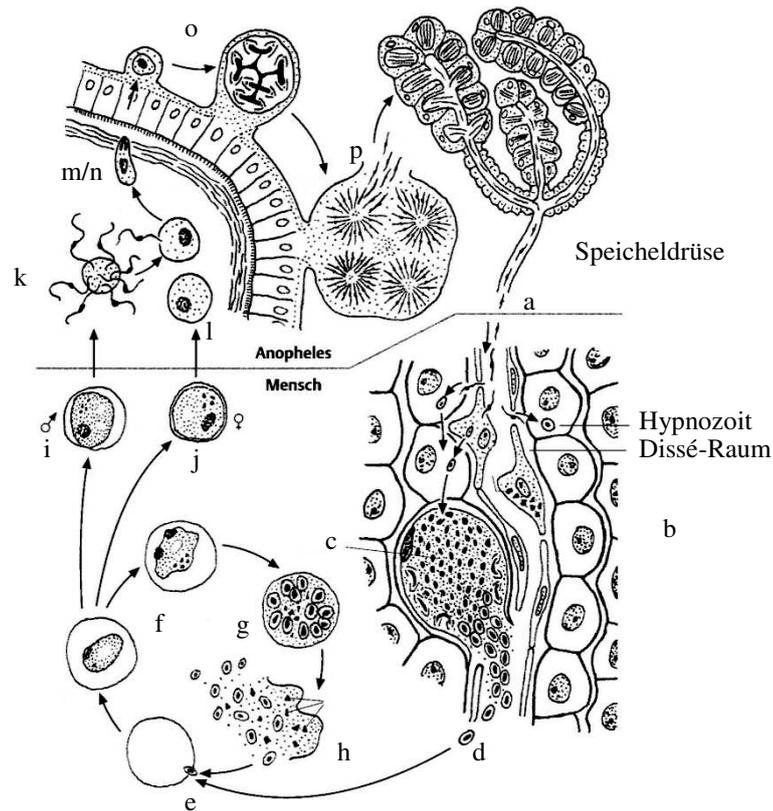


Abbildung 4: Lebenszyklus von *Plasmodium sp.* [25]

a: Sporozoit; **b:** exoerythrozytäre Phase, **c:** Leberschizont; **d-e:** Merozoit und Erythrozyteninvasion; **e-h:** erythrozytäre Schizogonie (**f:** Siegelringstadium/Trophozoit, **g:** Schizont, **h:** Merozoitenfreisetzung); **i:** Mikrogametozyt; **j:** Makrogametozyt; **i-m:** Gamogonie (**k:** Bildung von Mikrogameten **l:** Makrogamet, **m:** Zygote); **n:** Ookinete; **o-p:** Sporogonie (**p:** reifer Sporoblast mit Freisetzung von Sporozoiten, die in die Speicheldrüse wandern).

Nach dieser exoerythrozytären Schizogonie werden die gebildeten Merozoiten freigesetzt, die schließlich in Erythrozyten eindringen. Dieser Invasionsvorgang dauert hierbei lediglich 30 Sekunden [2]. In den befallenen Erythrozyten entwickeln sich die Parasiten zunächst über das Siegelringstadium zum ebenfalls einkernigen Trophozoiten weiter. Die Siegelringstadien und auch die Trophozoiten ernähren sich vom Zytoplasma der Wirtszelle. Durch den Verdau des Hämoglobins durch den Parasiten entsteht das sog. Malaria-Pigment, das aus Eisen und Proteinresten des Erythrozyten besteht. Die Trophozoiten entwickeln sich schließlich weiter zu Schizonten, wo durch eine viermalige Kernteilung ein Synzytium entsteht. Dieser Vorgang wird als typische Schizogonie bezeichnet, da sich die Tochterkerne an der Peripherie der Zelle anordnen, wo sie sich ein letztes Mal teilen. Bereits während dieser letzten Kernteilung entwickeln sich je 2 Tochterzellen über jedem Zellkern (s. Abbildung 5). Auch wird jetzt das Hämoglobin fast vollständig aufgebraucht, während zunehmend mehr Hämozoïn-Kristalle in die Pigment-Vakuole eingelagert werden. Dadurch entsteht eine kompakte Masse an

aufkonzentriertem Hämozoïn, was auch als Restkörper bezeichnet wird. So werden in der erythrozytären Schizogonie jeweils zwischen 16-24 Merozoiten pro Schizont hervorgebracht. Diese erythrozytäre Schizogonie wird wiederholt, aber im Fall von *Plasmodium falciparum* nicht synchronisiert.

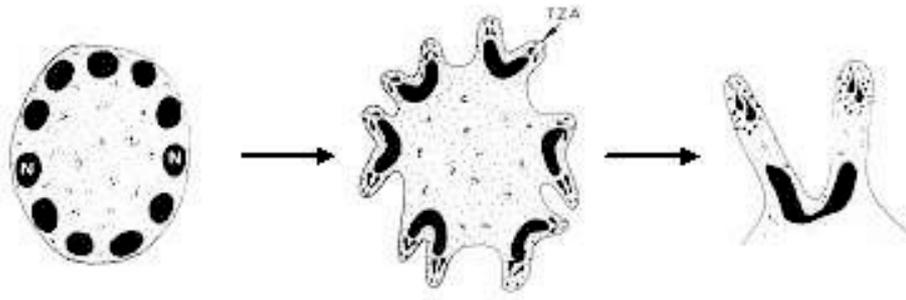


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Schizogonie, ausgehend von einem mehrkernigen Schizonten bis zur Ausbildung von je 2 Tochterzellanlagen (TZA) über jedem Kern (N) während der letzten Kernteilung [15].

Bei *Plasmodium falciparum* gibt es zudem die Besonderheit, dass die infizierten Erythrozyten nur etwa 8 Stunden im peripheren Blut zirkulieren, d.h. die Trophozoiten-befallenen Erythrozyten setzen sich in den Kapillaren diverser Organe fest. Dieses für die Krankheit bedeutende und in der vorliegenden Arbeit untersuchte Phänomen wird im Kapitel 1.2 ausführlicher dargestellt.

Nach einer wiederholten Generationenfolge von asexuellen Stadien dringt ein Teil der Merozoiten in Erythrozyten ein und entwickelt sich im ersten Teil der Gamogonie zu Mikro- und Makrogametozyten (Gamonten), die einzigen sexuellen Stadien von *Plasmodium sp.*

Über diese Stadien erfolgt der Wirtswechsel vom Menschen auf die Mücke, da sich die *Anopheles*-Mücke über die Aufnahme von Erythrozyten, die diese Gamonten enthalten, infiziert. Im Darm der Mücke werden diese Stadien freigesetzt. Im Mitteldarm entwickeln sie sich weiter zu reifen Mikro- und Makrogameten, die jeweils zu einer Zygote verschmelzen. Die nun diploide Zygote entwickelt sich zu einem beweglichen Ookinet. Dieser penetriert die peritrophische Membran (eine dünne Substanz, die vom Mitteldarmepithel abgeschieden wird, und für Organismen schwer zu durchdringen ist) des Moskito-Darms mittels Chitinase, bevor er durch das Darmepithel migriert und sich zwischen Darmepithel und Basalmembran als Oozyste ansiedelt. In der Oozyste findet anschließend die wiederum ungeschlechtliche Sporogonie statt, die über eine Reduktionsteilung zur Bildung der Sporoblasten und letztlich zur Bildung von mehreren Tausend Sporozoiten führt. Die Sporozoiten gelangen über die

Haemolymph in die Speicheldrüsen der *Anopheles*-Mücke und werden bei der nächsten Blutmahlzeit auf den Zwischenwirt übertragen [15, 25-27].

Neben den bereits erwähnten Unterschieden im Lebenszyklus der 4 humanpathogenen *Plasmodium*-Arten gibt es auch Unterschiede in der Spezifität hinsichtlich der Wirtszellen. Im Fall von *P. vivax* und *P. ovale* werden bevorzugt unreife Erythrozyten, sogenannte Reticulozyten, befallen. *P. malariae* hingegen befällt reife Erythrozyten, *P. falciparum* befällt Erythrozyten jeden Alters (vgl. Tabelle 1) [2, 9]. Auch treten bei *P. falciparum* gehäuft Mehrfachbefälle von Erythrozyten mit Parasiten auf.

1.1.3.3 Morphologie, Umwandlung der Erythrozytenmembran

Da sich diese Arbeit mit den späten asexuellen Blutstadien von *P. falciparum* befasst, wird hier auch nur deren Morphologie und Ultrastruktur dargestellt. Lediglich ein morphologisches Merkmal, das bei der Invasion eines Erythrozyten durch den Merozoiten oder auch bei der Invasion einer Leberzelle durch einen Sporozoiten entsteht, sei erwähnt: die parasitophore Vakuole (PV). Diese entsteht während des Befalls der Zelle. Der Vorgang des Befalls ähnelt dabei der Endocytose, d.h. die Wirtszellmembran schließt sich um den Parasiten, der schließlich in der gebildeten Vakuole liegt. In dieser PV findet letztlich die jeweilige Schizogonie statt, d.h. der Parasit ist stets von der PV umgeben.

Zwischen dem Ring- und dem Trophozoitenstadium liegt der hauptsächlichste Unterschied in der Größe und Form. Der innere Aufbau ist weitestgehend gleich. Da mit zunehmender Entwicklung mehr parasitäre Proteine ins Zytoplasma und in Richtung Membran der Wirtszelle transportiert werden (s. unten), nimmt die Anzahl der Ribosomen im Parasiteninnern zu, und das endoplasmatische Reticulum (ER) dehnt sich zunehmend aus. Auch der Golgi-Apparat, der in der Nähe des Zellkerns lokalisiert ist, wird ständig vergrößert. Durch die Größenzunahme des Parasiten wird auch der Raum zwischen PV und Parasitenmembran immer geringer. Des Weiteren werden vermehrt Membrangebilde hervorgebracht, die weit in die Substanz des Erythrozyten vordringen und teilweise an die Unterseite der Erythrozytenmembran andocken; ein endgültiger Durchbruch findet allerdings nicht statt. Unter dem Mikroskop werden diese Strukturen als Maurers Spalten erkennbar (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7).

Im Schizontenstadium werden letztlich alle Organellen entsprechend vervielfacht, da die Hauptfunktion dieser Stadien darin liegt, viele Tochterindividuen hervorzubringen. Auch werden die für die Invasion der Erythrozyten notwendigen Organellen des Apikalkomplexes

(Rhoptrien, Micronemen,...) der Merozoiten, die nach dem Erythrozytenbefall nicht mehr vorhanden waren, neu synthetisiert (s. Abbildung 6) [27].

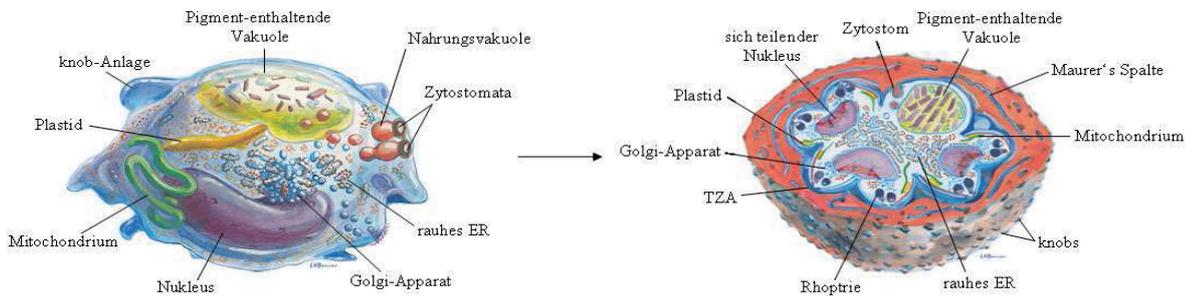


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Morphologie eines Trophozoiten (links) und eines Schizonten (Querschnitt, rechts), aus [27]. Der Übergang vom „Fressstadium“ zum Tochterzellen bildenden Stadium ist deutlich gekennzeichnet durch die vermehrte Neubildung der verschiedenen Organellen.

Wie bereits erwähnt, wird während der Entwicklung des Parasiten zunehmend die Membran der Wirtszelle umgestaltet. Um eine Vorstellung von den massiven Veränderungen der Erythrozyten-Struktur durch den Parasiten zu bekommen, ist es zunächst wichtig, den Grundaufbau der Wirtszelle vor Augen zu haben. Prinzipiell handelt es sich bei Erythrozyten um „Säcke“ aus Hämoglobin, die dem Transport von O_2 und CO_2 dienen. Im Laufe der Evolution haben diese Zellen bei den Säugetieren ihren Zellkern verloren, der bei Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln noch vorhanden ist. Dadurch sind diese Zellen nicht mehr in der Lage selbst Proteine zu synthetisieren. Ihre Lebensspanne beträgt etwa 100 Tage, in denen sie etwa 1 Millionen Mal den gesamten Kreislauf passieren. Besonders gekennzeichnet sind Erythrozyten durch ihre enorme Elastizität und Flexibilität, da sie mit ihren etwa $7\mu m$ (Durchmesser) z.T. sehr enge Stellen passieren müssen, wie z.B. die $1-2\mu m$ kleinen Spalten zwischen dem Milzmark und dem Venensinus. Bereits kurz nach der Invasion der Merozoiten in die Erythrozyten finden Veränderungen des Zytoskeletts statt, worauf hier jedoch nicht näher eingegangen wird, da sich diese Arbeit mit den späten asexuellen Stadien befasst [28, 29].

So ist bei den späten Blutstadien das Auftreten einiger tausend knopfähnlicher Erhebungen („knobs“) der Wirtszellmembran charakteristisch. Dabei handelt es sich um elektronendichte, $30-40nm$ bzw. $5-10nm$ hohe Wölbungen mit einem Durchmesser von etwa $100nm$ [30-32]. Diese kommen mit einer Dichte von etwa $10-35$ „knobs“/ μm^2 im Trophozoitenstadium bzw. von $45-70$ „knobs“/ μm^2 im Schizontenstadium vor. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die bereits erwähnte Anheftung an die Kapillaren direkt über diese „knobs“ erfolgt (vgl. dazu Abbildung 7). Dabei wird vermutet, dass die in dem

ansonsten negativ geladenen Plasmalemma der Erythrozyten liegenden positiv geladenen Strukturen über Ladungsdifferenzen an die negativ geladenen Endothelmembranen anbinden [32].

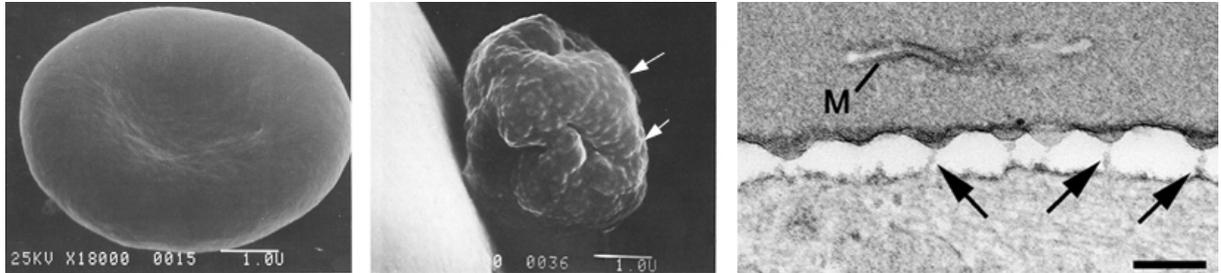


Abbildung 7: Raster- und Transmissionselektronenmikroskopische (REM/TEM) Aufnahmen von „knobs“. Links dargestellt ist ein nicht infizierter Erythrozyt (uiRBC) mit einer glatten Oberfläche und der typischen diskoidalen Gestalt. Das mittlere Bild zeigt einen eher kugelförmigen infizierten Erythrozyten (iRBC, Schizontenstadium) mit zahlreichen kleinen Erhebungen auf der Membran, den „knobs“ (weiße Pfeile); Balken: 1µm. Das rechte Bild zeigt eine TEM-Aufnahme der Kontaktzone zwischen einem iRBC (oben) und einer Endothelzelle (unten). Neben von den „knobs“ ausgehenden Verbindungssträngen (schwarze Pfeile) ist hier eine Maurerspalte (M) zu erkennen; Balken: 100nm; aus [31, 33].

Diese „knobs“ enthalten größtenteils knob-assoziierte Histidin-reiche Proteine (KAHRP), welche über das Aktin und Spektrin des Zytoskeletts der Wirtszelle interagieren. Über dieses KAHRP sind letztlich weitere parasitäre Proteine, wie das *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), verankert, die dadurch der Umgebung präsentiert werden können. Neben KAHRP sind in den „knobs“ weiterhin das Protein PfEMP3 und das mature infected erythrocyte surface antigen (MESA) lokalisiert. MESA interagiert dabei ebenfalls mit dem Zytoskelett der Wirtszelle, welche Bedeutung diesem Protein jedoch zukommt ist noch ungeklärt. Unbekannt ist ebenso die Funktion von PfEMP3, das nicht nur in „knobs“ vorkommt, sondern weit verbreitet unter der Erythrozytenmembran vorliegt. Es wird jedoch angenommen, dass es an dem Einbau von PfEMP1 in die Membran beteiligt ist. Die Bedeutung des Proteins PfEMP1 ist in Kapitel 1.2 ausführlich erläutert [3, 25, 28, 31, 33-37]. Eine weitere morphologische Besonderheit infizierter Erythrozyten sind die bereits erwähnten Maurerspalten. Dabei handelt es sich um flache Organellen/Cisternae, die über röhrenartige Verbindungen mit der Zellmembran verbunden sind [28, 38]. Diese Organellen fungieren als Schleusen für die Versorgung der Parasiten mit Nährstoffen aus dem Blutstrom und für den Transport der parasitären Proteine Richtung Erythrozytenmembran [39, 40]. Mit diesen Organellen verbunden ist auch das bereits erwähnte PfEMP3, worüber der Transport dieses

Proteins zur Erythrozytenmembran und dessen Integration unter der selbigen über das Zytoskelett gewährleistet ist [37].

1.2 Zytoadhäsion an das Endothel

Ein ausschließlich bei *P. falciparum* vorkommendes Phänomen ist die über das *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) vermittelte Zytoadhäsion später Blutstadien, also älterer Trophozoiten und Schizonten [15, 25, 41] an das vaskuläre Endothel des Menschen (Sequestrierung). Neben der Fähigkeit an nicht infizierte und parasitierte Erythrozyten zu binden („rosetting“/Autoaggregation), ist dies ein wichtiger Pathogenitätsfaktor im Hinblick auf diverse Komplikationen ernster Malaria. Im Folgenden werden die hier beteiligten Rezeptoren und Liganden, die zugrunde liegenden genetischen Grundlagen, sowie die Adhäsionsmechanismen in Bezug auf zerebrale und plazentale Malaria dargestellt.

1.2.1 Überblick über die Moleküle auf der Membran infizierter Erythrozyten und deren diverse Rezeptoren

Wie bereits erwähnt, sequestrieren reife Trophozoiten und Schizonten von *P. falciparum* an das Endothel des Wirtes, d.h. diese Stadien zirkulieren nicht mehr im peripheren Blut. Dies wird dadurch begünstigt, dass in der Region der postkapillären Venolen auf dem Endothel eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren exprimiert wird, und geringere Fließgeschwindigkeiten des Blutes vorherrschen. Dadurch lokalisieren sich die Parasiten in sauerstoffärmeren Regionen, was wiederum das Parasitenwachstum fördert und eine vom Immunsystem ungestörte Entwicklung bis zur Merozoitenfreisetzung ermöglicht [1, 2, 6, 30, 34]. Bewerkstelligt wird diese Zytoadhäsion über eine sowohl morphologische, als auch antigene Veränderung der Erythrozytenmembran durch den Parasiten, die bereits im vorigen Unterkapitel beschrieben wurde. Der Vorgang der Sequestrierung läuft dabei so ab, dass die Bindung an das Endothel zunächst nur schwach ist, wodurch die Zellen am Endothel entlang rollen. Mit der Zeit wird die Bindung gefestigt, bis sie schließlich statisch ist. Es wird vermutet, dass diese Sequestrierung vornehmlich dem Schutz vor dem Abbau in der Milz dient, in der für gewöhnlich deformierte Zellen eliminiert werden [3, 34, 42, 43]. Weiterhin wird diese Sequestrierung in Kombination mit dem „rosetting“, der Autoagglutination und/oder des „clumpings“ (Aggregation infizierter Erythrozyten über Thrombozyten) auch für einige Symptome der ernsten Malaria verantwortlich gemacht. Neben einer möglichen Verstopfung von Blutgefäßen, die zu einer lokalen Hypoxie und einer Azidose führen kann, können Zytokine und weitere toxische Substanzen von Zellen freigesetzt werden, die durch

die Bindung an infizierte Erythrozyten (iRBCs) aktiviert werden [8, 25, 30, 42, 44-46]. Weiterhin ist bekannt, dass die Bindung von iRBCs an das Endothel in direktem Zusammenhang mit der Ausbildung einer Anämie steht [47].

Diese verschiedenen Adhäsionsvorgänge kommen durch Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zustande und sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Dabei interagieren infizierte Erythrozyten über Proteine parasitären Ursprungs, die in die Membran eingebaut werden, mit verschiedenen Rezeptoren, die von diversen Zellen exprimiert werden (s. auch Tabelle 2 und Abbildung 9).

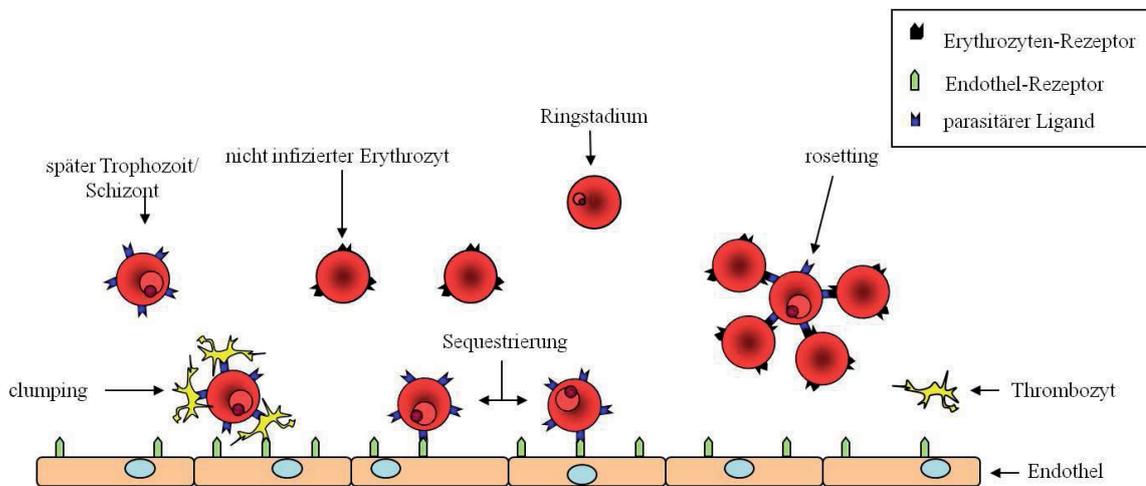


Abbildung 8: Schematische Darstellung der bei *P. falciparum* vorkommenden Adhäsionsformen. Neben der Sequestrierung von iRBCs an das Endothel ist auch das Auftreten von Akkulaten einzelner iRBCs mit mehreren uRBCs („rosetting“) oder mit Thrombozyten („clumping“) ein häufig beobachtetes Phänomen.

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Zytoadhärenz ist von Seiten des Parasiten das sog. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) verantwortlich. Dieses ist, wie bereits im Kapitel 1.1.3 beschrieben, über das ebenfalls vom Parasiten synthetisierte Protein KAHRP in der Erythrozytenmembran verankert. Die Lokalisierung beschränkt sich dabei ausschließlich auf die bereits dargestellten, für *P. falciparum* charakteristischen „knobs“. Dort liegt das Protein nicht einzeln, sondern geclustert vor [31].

Von Seiten des Wirtes sind bisher 10 Rezeptoren bekannt, die mit PfEMP1 interagieren und von Endothelzellen exprimiert werden: CD36, Thrombospondin (TSP), Chondroitin-Sulfat A (CSA), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31), P-Selektin, E-

Selektin (=ELAM), Hyaluronsäure (HA) und das neural cell adhesion molecule (NCAM) [2, 3, 30, 36, 43, 46, 48-51].

In dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf der Interaktion von PfEMP1 mit den Rezeptoren CD36, ICAM-1 und CSA (s. Abbildung 9). CD36 gilt als der Hauptrezeptor, da nahezu alle Feldisolat diese Rezeptor binden [30, 43, 52, 53]. ICAM-1 hingegen ist ein wichtiger Rezeptor im Gehirn. Im Gegensatz zu CD36, das eine starke und stabile Interaktion mit PfEMP1 eingeht, fungiert ICAM-1 als ein sog. „rolling-receptor“, d.h. ICAM-1 vermittelt häufig das initiale Rollen entlang der Endothel-Oberfläche. CSA ist in Bezug auf die plazentale Malaria von entscheidender Bedeutung, da dieser Zucker ausschließlich in der Plazenta vorkommt [2, 6, 30].

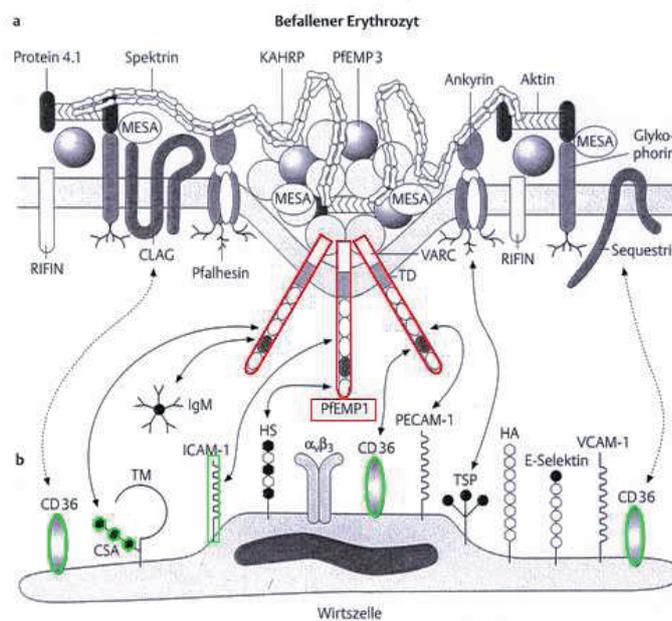


Abbildung 9: Schematische Darstellung der molekularen Interaktion von PfEMP1 (rot) mit den Rezeptoren der Wirtszellen. Die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren sind dabei grün hervorgehoben (modifiziert nach [25])

Daneben existieren noch weitere vom Parasiten exprimierte und an die Erythrozytenoberfläche transportierte Proteine, bzw. solche, die vom Parasiten modifiziert wurden. So ist das Protein Sequestrin, ebenso wie PfEMP1, mit der Adhäsion an CD36 assoziiert. Es konnte jedoch bisher noch keine direkte Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden. Bei Band 3 wird vermutet, dass es sowohl mit CD36 als auch mit TSP interagiert. Eine Bindung mit anderen Rezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden. Von den Band 3-Proteinen abgeleitet, fungieren die sog. Pflalhesine ebenfalls als Liganden für CD36, ebenso wie CLAGs (cytoadherence-linked asexual gene protein). Vor wenigen Jahren

sind zudem die Proteine der *stevor*- (sub-telomeric open reading frames) Familien identifiziert worden, deren genaue Bedeutung allerdings noch weitestgehend unbekannt ist [3, 6]. Die Rolle der Proteine der *rif*- (repetitive interspersed family) Familie (RIFINS) ist ebenfalls noch umstritten. Manche Quellen vermuten eine Beteiligung an der Zytoadhäsion [30], andere hingegen vermuten, dass diese Proteine eine Rolle bei der Bildung von Rosetten spielen (vgl. unterer Abschnitt und Tabelle 2) [6, 54].

Es ist, wie in Tabelle 2 dargestellt, somit deutlich zu sehen, dass eine Vielzahl verschiedener Proteine miteinander interagiert, wobei deren genaue Funktionen oder Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf zumeist jedoch noch nicht vollständig oder nur ansatzweise verstanden sind. Besonders im Hinblick auf die Bindung an CD36 wird dies deutlich. Die Adhäsion an diesen wichtigen Rezeptor wird vermutlich von 5 verschiedenen Liganden auf der Oberfläche parasitierter Erythrozyten vermittelt.

Abschließend soll kurz auf die Phänomene des „rosettings“, der Autoagglutination und des „clumpings“ eingegangen werden.

Rosetting ist gekennzeichnet durch das spontane Binden von zwei oder mehreren nicht infizierten Erythrozyten (uiRBCs) an iRBCs. Ebenso wie an der bereits beschriebenen Zytoadhäsion an das vaskuläre Endothel ist auch hier das PfEMP1 neben sog. rosettins/RIFINS der iRBCs für die Bildung der Rosetten verantwortlich [54]. Bei den Rezeptoren, die hier unter anderem mit PfEMP1 interagieren, handelt es sich um den complement Rezeptor 1 (CR1)/CD35, Heparan-Sulfat (HS)-ähnliche Proteoglykane, CD36, ICAM-1, Fibrinogen, IgM-Antikörper nicht immuner Personen sowie die Zucker der AB0-Blutgruppen (insbesondere das Antigen der Blutgruppe A) (vgl. Tabelle 2) [2, 3, 6, 12, 30, 45, 55-57].

Bezüglich der Funktion der Rosettenbildung existieren verschiedene Meinungen. Zum einen wird vermutet, dass durch das „rosetting“ die Invasion neuer Erythrozyten durch die freigesetzten Merozoiten im Blutstrom vereinfacht wird oder, dass die dort gebundenen uiRBCs als Schutzschild vor dem Immunsystem fungieren könnten [2, 6, 30]. Auch werden diese Zellagglutinate für die Ausbildung von Anämien und Verstopfung von Blutgefäßen verantwortlich gemacht. Da diese Rosettenbildung allerdings lediglich in vitro, nicht jedoch in vivo beobachtet wurde, ist deren Bedeutung für die Ausprägung der Krankheit noch nicht vollständig geklärt [2].

Autoagglutinate stellen dagegen Verbände mehrerer iRBCs dar und finden keine häufige Erwähnung in der Literatur. Beim „clumping“ sind im Gegensatz zu den anderen Phänomenen Thrombozyten mit iRBCs verbunden, was die häufig bei ernster Malaria vorkommende enorme Thrombozytopenie erklären könnte [4, 30].

Rezeptor	iRBC-Ligand (Domäne)	Funktion
CD36	PfEMP1 (CIDR1 α)	Zytoadhäsion & rosetting
	Sequestrin (?)	Zytoadhäsion
	Pfalhesin	Zytoadhäsion
	CLAG	Zytoadhäsion
	Band 3	Zytoadhäsion
TSP	PfEMP1	Zytoadhäsion
	Band 3?	Zytoadhäsion
CSA	PfEMP1 (DBL3 γ , CIDR1 α → <i>var1</i> ; DBL3X → <i>var2</i>)	Zytoadhäsion
ICAM-1	PfEMP1(DBL2 β C2)	Zytoadhäsion & rosetting
VCAM	?	Zytoadhäsion
PECAM	PfEMP1 (DBL2 δ , CIDR1 α)	Zytoadhäsion
P-Selektin	PfEMP1	Zytoadhäsion
E-Selektin	?	Zytoadhäsion
HA	?	Zytoadhäsion
NCAM	?	Zytoadhäsion
?	STEVOR	?
?	RIFINS	Zytoadhäsion (?), rosetting (?)
CR1	PfEMP1 (DBL1 α)	rosetting
HS	PfEMP1 (DBL1 α)	rosetting
Fibrinogen	?	rosetting
AB0-Antigene	PfEMP1 (DBL1 α)	rosetting
?	RIFIN	rosetting
IgM	PfEMP1 (CIDR1 α)	rosetting
vWF	?	clumping

Tabelle 2: Übersicht über die bei der Ausbildung der Zytoadhäsion, dem „rosetting“, und dem „clumping“ beteiligten Liganden von *P. falciparum* und deren entsprechenden Rezeptoren des menschlichen Wirtes; zusammengestellt nach [3, 4, 6, 34, 49-51].

1.2.2 *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) & antigene Varianz

Wie bereits im vorherigen Kapitel dargestellt, konzentriert sich diese Arbeit auf die Untersuchung der PfEMP1-vermittelten Zytoadhäsion von *Plasmodium falciparum* an CD36, CSA und ICAM-1. Hier sollen nun die genetischen Grundlagen in Bezug auf PfEMP1 erläutert werden.

1.2.2.1 Genetik und Aufbau von PfEMP1

Identifiziert wurde PfEMP1 1984 von Leech et al.. Bei diesem Protein handelt es sich um ein sehr polymorphes Antigen mit einem Molekulargewicht von 200-400kDa. Kennzeichnend für PfEMP1 ist die hohe Trypsin-Sensitivität, d.h. es kann über Trypsin von der Oberfläche infizierter Erythrozyten abgelöst werden. Abweichend davon ist eine PfEMP1-Variante, die an CSA bindet, Trypsin-resistent. Ein weiteres Charakteristikum in Bezug auf das chemische Verhalten ist die Unlöslichkeit des Proteins in TritonX-100 sobald es in die Membran des Erythrozyten eingebaut wird [6, 35, 38, 42, 54].

Kodiert wird PfEMP1 von ca. 60 verschiedenen Genen, den sog. *var*-Genen. Diese sind, mit Ausnahme des Chromosoms 14 [43, 58], über alle 14 Chromosomen des Parasiten verteilt, wobei sie dort hauptsächlich an den subtelomeren Regionen lokalisiert sind. Diese sind dabei anfälliger für Rekombinationen, wodurch dort häufiger Sequenzveränderungen auftreten. Nur wenige relativ konservierte *var*-Gene sind im Zentrum dreier oder vier Chromosomen zu finden. Innerhalb der *var*-Gene lassen sich anhand verschiedener Promotor-Sequenzen 3 Hauptgruppen unterscheiden. So besitzen *var*-Gene in subtelomeren Bereichen und mit einer Orientierung Richtung Telomer einen sog. upsA-Promotor (*varA*-Gruppe). Sind *var*-Gene mit einer Lokalisierung im subtelomeren Bereich dagegen in Richtung Centromer orientiert, so besitzen sie einen upsB-Promotor und werden somit als *varB*-Gruppe bezeichnet. Die im Zentrum eines Chromosoms liegenden *var*-Gene besitzen einen upsC-Promotor und werden als *varC*-Gruppe geführt [53, 59, 60].

Der Aufbau der etwa 60 verschiedenen und 3,9 bis 13kb großen *var*-Gene ist stets gleich organisiert, da sie aus 2 Exons bestehen. In Richtung Telomer grenzen dabei 6 Telomer-assoziierte repeat-Elemente (TARE) (s. Abbildung 10a).

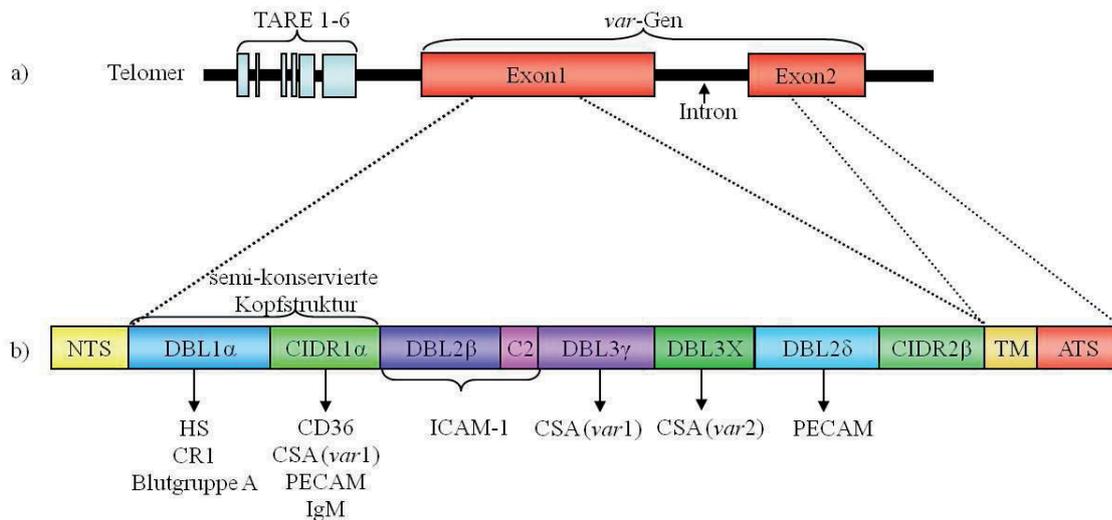


Abbildung 10: Schematische Darstellung der *var*-Gen- und PfEMP1-Architektur. Wie aus **a)** zu entnehmen, ist der Großteil der *var*-Gene im subtelomeren Bereich der Chromosomen lokalisiert, flankiert von 6 TAREs in Richtung Telomer. Alle *var*-Gene bestehen stets aus 2 Exons. In **b)** ist der Aufbau der PfEMP1-Proteine aus den verschiedenen DBL- und CIDR-Domänen dargestellt, die die Adhäsion an die verschiedenen Wirtsrezeptoren vermitteln (modifiziert nach [28, 53, 61]).

Von diesen beiden Exons kodiert eines für 1-2 CIDRs (cystein-rich interdomain regions) und 2-7 DBL (Duffy-binding-like)- Domänen, die ebenfalls reich an Cystein sind. Die Bezeichnung der DBL-Domänen leitet sich von deren Ähnlichkeit zu dem Protein der Merozoiten von *P. vivax* her, welches an das Duffy-Blutgruppen-Antigen bindet, und somit die Invasion neuer Erythrozyten ermöglicht.

Die CIDR-Regionen werden in 3 Sequenztypen unterteilt, und mit den Buchstaben α - γ gekennzeichnet. Bei den DBL-Domänen unterscheidet man dagegen 5 semi-konservierte Sequenztypen, die mit den Buchstaben α - ϵ gekennzeichnet werden, und eine heterogene Gruppe, die als DBLX bezeichnet wird. Daneben werden 10 variable Blöcke unterschieden, die, abhängig von der Positionierung vom 5'-Ende und der charakteristischen Sequenzen, mit 1-10 nummeriert werden. Diese Nummerierung basiert auf einer älteren Klassifizierung der DBL-Domänen. Als immer mehr *var*-Gene identifiziert wurden, fand eine Re-Klassifizierung über die Sequenztypen statt. Daher findet sich heute hauptsächlich die kombinierte Bezeichnung der DBL-Domänen (s. auch Tabelle 2 und Abbildung 10b)).

Des Weiteren kodiert das erste Exon für eine konstante Interdomäne C2, die, wenn überhaupt, dann nur zusammen mit einer DBL β -Domäne vorliegt. Somit kodiert dieses erste Exon für die polymorphen, extrazellulären Domänen, die für die Adhäsionsvorgänge verantwortlich sind.

Das zweite Exon der *var*-Gene kodiert 2 konservierte Sequenzen für die spätere Transmembrandomäne (TM) und eine mit dem KAHRP der „knobs“ assoziierte ATS-Sequenz (acidic terminal segment).

Von den gesamten PfEMP1-Proteinen weisen etwa 38 dieselbe Domänen-Struktur auf, die als allgemeiner Typ angesehen werden kann: NTS-DBL1 α -CIDR1 α -DBL2 δ -CIDR2 x -TM-ATS

Wie teilweise aus Tabelle 2 entnommen werden kann, binden alle dieser 38 PfEMP1s CD36 über die CIDR1 α -Domäne. Die verbleibenden 18 PfEMP1s sind von ihrer Domänen-Zusammensetzung anders aufgebaut als der allgemeine Typus [43, 62]. Alle PfEMP1-Proteine besitzen jedoch eine stets gleich gestaltete Kopf-Region, bestehend aus der NTS und einer darauf folgenden DBL1-Domäne, wie aus Abbildung 10b entnommen werden kann [3, 30].

Die Transkription der *var*-Gene während der erythrozytären Schizogonie findet bereits im frühen Ringstadium, etwa 4-10 Stunden nach der Merozoiten-Invasion, statt [54, 63]. Der Nachweis des entsprechenden Genprodukts, also des PfEMP1-Proteins auf der Erythrozytenoberfläche, kann jedoch erst im Stadium des reifen Trophozoiten etwa 16 Stunden nach der Merozoiten-Invasion erbracht werden. Dabei wird allerdings nur jeweils eine PfEMP1-Variante exprimiert, die weiteren transkribierten *var*-Gene werden hingegen unterdrückt [1, 43, 59, 64].

Damit das jeweilige PfEMP1 in die Erythrozytenmembran integriert werden kann, muss es zunächst in den sekretorischen Transportweg über das ER und den Golgi-Apparat eingeschleust werden. Das System erkennt dabei die TM des Proteins, wodurch der Transport letztlich induziert wird. Ob der Einbau in die Wirtszellmembran nun über die Maurers Spalten oder über ein lösliches zytoplasmatisches Kompartiment läuft, ist noch nicht geklärt [27, 39]. Für den Einbau über die Maurers Spalten spricht, dass dort proteinreiche Vesikel nahe der Erythrozytenmembran entdeckt wurden, die möglicherweise mehrere PfEMP1s enthalten, was die Anordnung des Proteins in Clustern erklären würde. Ungeklärt ist auch, ob der Transport und der Einbau von PfEMP1 gestört werden, wenn KAHRP nicht vorhanden ist, und daher auch keine „knobs“ ausgebildet werden. Bekannt ist hingegen, dass Parasiten ohne „knobs“ bedeutend weniger PfEMP1 an der Oberfläche aufweisen als normal gestaltete iRBCs, bei denen allerdings auch nicht alle „knobs“ mit PfEMP1 beladen sind. Auch die Fähigkeit zur Zytoadhärenz ist bei fehlenden „knobs“ stark eingeschränkt [31, 65].

1.2.2.2 Antigenvariation

Aufgrund der großen Anzahl an *var*-Genen kann der Parasit von einem Protein auf eine andere antigene und vermutlich funktionell veränderte Variante umschalten. Somit entgeht

der Parasit nicht nur der Vernichtung durch das Immunsystem, sondern kann über eine Vielzahl von Molekülen verfügen, um an die verschiedenen Rezeptoren der Endothelzellen zu binden. Allerdings exprimiert jeder Parasit nur eine PfEMP1-Variante während jeder erythrozytären Schizogonie [43, 63]. Dies bedeutet allerdings nicht, dass in einem Patienten/Wirt nur iRBCs mit einer PfEMP1-Variante vorkommen.

Das Phänomen der Antigenvariation bei Plasmodien wurde zunächst bei *P. berghei* in Mäusen, später auch bei *P. knowlesi* in Rhesus-Affen, *P. chabaudi* (ebenfalls in Mäusen) und bei *P. fragile* in Toque-Affen nachgewiesen. Bei *P. falciparum* wurde eine Antigen-Varianz zuerst bei Parasiten beobachtet, die als Impfstoff für die Malaria-Therapie eingesetzt wurden. Durch die relativ hohen switching-Raten von 2% pro Generation von einer Variante auf die andere kommt es auch, dass die Immunantwort der Patienten von der jeweiligen PfEMP1-Variante abhängt. Dies bedeutet somit, dass Vakzine, die gegen PfEMP1 gerichtet sind, nur vor einer bestimmten Ausprägung der Malaria schützen können, z.B. der plazentalen Malaria. Als allgemeine Prophylaxe wären diese allerdings ungeeignet [3, 34, 63, 66, 67].

Bezüglich der Funktion der Antigen-Varianz gibt es verschiedene Annahmen. Zum einen wird angenommen, dass der Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes erst dadurch aufgebaut wird, dass die Expression von PfEMP1 mit einer Reduktion der Interferon γ -Ausschüttung des Wirtes korreliert ist. Eine weitere Funktion könnte darin liegen, dass ein erhöhter Selektionsdruck auf die Parasiten aufgebaut wird, die sich durch eine höhere switching-Rate besser vor dem Immunsystem verbergen können. Das bedeutet, dass die langsamer agierenden Parasiten wegselektiert werden. Somit wird eine unkontrollierte Vermehrung der Parasiten verhindert, die ansonsten den Wirt umbringen und somit die Übertragung des Parasiten auf den Endwirt *Anopheles* unterbinden würde. Die genaue Funktion in der Immunevasion, also dem Entkommen des Immunsystems, ist somit noch nicht befriedigend geklärt [63].

1.2.3 Die Rezeptoren ICAM-1, CSA und CD36 und deren Bedeutung für die zerebrale und plazentale Malaria

Eine erhöhte Expressierung verschiedener *var*-Gene steht in engem Zusammenhang mit dem Auftreten ernster Malaria, was in den folgenden Abschnitten ausführlicher erläutert wird. Zudem wird der bisherige Wissensstand in Bezug auf die Adhäsion an CD36 dargestellt, welche zwar nicht mit ernsten Malaria-Komplikationen verbunden ist, jedoch eine der am häufigsten ausgebildeten Adhäsionen darstellt.

1.2.3.1 Zerebrale Malaria

Diese schwere Komplikation der Malaria ist die bisher am meisten erforschte, auch wenn sie noch nicht vollständig verstanden ist. Zerebrale Malaria wird als Hauptursache der Todesfälle bei Malaria-Patienten angesehen, da etwa 25-50% der Patienten, die eine zerebrale Malaria entwickelt haben, diese Form der Erkrankung nicht überleben [28]. Besonders bei infizierten Kindern entwickeln etwa 5% im Lauf der Infektion eine ernste Malaria, die sich als zerebrale Malaria manifestiert. Charakteristische Symptome sind Verwirrung, eine potentiell reversible Enzephalopathie, das Auftreten von Krämpfen, der Verlust des Bewusstseins sowie die Entwicklung eines Komas, aus dem der Patient häufig nicht mehr erwacht. Obduktionen an zerebraler Malaria Verstorbener zeigen stets eine typische, enorme Schwellung des Gehirns mit Ring- oder petechialen Blutungen, die durch die Akkumulation von iRBCs hervorgerufen werden. Neben der Sequestrierung von iRBCs an das Endothel sind daher auch Anhäufungen von uiRBCs und Thrombozyten als mögliche Folge der Bildung von Rosetten oder „clumpings“ beteiligt an dem Verschluss kleiner Blutgefäße im Gehirn. Durch den daraus resultierenden verminderten Blutfluss wird das Gehirn nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und es kommt zur Anreicherung von Abfallprodukten. Ein ebenfalls häufiger Befund im Zusammenhang mit zerebraler Malaria ist eine hohe Parasitämie [3, 8, 9, 30, 44].

Des Weiteren treten bei Patienten mit einer ausgebildeten zerebralen Malaria erhöhte Konzentrationen an Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ), häufig verbunden mit einem endotoxischen Schock, auf [30]. Es wird vermutet, dass die erhöhte TNF-Freisetzung durch das sog. „Malaria-Toxin“ verursacht wird; ein möglicher Kandidat für dieses Toxin scheint das *P. falciparum* Glycosylphosphatidylinositol (GPI) zu sein. Eine weitere wichtige Rolle ist dem NO zuzuschreiben, welches durch den Einfluss der verschiedenen Zytokine verstärkt vorkommt. Dies ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (s. Abbildung 11) und im Gehirn den Transmitter Glutamat zu inhibieren, was letztlich dazu führt, dass der Patient ins Koma fällt. Weiterhin bewirken die hoch regulierten Zytokine eine Unterdrückung der Erythrozytenproduktion im Knochenmark, was somit auch zur Ausbildung einer ernsten Anämie beiträgt [3, 9, 30, 43, 66, 68, 69].

All diese Faktoren und eine verstärkte Adhäsion der iRBCs an das Endothel, das als Grenzfläche zwischen der systemischen Blutzirkulation und der Blut-Hirn-Schranke fungiert, führen weiterhin zu einer Umverteilung von Proteinen, die für die Ausbildung von interzellulären Verbindungen zwischen Endothelzellen wichtig sind. Dadurch kommt es zu

einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (s. Abbildung 11), was als Ursache für die Ausbildung von Gehirnödemen angenommen wird. Somit ist nicht allein die Sequestrierung der Parasiten im Gehirn für die Ausbildung der zerebralen Malaria verantwortlich, sondern auch die damit häufig verbundenen Störungen des Stoffwechsels und die erhöhte Aktivierung des inflammatorischen Systems [3, 8].

In Bezug auf die Sequestrierung handelt es sich bei dem für die zerebrale Malaria wichtigen Rezeptor um ICAM-1.

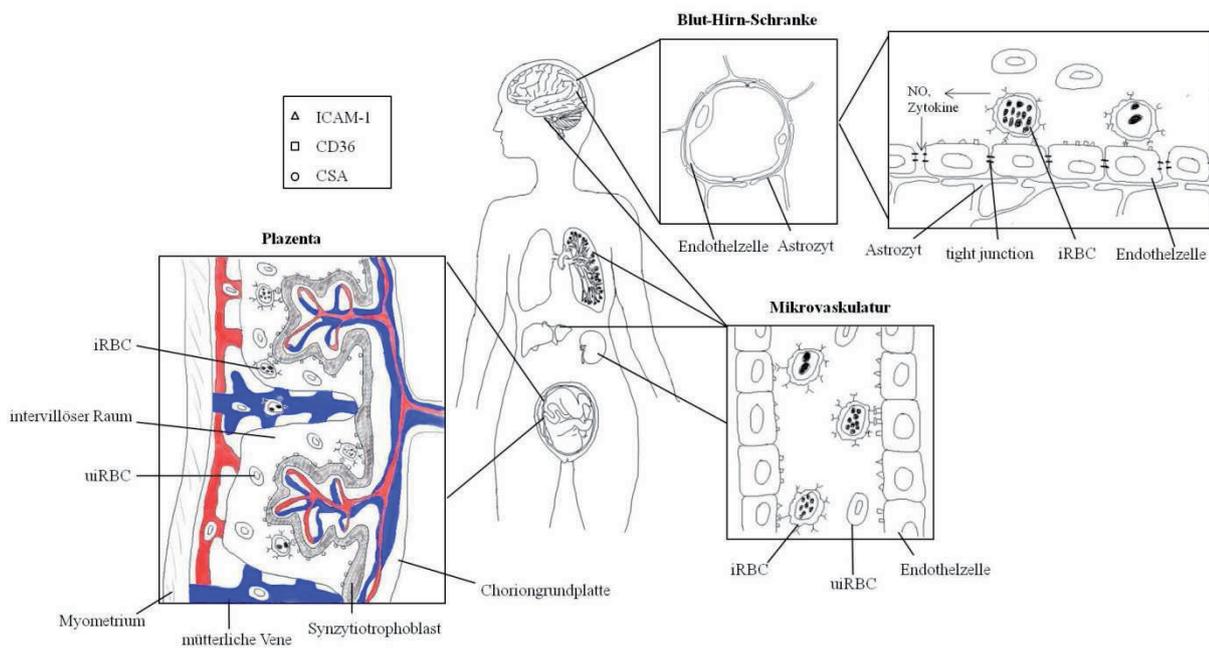


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Vorkommens von ICAM-1, CSA und CD36 sowie der Ansiedlung von iRBCs in den verschiedenen Organen, modifiziert nach [70].

ICAM-1

Bei ICAM-1 handelt es sich um ein etwa 100kDa großes Zelloberflächen-Glykoprotein, das an der Ausbildung von Zell-Zell-Interaktionen beteiligt ist, indem es an das leukocyte function antigen (LFA) 1 bindet. Daher handelt es sich bei diesem Protein um ein Transmembranprotein, d.h. es ist über eine Transmembrandomäne in der Membran verankert und interagiert mit einem extrazellulären Teil mit den entsprechenden Liganden. Dieser extrazelluläre Teil ist aus 5 Domänen aufgebaut, wie in Abbildung 12 dargestellt ist. Exprimiert wird ICAM-1 von Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dem vaskulären Endothel; das Vorkommen dieses Proteins erstreckt sich auf das Gehirn, die Leber, Niere und Lunge (s. Abbildung 11).

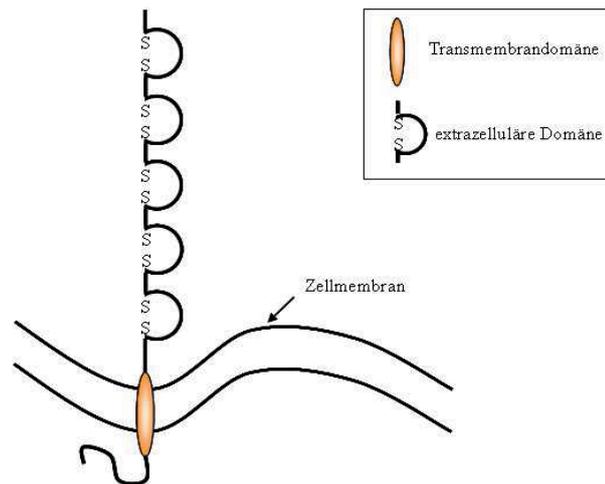


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Struktur von ICAM-1. Das Protein ist über eine Transmembrandomäne (orange) in der Zellmembran verankert. Der extrazelluläre Teil des Proteins ist aus 5 Domänen aufgebaut, die über Disulfid-Brücken in Schleifenform vorliegen.

Eine verstärkte Expression dieses Proteins wird dadurch generiert, dass durch den Einfluss von Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), TNF α (vgl. Abschnitt zur zerebralen Malaria) und bakterieller Toxine das Endothel aktiviert wird. Daher korreliert das Auftreten einer zerebralen Malaria auch mit höheren Expressionslevels von ICAM-1 [30]. Im Gegensatz zu CD36, das eine starke und stabile Interaktion mit PfEMP1 eingeht, wird ICAM-1 als ein sog. „rolling-receptor“ bezeichnet, da hier nur schwache Bindungen ausgebildet werden, die keine statische Bindung der iRBCs bewirken [2, 71]. Neben der Beteiligung an der zerebralen Malaria fungiert ICAM-1 als Ligand für die Bindung von Leukozyten an das Endothel und als Rezeptor für das menschliche Rhinovirus [2, 3, 9, 42, 66, 69].

PfEMP1 bindet ICAM-1 immer nur mit der DBL2 β -Domäne in Kombination mit der konstanten C2-Domäne [6], wobei die Bindung der iRBCs an ICAM-1 pH-abhängig ist. So kann eine optimale/maximale Adhäsion an ICAM-1 unter sauren Bedingungen bei einem pH-Wert von etwa 6,8 erreicht werden [72]. Die Bindung infizierter Zellen an diesen Rezeptor wurde erstmals 1992 von Ockenhouse et al. und Berendt et al. nachgewiesen [73, 74].

1.2.3.2 Plazentale Malaria

Neben Kindern sind auch schwangere Frauen besonders stark von der Ausbildung einer ernsten Malaria betroffen, da diese gegenüber nicht schwangeren Frauen eine erhöhte Empfänglichkeit für Malaria-Infektionen besitzen. Verantwortlich für die schweren Komplikationen bei Malaria-infizierten Schwangeren (die sog. plazentale Malaria) sind lediglich zwei relativ konservierte Mitglieder der *var*-Genfamilie: *var1CSA* bei dem Parasitenstamm FCR3-CSA bzw. *var2CSA* im Großteil der Patientenisolate [62, 63, 75-78].

Das von *var2CSA* exprimierte PfEMP1 wird auch unter dem Namen VAR2CSA geführt. Der Name deutet bereits darauf hin, dass der entsprechende Rezeptor für das hierbei gebildete PfEMP1-Molekül das Polysaccharid Chondroitin-Sulfat A ist [79, 80]. Die Entdeckung dieses Rezeptors in der Schwangerschafts-assoziierten Malaria erfolgte 1995 von Rogerson et al. [81].

Große Mengen an CSA-bindenden iRBCs (vornehmlich Schizonten und einige Trophozoiten) liegen bei dieser Form der Malaria im intervillösen Raum der Plazenta (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 13a)), häufig mit großen Infiltraten aus Monozyten und Makrophagen, vor. Auffällig ist auch, dass die infizierten Zellen in weit größeren Mengen auftreten als am Endothel postkapillärer Venolen [3, 82-84]. Neben CSA kommt in der Plazenta allerdings auch das an der zerebralen Malaria beteiligte ICAM-1 vor, welches auch hier ein möglicher Rezeptor sein kann [83]. Abweichend von der allgemeinen Annahme, dass allein späte asexuelle Blutstadien sequestrieren, konnte in der Plazenta die ungewöhnliche Beobachtung gemacht werden, dass ebenso Ringstadien am Synzytiotrophoblasten adhärten. Die hier zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind allerdings noch nicht geklärt [64, 84].

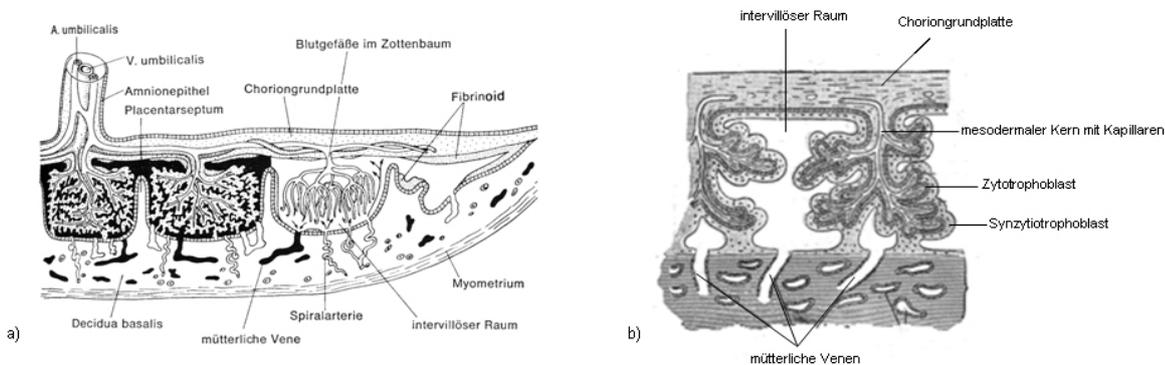


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Plazenta in der Übersicht a) aus [85]. In b) ist der Aufbau der Zotten im intervillösen Raum abgebildet. Hier verschmilzt der Synzytiotrophoblast des Fötus mit dem mütterlichen Gewebe, wodurch die Blutversorgung des Fötus über die Nabelschnur gewährleistet wird.

Zu den Folgen der plazentalen Malaria sind unter Anderem Frühgeburten, niedriges Geburtsgewicht, Abort, Totgeburt, Anämie der Mutter, mütterliche Morbidität und Mortalität zu zählen [9, 46, 86]. Dabei wird vermutet, dass durch Immunreaktionen und die Abscheidung fibrinoider Proteine während der Sequestrierung der Blutfluss in der Plazenta vermindert wird. Dadurch wird der Fötus nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt und es kommt zu einer verschlechterten Entwicklung des Ungeborenen und letztlich zu einer verstärkten Anfälligkeit für Malaria-Infektionen innerhalb der ersten zwei Jahre [62, 87]. Es

wird angenommen, dass die plazentale Malaria etwa 5-12% der gesamten Fälle von niedrigem Geburtsgewicht verursacht und wird als Ursache für etwa 75.000-200.000 Todesfälle bei Kindern angesehen [88].

Allerdings muss auch gesehen werden, dass sich diese schweren Komplikationen mit Todesfolge lediglich nur bei einem äußerst geringen Teil der Infizierten manifestieren [89]. Diese ernstesten Komplikationen treten insbesondere bei primigraviden Frauen auf, da in diesem Fall noch keine Immunität gegen das CSA-bindende PfEMP1 aufgebaut werden konnte. Das bedeutet, dass auch wenn eine Frau bereits eine gewisse Semiimmunität gegen Malaria aufgrund wiederholter Infektionen aufgebaut hat, keine Antikörper gegen den CSA-bindenden Phänotyp vorhanden sind. Dieser manifestiert sich erst bei der Schwangerschaft, da das CSA ausschließlich im Synzytiotrophoblasten vorkommt. Dieser ist fötalen Ursprungs und stellt die Schicht der Plazenta dar, die das mütterliche Blut umgibt (s. Abbildung 13b)). Das bedeutet wiederum, dass bei der Schwangerschaft eine neue Umgebung geschaffen wird, in der sich entsprechend angepasste Parasiten entwickeln können. Was allerdings das switching von einer PfEMP1-Variante auf eine CSA-bindende Variante verursacht, ist noch nicht geklärt. Die Vermutung, dass der veränderte hormonelle Status einen Einfluss haben könnte, konnte nicht bestätigt werden.

Bei wiederholten Schwangerschaften wird das Risiko einer plazentalen Malaria aufgrund der Bildung von Antikörpern, die die CSA-Adhäsion blockieren, immer mehr reduziert, bis schließlich, nach etwa drei bis vier Schwangerschaften, keine ernstesten Komplikationen mehr auftreten. Seren multigravider oder schwangerer Frauen sind auch *in vitro* in der Lage die Bindung von auf CSA-Bindung selektierten Parasiten an CSA zu unterbinden. Auch die Föten multigravider Frauen erfahren eine bessere Versorgung über das Blut, da der Blutfluss in den Gefäßen nicht durch Parasiten, Rosetten, etc. blockiert wird. Die gegen diese Komplikation gebildeten Antikörper stellen jedoch keinen Schutz vor anderen PfEMP1-Varianten dar, da auch verschiedene Parasitenstämme in einem Patient vorkommen können. Daher ist nicht auszuschließen, dass neben CSA-bindenden Parasiten noch weitere Parasiten vorkommen, die andere PfEMP1-Varianten exprimieren [3, 46, 53, 62, 75, 76, 83, 84, 90, 91].

CSA

Chondroitin-Sulfat (CS), das Grundmolekül, aus dem CSA besteht, ist aus mehreren aneinander geketteten Disacchariden aufgebaut. Diese bestehen aus Hexuronsäure (HexA) β 1-3, die an N-Acetylgalactosamin (GalNAc) gebunden ist. Diese Ketten können an verschiedenen Stellen Sulfate aufweisen. Liegt an dem Polysaccharid eine 4-O-Sulfatierung

der Saccharid-Ketten vor, handelt es sich um die hier untersuchte Form CSA, die auch unter dem Begriff Chondroitin-4-Sulfat bekannt ist (s. Abbildung 14) [92]. Ist das Polysaccharid an der 6-O-Position sulfatiert, spricht man von Chondroitin-Sulfat C (CSC). Mischformen zwischen verschiedenen Sulfatierungstypen treten typischerweise nicht auf, da das CS-Grundgerüst „mono-O-sulfatiert“ wird. Es wurde festgestellt, dass CSA, welches aus der Plazenta isoliert wurde, nur eine äußerst geringe Sulfatierung aufweist: lediglich ca. 8%, bzw. 2-3% und 9-14% der Disaccharide besitzen eine Sulfat-Gruppe an der 4-O-Position. Die restlichen Disaccharide weisen keine Sulfat-Gruppen auf [90]. CSA-Polysaccharide besitzen im Schnitt ein Molekulargewicht von 45kDa, was einer Zusammensetzung aus etwa 200 Monosacchariden entsprechen würde [93].

Wie bereits oben erläutert, ist CSA im Menschen im Synzytiotrophoblasten der Plazenta lokalisiert (s. Abbildung 11), wo es als Seitenketten kovalent an ein Protein gebunden vorliegt und eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix darstellt. Doch auch in anderen Geweben liegt CSA als Teil der extrazellulären Matrix vor, wobei es wie andere Chondroitin-Sulfate mit Kollagen, Fibronectin, Laminin, etc. interagiert. Daneben wurde CSA auch dort als Rezeptor für die Adhäsion ans Endothel identifiziert. Dort liegt es als Seitenkette von Thrombomodulin vor, woran ebenfalls iRBCs binden können. Deswegen ist noch nicht vollständig geklärt, ob die Bindung an CSA wirklich nur Plazenta-spezifisch ist. [4, 76, 94].

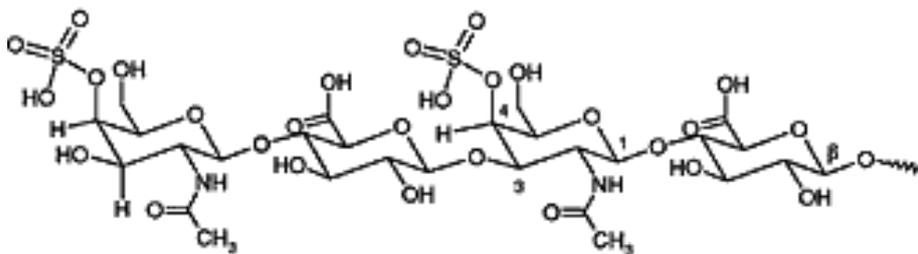


Abbildung 14: Strukturformel von Chondroitin-4-Sulfat/Chondroitin-Sulfat A (CSA) mit der bezeichnenden Sulfat-Gruppe am 4. Sauerstoffatom.

Die Bindung von iRBCs kann nur über die 4-O-Sulfatierung der Saccharid-Ketten erfolgen. Der extrazelluläre Part des CSA-bindenden PfEMP1 besteht hierbei aus 6 verschiedenen DBL-Domänen, von denen die Domänen DBL3 γ und CIDR1 α des *var1*-Genes des FCR3-Parasitenstammes bzw. die Domäne DBL3X des *var2*-Gens die Bindung an CSA vermitteln, wie in Tabelle 2 dargestellt ist. Die in der Plazenta vorkommenden iRBCs binden trotz der vorhandenen CIDR1 α -Domäne nicht an CD36, da sich diese CSA-bindende Variante in drei

Aminosäuren von der CD36-bindenden Variante unterscheidet. Eine Besonderheit hierbei ist, wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, dass im Gegensatz zu allen anderen Varianten die PfEMP1-Variante, die an CSA bindet je nach Parasitenklon bzw. Aminosäurezusammensetzung Trypsin-resistent oder –sensitiv ist. Auch ist die Adhäsion an diesen Rezeptor, anders als bei ICAM-1 und CD36, nicht pH-abhängig [3, 6, 30, 72, 75, 78, 80, 83, 95-97].

1.2.3.3 CD36

Bei CD36 handelt es sich um ein 88kDa großes, Protease-resistentes Glykoprotein, das von einer Vielzahl verschiedener Zellen exprimiert wird, wie Endothelzellen, Monozyten, Thrombozyten und gewisse Melanomzellen (z.B. C32-Melanomzelllinie). Die Bezeichnung dieses Proteins leitet sich von der CD-Nomenklatur ab, nach der Leukozyten-differenzierende Antigene gelistet werden, die von Clustern monoklonaler Antikörper erkannt werden. Daneben gibt es noch weitere Namen für dieses Protein, als da wären: OKM5-Antigen (da es von dem monoklonalen OKM5-Antikörper erkannt wird), Glykoprotein IV oder IIIb bei Thrombozyten, oder GP88 bei Melanomzellen. Kodiert wird CD36 vom CD36-Gen, bestehend aus 15 Exons, wovon allerdings letztlich nur ein Teil des Exons 3, die Exons 4-13 und ein Teil des Exons 14 für das Protein kodieren. Funktionell und strukturell handelt es sich bei CD36 um einen sog. scavenger Rezeptor der Klasse B. Das Protein setzt sich daher aus 2 TMs, 2 zytoplasmatischen Domänen und einer extrazellulären Domäne zusammen. Letztere weist einen stark hydrophoben Bereich auf, der mit der Plasmamembran interagiert. Dadurch entsteht eine Struktur mit 2 in die Umgebung ragenden Schleifen, die mit entsprechenden Liganden interagieren können. Die Bindungsstelle für PfEMP1 wird von den Aminosäuren 146-164 oder 145-171 generiert (s. Abbildung 15) [66, 98, 99].

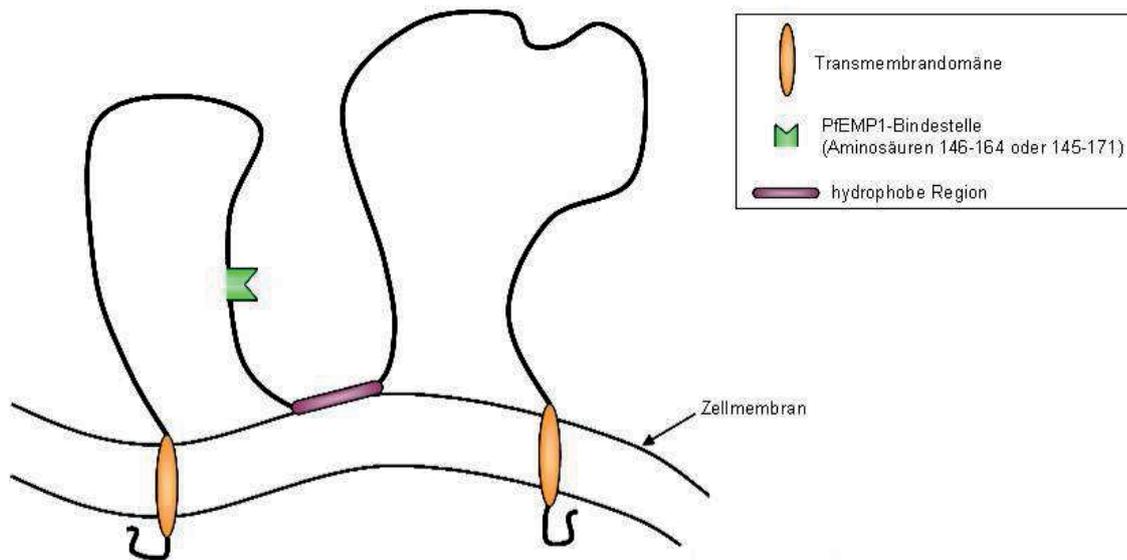


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Struktur von CD36, modifiziert nach [99]. Das Protein ist über 2 Transmembrandomänen (orange) in der Zellmembran verankert, durch eine hydrophobe Region (lila), die mit der Membran interagiert entstehen 2 Schleifen. Die an PfEMP1 bindende Region (grün) wird von den Aminosäuren 146-164 oder 145-171 generiert.

Einigen Quellen zufolge wurde CD36 auch auf kapillarem Endothel des Gehirns nachgewiesen, weswegen dieses Protein, neben ICAM-1, für die Ausbildung der zerebralen Malaria von Bedeutung sein kann [6, 35, 42, 47]. Anderen Quellen zufolge wird CD36 jedoch nicht von Endothelzellen der Gehirnkapillaren exprimiert, sondern kommt hauptsächlich in anderen Organen wie Lunge, Niere, Leber und in der Muskulatur vor (s. Abbildung 11). Da CD36 und ICAM-1 jedoch in denselben Organen co-exprimiert werden können, können diese Rezeptoren zusammen die Adhäsion von iRBCs in diesen Organen verstärken. Bisher wurde CD36 jedoch noch nicht mit ernsteren Komplikationen in Verbindung gebracht. Allerdings wurde auch festgestellt, dass CD36 direkt mit der Manifestierung einer Anämie assoziiert ist, und dass Polymorphismen in den Exons 10-12 mit einer erhöhten Anfälligkeit für die Ausbildung einer zerebralen Malaria verbunden sind [3, 9, 30, 47, 68, 100]. Da CD36 zudem auf Thrombozyten vorkommt, ist es wahrscheinlich, dass CD36 durch die Beteiligung an der Bildung von „clumpings“ einen Einfluss auf die Ausbildung einer zerebralen Malaria hat [12, 59].

CD36 wird immer nur von der CIDR1 α -Domäne eines PfEMP1-Moleküls gebunden (vgl. Tabelle 2), welches von einem Gen der *varB*- oder *varC*-Gruppe kodiert wird. Diese Domäne weist dabei in verschiedenen Parasitenisolaten eine hohe Homologie in der Sequenz auf. Die so zustande kommende Bindung wird mit als die stabilste angesehen. Allerdings wird CD36 nicht von allen Parasiten gebunden, die eine CIDR1 α -Domäne exprimiert haben [3, 6, 101].

Ebenso wie bei ICAM-1 ist die Bindung an CD36 pH-abhängig. Um ein Maximum an Adhäsion zu erreichen, sollten ebenfalls saure Verhältnisse etwa bei pH6,8 vorherrschen [71, 72, 102]. Eine weitere Besonderheit dieses Rezeptors ist, dass dieser nicht ausschließlich von späten asexuellen Blutstadien, sondern auch von frühen sexuellen Blutstadien, also Gametozyten, gebunden wird. Diese binden dabei ebenfalls über „knobs“ und lösen sich als späte reife Stadien, die keine „knobs“ mehr aufweisen, wieder von dem Rezeptor ab. Im Gegensatz zu Trophozoiten und Schizonten sequestrieren Gametozyten allerdings bevorzugt im Knochenmark und in der Milz. Der hierfür verantwortliche Ligand ist bisher noch unbekannt [103].

1.3 Bisherige Untersuchungsmethoden der Zytoadhäsion

Eine der am häufigsten verwendeten Methoden für einen Bindungsassay ist die Verwendung von Zellen, die den zu untersuchenden Rezeptor exprimieren.

Eine ebenfalls gängige Methode ist die Adsorption der aufgereinigten Rezeptoren auf Petrischalen über Nacht im Kühlschrank. Die verwendeten Rezeptoren werden hierbei in variierenden Konzentrationen eingesetzt, bei CSA: 10-100µg/ml, bei CD36 häufig 1µg/ml. Bei beiden Methoden werden die freien Stellen der Unterlage meist mit BSA (bovine serum albumin) blockiert um unspezifische Bindungen zu inhibieren; bei Verwendung aufgereinigter Rezeptoren werden die überschüssigen Rezeptoren und das BSA abgewaschen. Im nächsten Schritt werden die iRBCs mit Parasitämien von 1% - 8% auf die präparierten Petrischalen/Zellen gegeben. Werden die Schalen zuvor mit BSA inkubiert, liegen die iRBCs entweder in PBS oder in Medium mit BSA vor. Eine weitere Variante ist, die freien Stellen nicht zu blockieren, wobei dann die Parasiten für den Assay in Medium mit Serum vorliegen. Der Hämatokrit, also der prozentuale Anteil an Zellen in der Suspension, liegt meist zwischen 5% und 2%. Die Inkubation mit iRBCs bei 37°C liegt je nach Autor zwischen 30 Minuten und bis zu 1,5 Stunden. Nach dieser Inkubationszeit müssen ungebundene Zellen abgewaschen werden. Die Überprüfung des Assays erfolgt über die Auszählung der gebundenen Zellen. Doch wie bereits erwähnt, ist bei Verwendung der Rezeptoren CD36 und ICAM-1 die Präferenz der iRBCs für ein saures Milieu zu beachten. Bei Assays an CSA ist die Einhaltung des physiologischen pH-Wertes hingegen ausreichend.

Inhibierungs-/Deadhärierungsassays werden prinzipiell so durchgeführt wie Bindungs-Assays, nur werden die gebundenen iRBCs durch einen Überschuss an löslichem Rezeptor wieder abgelöst [42, 72, 83, 92, 102].

Bei einer alternativen Methode werden dagegen einzelne oder doppelte Mikropipetten aus Glas mit einem Durchmesser von 2-6 μ m verwendet. Durch den engen Durchmesser wird gewährleistet, dass die Zellen untereinander in Kontakt kommen und auch durch die verschiedenen Proteine beeinflusst werden können. Wenn iRBCs an ihren Rezeptor binden, können diese wieder abgelöst werden, wodurch Schlüsse daraus gezogen werden können, welcher Anteil einer Population die Fähigkeit zur Zytoadhäsion besitzt, und wie stark die Bindung war. Der Nachteil dieser Methode liegt allerdings im umständlichen Umgang mit der dazugehörigen Technik und in der geringen Anzahl an iRBCs, die hier vermessen werden kann [104, 105], was wohl dazu geführt hat, dass sich diese Methode nicht etablieren konnte. Wie zu sehen ist, werden die hier beschriebenen Bindungs-Assays nicht unter Fließbedingungen mit dem stets vorhandenen Scherstress, sondern unter statischen Bedingungen durchgeführt, was nicht dem natürlichen Umfeld der iRBCs entspricht [104]. In der Literatur finden nur wenige sog. „flow-based“ Assays Erwähnung, die hier kurz vorgestellt werden.

Bei der ersten Methode handelt es sich um ein ex vivo-Modell. Dabei werden denervierte Mesenterien des Wurmfortsatzes von Ratten verwendet, die mit iRBC-Suspensionen bedeckt werden können. Obwohl *P. falciparum* streng wirtsspezifisch ist, konnte in dieser Studie aufgrund der Gemeinsamkeiten in der Struktur der Endothel-Rezeptoren Adhäsionsvorgänge unter Fluss beobachtet werden. Die erhaltenen Ergebnisse stimmten sehr gut mit Beobachtungen überein, die man post-mortem an Malaria-Infizierten gemacht hat. An welchen Rezeptor die Parasiten allerdings banden, ging aus dieser Studie nicht hervor. Auch waren keine quantitativen Ergebnisse in Bezug auf die Anzahl der gebundenen Zellen vorhanden, ebenso sind die vorherrschenden Fließgeschwindigkeiten unbekannt [104, 106]. Daher fand diese Methode wohl ebenfalls keinen festen Platz in der Malaria-Forschung.

Zuletzt gibt es noch in vitro „flow-based“ Assays, die unter verschiedensten Wand-Scher-Stressen durchgeführt werden, von denen angenommen wird, dass sie den Werten in vivo entsprechen. In diesem System können die iRBCs direkt beobachtet und der Scher-Stress bestimmt werden, der benötigt wird, damit die Zellen an Endothelzellen oder immobilisierte, aufgereinigte Rezeptoren binden können (s. Abbildung 16). Zudem können die Zellen auch wieder unter dem Scher-Einfluss abgelöst und die Stärke der Bindung gemessen werden. Im Jahr 1995 wurde diese bisher für Adhäsionsstudien an weißen Blutzellen, z.T. auch an Neutrophilen und Sichelzell-Erythrozyten verwendete Methode für Untersuchungen mit *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten angewandt. Dabei wurden iRBCs einer bestimmten Konzentration über mit Endothelzellen bewachsene Kammern gepumpt. Das

Adhäsionsverhalten konnte über ein über der Kammer befindliches Videomikroskop beobachtet, und die gebundenen Zellen direkt gezählt werden [104]. Dieses System wurde zumindest im Jahr 2000 bei der Untersuchung der Bindung von iRBCs an Hyaluronsäure (HA) verwendet, welche zusammen mit CSA im Synzytiotrophoblasten der Plazenta vorkommt [107]. Doch auch bei dieser Methode kann nicht festgestellt werden, ob tatsächlich eine stabile spezifische Bindung ausgebildet wurde, oder ob die Zellen allein durch Sedimentation auf der entsprechenden Unterlage immobilisiert wurden.

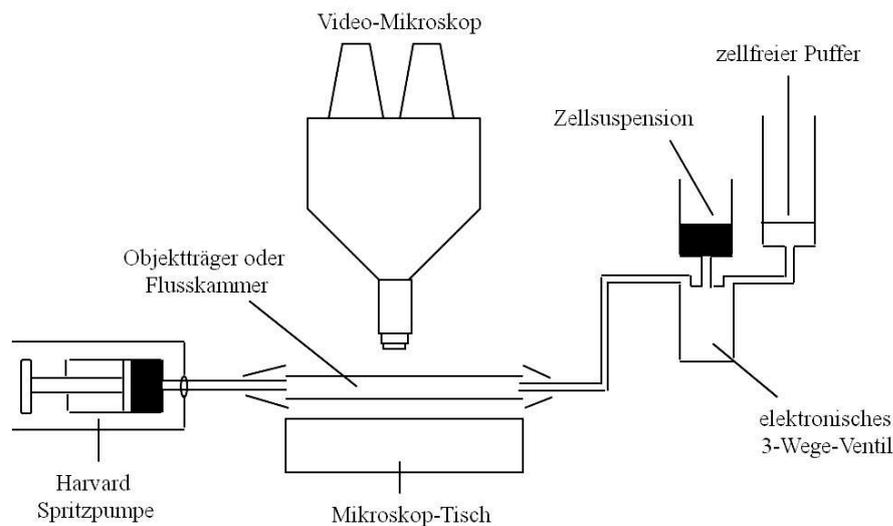


Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines in vitro „flow-based“ Assays, bei dem die zu untersuchende Zellsuspension durch dünne Zuläufe über in Kammern wachsende adhärenente Zellen gepumpt wird, wodurch die in der Suspension enthaltenen Zellen Scherstress erfahren. Der Ablauf der Adhäsion wird mittels eines über der Kammer angebrachten Videomikroskops beobachtet, aus [104].

1.4 Biosensorik & Schwingquarze

Zur Untersuchung verschiedenster molekularer Interaktionen werden heutzutage vermehrt Biosensoren eingesetzt. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass sie an einen sog. Transducer gekoppelt sind, der es ermöglicht, eine erfolgte Interaktion, bzw. den Ablauf einer solchen in ein auswertbares elektrisches Signal umzuwandeln. Die Funktionsweise der Biosensoren basiert dabei auf verschiedenen physikalischen Phänomenen. Am häufigsten sind in der Forschung optische Sensoren verbreitet, die allerdings für die Untersuchung von z.B. Erythrozyten oder Vollblut oft nicht geeignet sind. In dieser Arbeit wurden hingegen akustische Sensoren zur Untersuchung der PfEMP1-vermittelten Sequestrierung bei *P. falciparum* angewandt, die in diesem Kapitel nun ausführlicher beschreiben werden. Dabei erfolgt zunächst ein kurzer Umriss der physikalischen Grundlagen, gefolgt von einer Beschreibung der Anwendung dieser Methodik.

1.4.1 Piezoelektrischer Effekt

Der piezoelektrische Effekt wurde erstmals 1880 von den Brüdern Pierre und Jacques Curie beschrieben. Der Begriff leitet sich aus dem Griechischen piezo: Druck ab. Bei piezoelektrischem Material handelt es sich ausschließlich um kristalline Strukturen ohne Symmetriezentrum, d.h. die Ladungsverteilung in der Elementarzelle kann dort nicht gespiegelt werden. Dieses piezoelektrische Material ist dadurch gekennzeichnet, dass unter dem Einfluss einer mechanischen Deformation wie z.B. Druck die Kristalle durch Verzerrung des Kristallgitters polarisiert werden. Dabei treten an den Enden der polaren Achsen Oberflächenladungen auf (s. Abbildung 17). Umgekehrt kann auch durch das Anlegen einer elektrischen Spannung der Kristall messbar deformiert werden, welches entsprechend als reziproker piezoelektrischer Effekt bezeichnet wird. Durch das Anlegen einer Wechselspannung können daher je nach Materialeigenschaft und Schnittwinkel mechanische Schwingungen angeregt werden. Viele Kristalle weisen den piezoelektrischen Effekt auf, doch bei Quarz sind die verschiedenen mechanischen, physikalischen und chemischen Eigenschaften in geeigneter Form vorhanden [108, 109].

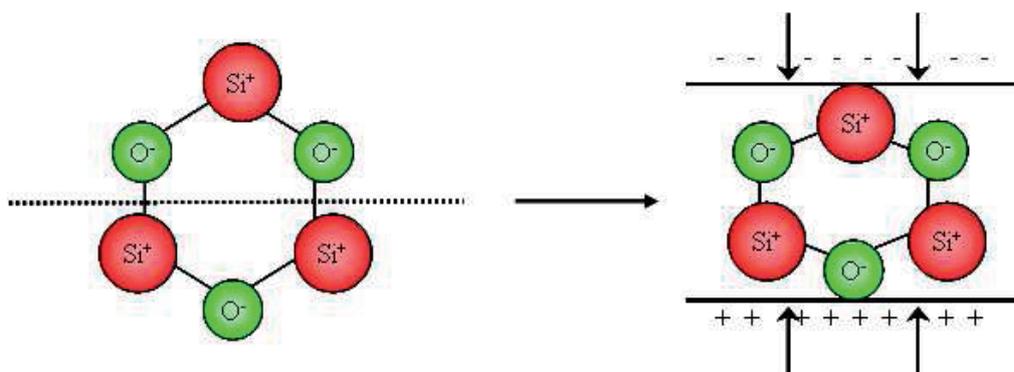


Abbildung 17: Schematische Darstellung des piezoelektrischen Effekts am Beispiel von α -Quarz (SiO_2). Links dargestellt ist die Elementarzelle des Quarzes, die an keinem Punkt gespiegelt werden kann, wie mit der gestrichelten Linie veranschaulicht ist. Wird durch eine mechanische Spannung (Pfeile) der Kristall deformiert, verschieben sich die Ladungsschwerpunkte und es entstehen an der Oberfläche elektrische Ladungen (rechts), modifiziert nach [110-112].

1.4.2 Schwingquarzsensoren

Schwingquarze sind meist runde Scheibchen aus einkristallinem α -Quarz (SiO_2), der piezoelektrische Eigenschaften aufweist. Je nachdem, in welchem Winkel der Quarz zur optischen Achse geschnitten wird, lassen sich Schwingungsformen und Temperaturabhängigkeiten der mechanischen Schwingung festlegen. In dieser Arbeit wurden sog. AT-geschnittene ($35^\circ 15'$) α -Quarze verwendet (s. Abbildung 18), auf deren beiden

Oberflächen geeignete Goldelektroden aufgebracht sind. Eine daraus resultierende wichtige Eigenschaft ist die Frequenzstabilität des Sensors in einem Temperaturbereich von 0-50°C.

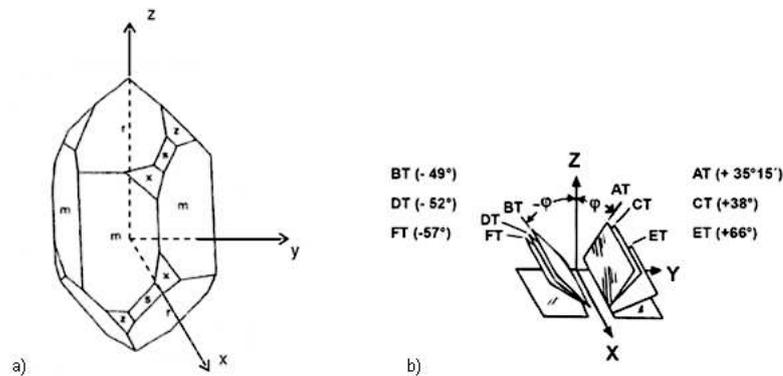


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines α -Quarzes, **a)**, und der verschiedenen möglichen Schnittwinkel, in denen der Kristall geschnitten werden kann, **b)** [113].

Durch Anlegen einer Wechselspannung über einen geeigneten Schaltkreis kann der Quarz mit der für ihn typischen Eigenfrequenz zur Schwingung angeregt werden, weswegen die Sensoren auch als Resonatoren bezeichnet werden.

Da die von einer Elektrode ausgehende resultierende Scherwelle in einem räumlich begrenzten Medium (dem Quarz) gebildet wird, wird diese an der gegenüberliegenden Seite des Quarzes reflektiert und es wird eine gegenläufige zweite Welle erzeugt. Bei der hierbei erzeugten stehenden Welle handelt es sich um eine Transversalwelle, da die Schwingungsrichtung senkrecht zur Ausbreitungsrichtung liegt. Diese Transversalwelle breitet sich im Inneren des Quarzes aus und weist an den gegenüberliegenden Schwingquarzflächen einen Schwingungsbauch (maximale Amplitude) und im Zentrum einen Schwingungsknoten mit verschwindender Amplitude auf (Sinus- bzw. Cosinusfunktion; s. Abbildung 19). Die Dicke des Quarzes bestimmt dabei die halbe Wellenlänge der Resonanz, wobei gilt: je dünner der Quarz desto höher die Resonanzfrequenz. Am häufigsten finden Sensoren mit einer Frequenz von 5-20MHz Verwendung in der Sensorik [108, 109, 114].

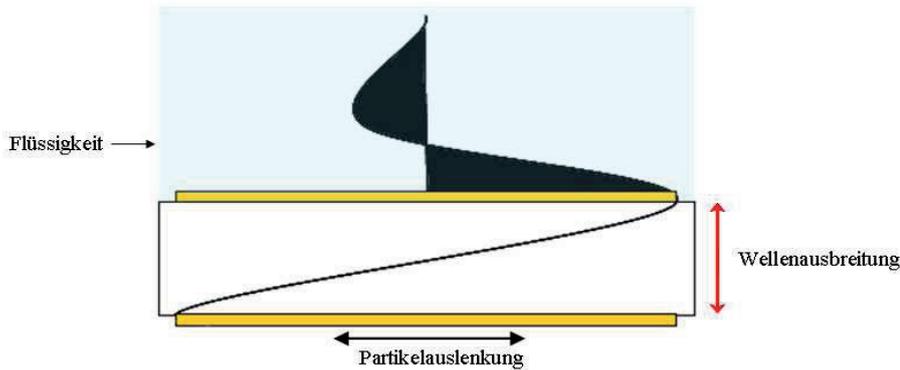


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Ausbreitung einer Scherwelle (Transversalwelle) vom Schwingquarz in die angrenzende Flüssigkeit (hellblau). Im Sensor entsteht eine stehende Welle, die in der Flüssigkeit gedämpft wird. Dadurch entsteht dort eine abnehmende (evaneszente) Scherwelle (schwarz gefüllt). Der schwarze Doppelpfeil zeigt die Auslenkung der Teilchen, der rote Doppelpfeil die Ausbreitungsrichtung der Welle; modifiziert nach [108].

Die sensorischen Eigenschaften der Schwingquarzsensoren kommen durch ein bedingtes Einkoppeln der stehenden Transversalwelle in das angrenzende Medium zustande. Diese Welle klingt unmittelbar an der Grenzfläche zwischen Schwingquarz und Medium ab, da sich in Flüssigkeiten oder Gasen Transversalwellen aufgrund fehlender Rückstellkräfte nicht ausbreiten können. (s. Abbildung 19). Die Eindringtiefe der Welle hängt dabei sowohl von der Dichte als auch von der Viskosität der über dem Quarz stehenden Flüssigkeit ab. Kommt der Sensor also mit wässrigen Lösungen in Kontakt, führt dies zu einem Energieverlust. Das bedeutet, dass der Quarz in Abhängigkeit von der Zähigkeit des Mediums entweder stärker oder schwächer gedämpft wird [108, 109, 114].

Die grundlegende Theorie zur Veränderung der Frequenz des Sensors durch Anlagerung einer dünnen starren Schicht an den Sensor in Luft oder Vakuum wurde 1959 von Sauerbrey beschrieben. Dabei gilt, dass es durch die Anlagerung von Masse zu einem linearen Abfall der Resonanzfrequenz kommt, wie in Gleichung (1.0) dargestellt ist. Dabei ist Δf_m die Frequenzänderung, herbeigeführt durch die aufgebrauchte Masse, f_0 die Grundfrequenz des Quarzes, ρ_q die Dichte und d_q und die Dicke des Quarzes. Durch die Einführung der Massenbelegung φ , die die aufgebrauchte Masse/Fläche wiedergibt, und der Frequenzkonstante $N = f_0 \cdot d_q$ ergibt sich die Sauerbrey-Gleichung:

$$\Delta f_m = - \frac{f_0 \cdot \varphi}{\rho_q \cdot d_q} = - \frac{f_0^2}{\rho_q \cdot N} \cdot \varphi = -C_f \cdot \varphi, \text{ mit} \quad (1.0)$$

$$C_f = \frac{f_0^2}{\rho_q \cdot N} \text{ als Schichtwägemempfindlichkeit.} \quad (1.1)$$

Daraus kann entnommen werden, dass die Frequenz des Quarzes bei zunehmender Massenbelastung proportional zur Masse abnimmt, wie durch das negative Vorzeichen dargestellt ist.

Die Empfindlichkeit des Sensors ist in der Mitte am höchsten und wird zum Rand hin immer geringer. Damit können die Dickenschwinger als sehr genaue Waagen dienen und werden deswegen auch als Quarzmikrowaagen (QCM, quartz crystal microbalance) bezeichnet. Geeignet ist dieses Modell in der massensensitiven Sensorik genau genommen nur im Vakuum oder Gasphase zur Bestimmung von aufgedampften Schichtdicken [115, 116]. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich bei der Anlagerung kleinster Massen (Feststoffe, Flüssigkeiten und Gase) an die Schwingquarz-Oberfläche die Resonanzfrequenz der Schwingung deutlich ändert. Die Nachweisgrenze liegt dabei im Nanogramm-Bereich, daher die Bezeichnung als Mikrowaage.

Kanazawa passte dieses Modell von Sauerbrey dann 1997 der Anwendung von Schwingquarzen in newtonschen, also viskosen Flüssigkeiten an, wie in Formel (2.0) dargestellt ist:

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_l \cdot \rho_l}{\pi \cdot \mu_q \cdot \rho_q}} = -C_1 \cdot \sqrt{\eta_l \cdot \rho_l} \quad (2.0)$$

Hierbei werden sowohl Viskosität und Dichte (η_l und ρ_l) der umgebenden Flüssigkeit, als auch das Schermodul und die Dichte (μ_q und ρ_q) des Quarzes mit einbezogen. Letztere lassen sich in die Flüssigkeitsempfindlichkeit C_1 des Quarzes mit einbeziehen. Somit kann eine effektive Massenbelastung, abhängig von der Eindringtiefe der transversalen Scherwelle vom Quarz in das angrenzende Medium, berechnet werden.

Durch den Einsatz von speziell entwickelten Oszillatorschaltungen ist es möglich geworden, die zumeist in Luft oder Vakuum eingesetzten Schwingquarzsensoren auch für Untersuchungen in flüssigen Medien einzusetzen. Diese regen den Schwingquarz zu einer stabilen Schwingung an und gleichen durch das angrenzende wässrige Medium resultierende Dämpfungsverluste aus [108, 115].

1.4.3 Anwendung von Schwingquarzsensoren

Schwingquarze werden industriell in großen Mengen produziert und sind somit kostengünstig. Eingesetzt werden sie vor allem in der Elektronik, wo sie als Taktgeber in Uhren, Computern, etc. fungieren [108, 115].

Daneben kann die Technik auch für die Bestimmung von Viskositätsänderungen in der flüssigen Phase eingesetzt werden (s. Kapitel 1.4.2).

Wie aus Abbildung 20 zu entnehmen ist, wurden akustische Sensoren gerade in den letzten 5-10 Jahren verstärkt in den Chemie- und Biowissenschaften eingesetzt, um eine Vielzahl von wissenschaftlichen und klinischen Fragestellungen zu untersuchen. Denn neben der Untersuchung von Lipidmembranen und kleinsten Molekülen in der Grenzflächenchemie können auch ganze Zellen als zu untersuchende Analyten in Flüssigkeiten verwendet werden. Besonderes Augenmerk liegt dabei in den Biowissenschaften in der Aufklärung immunologischer Vorgänge, also von Protein-Protein-Interaktionen, indem durch die Aufbringung von Antikörpern die Ankopplung spezifischer Antigene, die auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden, nachgewiesen werden. Umgekehrt können auch die relativ leichten Antigene auf dem Quarz immobilisiert werden, um in einer Probe die schwereren Antikörper nachzuweisen. Die QCM-Technik wird weiterhin für die Detektion von Nukleinsäuren und von DNA-Protein-Interaktionen, für die Untersuchung von Protein-Adsorption auf Oberflächen, etc. eingesetzt. [110, 115].

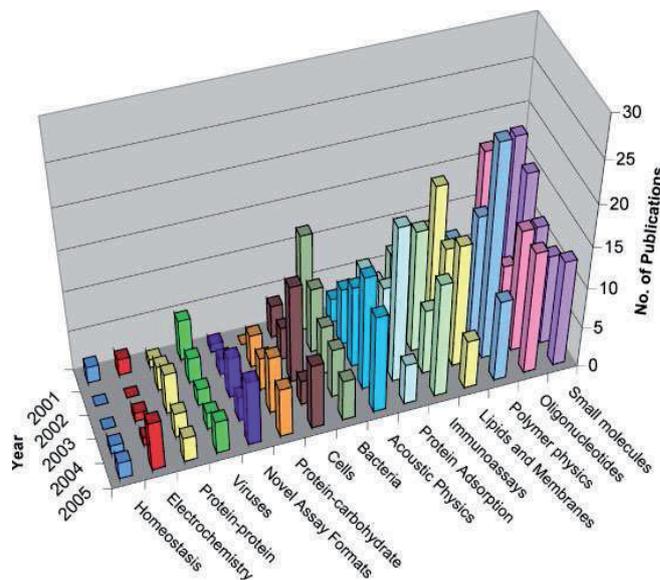


Abbildung 20: Übersicht über die sich mit Schwingquarz-Biosensoren beschäftigenden Veröffentlichungen aus den Jahren 2001–2005 [115].

Die entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung geeigneter Systeme zur Untersuchung der verschiedenen Phänomene ist die Funktionalisierung der Sensoroberfläche, um die entsprechenden Rezeptoren zu immobilisieren.

Die am häufigsten verwendete Methode ist die nicht kovalente Aufbringung der zu untersuchenden Antigene. Besonders einfach gestaltet sich dabei die Aufbringung von Proteinen, die meist nur auf den Sensor aufgetropft und dann über Physisorption auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden. Kunststofflösungen (wie Polystyrol oder Polyethylen) werden dagegen meist per spin-coating auf die Oberfläche gebracht. Problematisch hierbei ist, dass sich die Moleküle ungeordnet anlagern. Dadurch kann es vorkommen, dass ein Teil der aufgetragenen Antigene oder Antikörper nicht mehr mit dem entsprechenden Gegenpart in Verbindung treten kann. Dies lässt sich jedoch durch die Verwendung von z.B. Protein A beheben, an welches die Antikörper mit dem Fc-Teil binden, wodurch der variable Teil (Fab-Fragment) ins Medium ragt [117].

Bei der kovalenten Bindung werden gezielt Bindungen über Schwefelgruppen an die Goldoberflächen der Elektroden generiert. Werden dabei langkettige Moleküle verwendet, kommt es zur Ausbildung sogenannter self-assembling monolayer (SAM). Bei Verwendung von Proteinen werden diese zumeist dahingehend mutiert, dass z.B. durch das Anhängen von Cystein die Bindung an die Goldoberfläche via Schwefelbrücken zustande kommt. Die Verwendung eines Linkers zwischen Elektrode und Antigen/Rezeptor stellte sich in einer Veröffentlichung als weniger geeignet dar, da dort keine Detektion der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung mehr möglich war [118].

Da in dieser Arbeit Protein-Protein-Interaktionen und Zelladhäsionsvorgänge von infizierten Erythrozyten über PfEMP1, bzw. nur dessen Domänen an spezifische Rezeptoren des Endothels und der Plazenta untersucht werden, wird im Folgenden kurz der bisherige Stand der Wissenschaft in diesen Bereichen dargestellt.

Protein-Protein-Interaktionen

Der erste piezoelektrische Immunsensor wurde 1972 von Shons et al. entwickelt. Dabei erfolgte eine Detektion von anti-BSA-Antikörpern über auf dem Sensor immobilisiertes BSA. Aufbauend auf diesem ersten piezoelektrisch basierten Immunassay haben sich weitere verschiedene Immunassays entwickelt: Sowohl direkte als auch ablösende und kompetitive, mit denen Immunmechanismen verschiedener Krankheiten nachvollzogen und weitere wichtige Biomarker detektiert werden können. Durch Verwendung von Antikörperbeschichteten beads war es dann auch möglich, durch die erhöhte Masse deutlichere Signale zu erhalten. Bisher existieren QCM-basierte Assays für den Nachweis von C-Protein (Marker für akute Inflammation), HSA (humanes Serumalbumin; Indikator für Nierenschädigungen

bei Diabetikern), Insulin, *Schistosoma japonicum* und für *Toxoplasma gondii* und viele weitere [119-122].

Im Gegensatz zu den konventionellen Methoden, wie Agglutinations-Assays weist der Einsatz von akustischen Sensoren eine enorme Zeitersparnis auf. Auch liegt ein weiterer Vorteil dieser Methode darin, dass außer den reinen Antikörpern keine weiteren Marker benötigt werden (wie bei ELISA), die über ein optisches Signal die Antigen-Antikörper-Interaktion wiedergeben.

Zelladhäsion eukaryotischer Zellen

In diesem Falle konnte vor wenigen Jahren gezeigt werden, dass über die Detektion von Veränderungen in der Viskoelastizität oder von Veränderungen der Steifheit der auf den Sensor aufgetragenen Schicht Rückschlüsse auf die Zelldynamik gezogen werden können [110, 123]. Zudem ist eine Detektion des Wachstums adhärenter Zellen und deren Interaktion untereinander möglich [124, 125]. Auch der Einfluss diverser Adhäsionsmoleküle auf die Adhäsion und weitere Entwicklung kann mit QCM-Sensoren untersucht werden. Die mittels QCM erhaltenen Ergebnisse wurden dabei stets mit entsprechenden etablierten Methoden verglichen, und eine gute Übereinstimmung der Methoden wurde festgestellt. Das bedeutet, dass QCM-Sensoren eine gute Alternative zu konventionellen Methoden darstellen, da gerade bei Zell-Zell-Interaktionen Veränderungen on-line, also zeitnah detektiert werden ohne die Zellen zu schädigen [126, 127]. Des Weiteren ist es möglich, bereits gebundene Zellen wieder abzulösen, indem der Quarz zu stärker werdenden Scherschwingungen angeregt wird [110, 111, 128].

Allerdings ist zu beachten, dass z.B. das Gewicht der angelagerten Zellen nicht bestimmt werden kann, da sich diese wie viskoelastische Körper verhalten. Dies bedeutet, dass die Scherwelle in dem wässrigen System von der Zelle „verschluckt“ wird. Weiterhin handelt es sich bei dem Prozess der Zelladhäsion nicht um einen Ein-Schritt-Mechanismus. In der Regel findet eine initiale Bindung statt, gefolgt von einer Vergrößerung der adhärenierenden Fläche, oder von einer Art Rollen der Zelle über den Sensor, wobei ständig Bindungen aufgebaut und wieder gelöst werden. Diese verschiedenen Abläufe beeinflussen das Schwingverhalten des Quarzes in oft nicht vorhersehbarer Weise [110, 129].

Durch Weiterentwicklungen ist es möglich geworden, Blutgruppen, Bakterien, bakterielle Toxine und sogar Viren (*Herpes simplex*-Virus, Influenza) nachzuweisen, sowie die Entstehung von Biofilmen nachzuvollziehen [108, 110, 114, 115].

Wie zu erkennen ist, sind bereits einige Studien zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen und von Zelladhäsionsvorgängen vorhanden. In der Malaria-Forschung, insbesondere bei der Untersuchung der Sequestrierung, wurde diese innovative Methode jedoch noch nicht eingesetzt. Daher ist der Anspruch zur Etablierung eines geeigneten Systems sehr hoch.

1.4.4 Sensorplattform *FidgeType 1* und deren bisherige Anwendung

Durch die Kooperation mit der Industrie ist es der Biosensorik-Gruppe ermöglicht worden, eine vollautomatische Sensorplattform, die zwei massensensitive Schwingquarz-Sensoren umfasst, zu entwickeln [110]. Sie basiert auf einem weit verbreiteten Aufbau, dessen Prinzip in Abbildung 21 dargestellt ist. Bei diesem Grundtypus wird die Durchflusszelle, in der sich der Quarz befindet, durch 2 Dichtringe abgedichtet. Diese sind dabei so weit an den Rand des Quarzes angebracht, damit dieser nur minimalst durch den Druck der Dichtringe gestört wird. Durch einen Zu- und Abfluss kann der zu untersuchende Analyt über den Sensor geleitet werden [108].

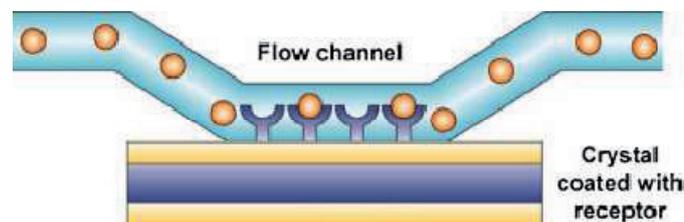


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Schwingquarz-Biosensors. Über den mit einem Rezeptor belegten Sensor wird der in einer Lösung vorliegende zu untersuchende Analyt geleitet. Die resultierende Bindung wird vom Sensor on-line detektiert [115].

Bei dem hier verwendeten System erfolgt die fluidische Abdichtung über einen Dichtungsring und eine spezielle Klebefolie, in die der Sensor geklebt wird. Zusätzlich ist die vorhandene Anlage über Peltier-Elemente vollständig thermostatisiert, was eine Untersuchung unter konstanten und physiologisch realen Bedingungen ermöglicht. Auf die Sensorplattform wurden zwei parallel, bzw. seriell zueinander schaltbare Durchflusszellen für den Betrieb der massensensitiven Schwingquarz-Sensoren in einer biokompatiblen Fließ-Injektions-Anlage aufgebracht, wodurch die gleichzeitige Vermessung zweier Analyten ermöglicht wird. Die Fließ-Injektions-Anlage besteht dabei aus einem 8- und einem 2-Wege-Ventil, einem 2-Wege-Hahn und aus 2 Peristaltikpumpen, wodurch ein kontinuierlicher Probendurchfluss gewährleistet ist. Auch besteht darüber die Möglichkeit, exakt definierte Volumina von bis zu

sieben verschiedenen Analyten den entsprechenden Messzellen zuzuführen. Die Fließeigenschaften wurden weiterhin soweit optimiert, dass der Fluss von Puffer- und der zu analysierenden Lösungen blasenfrei stattfinden kann. Da die Durchflusszellen mit einem Messkammervolumen von 30µl zudem optisch zugänglich sind, ist damit der Einsatz einer Kamera möglich, wodurch die Vorgänge im Innern der Durchflusszelle stets kontrolliert und dokumentiert werden können. Auch wurde der Umgang mit den Schwingquarz-Sensoren optimiert, um den Ein- und Ausbau der Sensoren zu erleichtern und um die Aufbringung verschiedener Erkennungsstrukturen/ Funktionalisierungen auf die Oberfläche der Sensoren zu vereinfachen (s. Kapitel 2.1.4). Bedient, bzw. gesteuert wird die Sensorplattform, einschließlich der Datenerfassung, der Thermostatisierung und der Fließ-Injektionsanlage, über einen handelsüblichen Computer mit einer eigens entwickelten benutzerfreundlichen Software (s. Abbildung 22) [110, 111, 130].

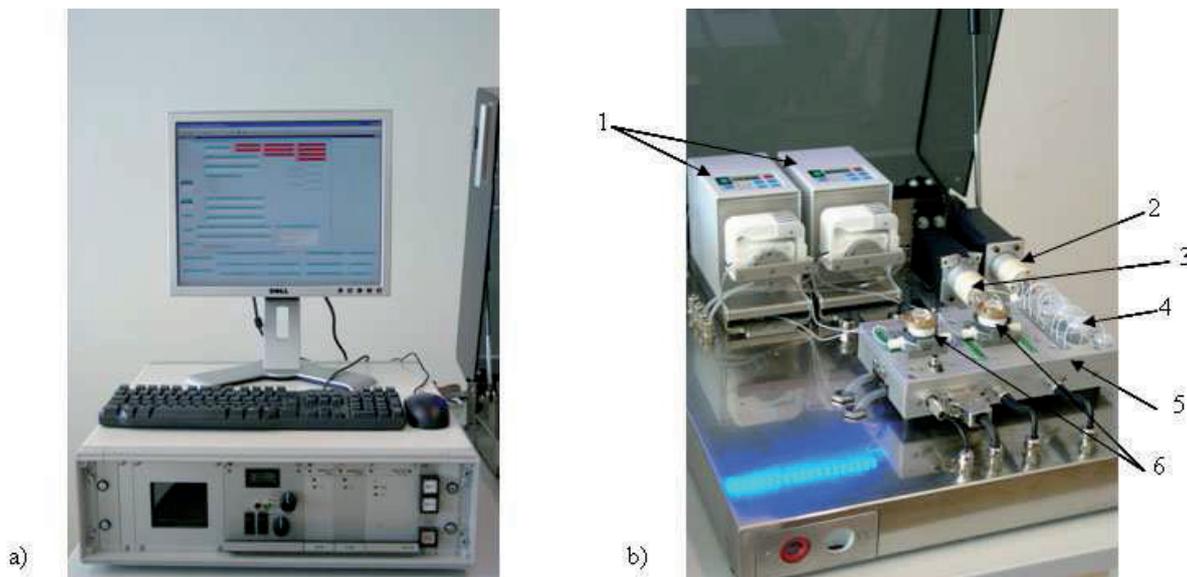


Abbildung 22: Sensorplattform *FidgeType FgT1* mit der in **a)** dargestellten Steuereinheit; **b)** zeigt den sensorischen Teil der Messanlage, der aus Peristaltikpumpen (1), einem 2-Wege- (2), einem 8-Wege-Ventil (3), Halterungen für Probengefäße (4), einem thermostatisierbaren Sensorblock (5) und 2 fluidischen Messzellen (6) aufgebaut ist.

Basierend auf der QCM-Technik entwickelte die Biosensorik-Gruppe ein Verfahren, um zuverlässig und schnell Blutgruppenbestimmungen durchzuführen. Bisher ist es möglich die Blutgruppen des AB0-Systems, den Rhesusfaktor, die Kell- und Duffy-Blutgruppe nachzuweisen. Dabei erfolgt die Blutgruppenbestimmung über den Nachweis der jeweiligen Antigene der Erythrozyten über spezifische Antikörper oder Lektine. Auch ist der Nachweis von anti-A- und anti-B-Antikörpern (Isoagglutinine) aus Plasma möglich [110, 111, 131-135].

Im Zuge der Entwicklung eines Geräts zur Bestimmung der Blutgruppen wurde ein mikrofluidisches System entwickelt [110, 111, 131]. Des Weiteren konnte ein System zur Hämostase-Diagnostik aufgebaut werden, das mit den am Markt vorherrschenden Systemen gut übereinstimmt. In diesem Projekt wurde das bereits bestehende mikrofluidische Modul weiterentwickelt, wodurch in naher Zukunft die Entwicklung eines leicht zu bedienenden Gerätes realisiert werden kann [111, 112, 136-138]. Im Bereich der Malaria-Forschung wurden bereits Versuche durchgeführt, die sich mit der Freisetzung der Merozoiten am Ende der erythrozytären Schizogonie und dem Einfluss verschiedener Medikamente auf diesen Vorgang befassten [139].

1.5 Zielsetzung

Die Adhäsion infizierter Erythrozyten reduziert die Resonanzcharakteristik von Schwingquarz-Biosensoren, deren Oberfläche mit entsprechenden Rezeptoren beschichtet wurde. Für die Ausprägung der klinischen Symptomatik der *Plasmodium falciparum* Malaria ist hauptsächlich PfEMP1 verantwortlich, dessen spezifische Bindung an ICAM-1 (Rezeptor des Gehirns), Chondroitin-Sulfat A (Rezeptor der Plazenta) und an CD36 mithilfe einer in der Forschungsgruppe entwickelten Plattform untersucht wurde. Dazu waren folgende Probleme zu lösen:

- Entwicklung geeigneter Schichtsysteme zur Immobilisierung der Rezeptoren auf der Goldoberfläche der Quarze
- Detektion der Bindung von infizierten Zellen und rekombinanten Adhäsionsmolekülen
- Entwicklung geeigneter Kontrollsysteme
- Inhibierung der Bindung infizierter Erythrozyten an die Rezeptoren

Die quantifizierten Ergebnisse wurden hinsichtlich der Bindungsaffinitäten auf die verschiedenen Rezeptoren miteinander verglichen, was mit konventionellen Methoden nicht möglich ist. Auch erfolgte ein direkter Vergleich mit den bisher in der Malariaforschung verwendeten Methoden.

2. Material und Methoden

In den folgenden Kapiteln werden die in dieser Arbeit verschiedenen angewandten Methoden zur Schichtentwicklung und Zellkultur dargestellt. Des Weiteren werden die durchgeführten Schwingquarzmessungen ausführlich beschrieben. Zuletzt erfolgt eine Aufstellung der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Gerätschaften.

2.1 Material

Dieses Kapitel befasst sich mit der Beschreibung der verwendeten Parasitenstämme, der Melanomzelllinie sowie der PfEMP1-Domänen und den Schwingquarzsensoren.

2.1.1 Parasiten

Der Vorgang der PfEMP1-vermittelten Zytoadhäsion wurde bei 3 verschiedenen Parasitenstämmen (3D7, FCR3, NF54^{CD36-}) untersucht. Die Unterteilung der Plasmodien in Stämme resultiert daher, dass sich die Parasiten hinsichtlich der Resistenz auf verschiedene Medikamente, der Infektiosität, in der Präferenz für bestimmte *Anopheles*-Arten, in den Oberflächen-Antigenen etc. unterscheiden [140].

- NF54: Die ursprüngliche Herkunft dieses Parasitenstammes ist unbekannt, isoliert wurde er in den Niederlanden. Es ist bekannt, dass NF54 an CD36 bindet [58]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine analog zu [141] genetisch veränderte Variante (NF54^{CD36-}) verwendet, die das CD36-bindende PfEMP1-Protein nicht exprimiert. Dieser Zellstamm wurde von Corinna Enderes in der Arbeitsgruppe von Matthias Frank im Rahmen Ihrer Dissertationsarbeit erstellt und freundlicherweise vorab zur Verfügung gestellt. Die phänotypische Analyse dieses Zellstamms wird aktuell durchgeführt und im Rahmen von Frau Enderes Dissertationsarbeit veröffentlicht werden.
- 3D7: Dieser Stamm stammt von NF54 ab und findet häufig Verwendung in der Forschung, insbesondere bei der Untersuchung der Zytoadhäsion. Er ist dadurch gekennzeichnet, dass er an verschiedene Rezeptoren binden kann und keine Präferenzen für einzelne Rezeptoren aufweist. Daher stellen iRBCs dieses Stammes geeignete Testorgansimen dar, um zu prüfen, ob mit der hier angewandten innovativen Schwingquarz-Sensorik die Adhäsion von iRBCs an Rezeptoren detektiert werden kann.
- FCR3: Der Ursprung dieses Stammes liegt in Gambia, etabliert als Laborstamm wurde er 1976 von Trager et al. an der Rockefeller Universität, New York. Die Bezeichnung

leitet sich dabei von *falciparum culture* (FC) und dem entsprechenden Kürzel der Rockefeller Universität (R) ab. Durch Selektierung dieses Stammes zur Adhäsion an CD36 oder CSA ergeben sich hieraus wieder 2 Stämme: FCR3-CD36 und FCR3-CSA, die beide in dieser Arbeit verwendet wurden. Diese Stämme binden spezifisch an ihre Rezeptoren CD36 und CSA, nicht jedoch an ICAM-1. FCR3-CSA eignet sich insbesondere sehr gut für die Untersuchung der plazentalen Malaria, da dieser Stamm dieselben typischen Charakteristika aufweist, die auch bei plazentalen Parasiten auftreten [42, 45, 75, 142, 143].

Alle verwendeten Parasitenstämme wurden freundlicherweise vom Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.1.2 C32 amelanotische Melanom-Zellen

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine etablierte Zelllinie des weißen Hautkrebses, die ebenfalls vom Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt wurde. Dort wurden diese Zellen von der American Type Culture Collection (ATCC CRL-1585) bezogen. Diese adhären Zellen exprimieren sowohl CD36 als auch ICAM-1 und CSA. Bei der Untersuchung der Adhäsion von *P. falciparum* an CD36 sind diese C32-Zellen die am häufigsten verwendeten. Der Vorteil gegenüber anderen Zelllinien ist, dass C32-Zellen zur Expression von CD36 nicht stimuliert werden müssen. Da es sich hierbei um unempfindliche Krebszellen handelt, ist deren Handhabung bzgl. der Kultivierung einfach [58, 72, 144-146]. Weiterhin ist bekannt, dass der Parasitenstamm FCR3 an C32-Zellen bindet, wodurch sie für die Untersuchung der Adhäsion dieser Parasiten geeignet sind [42].

2.1.3 Chinese hamster ovary-Zellen (CHO)

Diese Zellen werden ebenfalls häufig für Untersuchungen bzgl. der Zytoadhäsion von *P. falciparum* verwendet. Die hier verwendeten Zellen waren mit einem Konstrukt des Rezeptors ICAM-1 und mit GFP (green fluorescent protein) versehen und wurden vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg zur Verfügung gestellt.

2.1.4 PfEMP1-Domänen

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Domänen wurden allesamt von Frau Dr. Sabine Predehl (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) rekombinant hergestellt [147]. Dabei handelte es sich zumeist um DBL β -Domänen, welche von verschiedenen Genen kodiert wurden und damit verschiedenen *var*-Gruppen (A-C) zuzuordnen sind. Daneben

wurden eine CIDR1 α -, sowie drei DBL1 α - und eine DBL1 ϵ -Domäne verwendet. Eine Auflistung der einzelnen Domänen ist in Tabelle 3 dargestellt. Für die späteren Messungen wurden die Domänen der Übersicht halber nummeriert.

rekombinante PfEMP1-Domänen				
<i>var</i> -Gruppe	Gen	Domäne	MW [kDa]	Nummer
A	PF13_0003	DBL2 β	17,2	4
		DBL2 β C2	30	5
		DBL5 β	13	6
		DBL5 β C2	25	7
	PF11_0008	DBL4 β	13,4	2
		DBL4 β C2	24	3
	PFD0020c	DBL1 α	13,3	8
		DBL2 β	14,6	9
		DBL2 β C2	24	10
	PFI1820w	DBL1 ϵ	11,5	11
B	PF07_0050	DBL1 α	14,2	20
		CIDR1 α	28,3	21
		DBL2 β C2	30,4	24
C	PFF0845c	DBL2 β	14,6	16
	PF07_0048	DBL1 α	16,4	14

Tabelle 3: Übersicht über die untersuchten PfEMP1-Domänen (mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Sabine Predehl).

2.1.5 Schwingquarze

Die verwendeten AT-geschnittenen Schwingquarze mit einem von Dr. F. K. Gehring entwickelten Elektrodendesign [110] wurden von der Fa. KVG (Neckarbischofsheim) bezogen. Die runden Sensoren haben einen Durchmesser von 8,5mm, eine Dicke von 166 μ m und besitzen eine Grundfrequenz von 10MHz. Die Goldelektroden wurden von KVG auf eine Chromschicht auf dem Sensor aufgedampft. Die obere Elektrode hat dabei einen Durchmesser von ebenfalls 8,5mm, d.h. sie bedeckt die Oberseite des Quarzes vollständig. Die untere Elektrode ist dagegen mit einem Durchmesser von 5mm kleiner als die obere Elektrode (s. Abbildung 23).

Um die Handhabung der Sensoren zu erleichtern, wurde von Dr. F. K. Gehring [148] ein spezielles Halterungssystem entwickelt. Dazu wird der in eine ringförmige Klebefolie aus Polyethylen mittig eingeklebte Schwingquarz wiederum mittig auf einen ringförmigen Kunststoffring geklebt (s. Abbildung 23). Dadurch kann der Quarz von unten kontaktiert werden und eine fluidische Abdichtung des Systems ist über die Klebefolie gewährleistet.

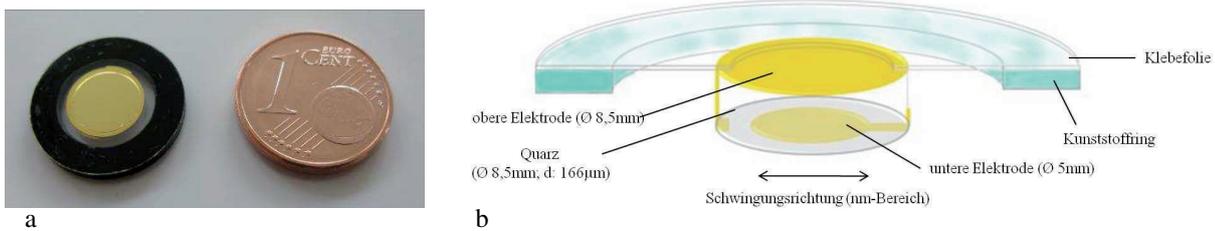


Abbildung 23: Größenvergleich zwischen einem in einen Halterring (schwarz) eingeklebten Schwingquarz-Sensor und einem 1 Euro-Cent Stück (a) sowie eine schematische Darstellung der Haltevorrichtung (b), nach [148].

2.2 Methoden

Die folgenden Unterkapitel befassen sich mit den Methoden der verschiedenen Zellkulturen, der Quarzbeschichtungen und letztlich den groben Messabläufen zur Untersuchung der Zytoadhäsion von *P. falciparum*.

2.2.1 Kultivierung der C32-Zellen

Die bei -80°C gelagerten C32-Zellen wurden zunächst mit auf 37°C vorgewärmtem Kulturmedium (Zusammensetzung s. Kapitel 2.3.1.1) mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) aufgetaut, dann in ein Tube mit 30ml vorgelegtem Medium aufgenommen und einmal mit Medium gewaschen, um das DMSO des Einfriermediums auszuwaschen, welches die zu kultivierenden Zellen ansonsten abtöten würde. Die Zellen wurden dabei jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur bei 1200rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde durch sog. „ratschen“ gelöst und die Zellen wurden in etwa 6ml Medium mit 10% FBS aufgenommen und zur Kultivierung in eine Zellkulturflasche (75cm^2) überführt. In dieser wurde zuvor Medium mit 10% FBS vorgelegt. Die Kultur wurde in einem Brutschrank bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit mit 5% CO_2 begast.

Für die weitere Kultivierung wurde das Medium ein- bis zweimal pro Woche gewechselt, wobei das Medium mit 10% FBS bei starkem Wachstum durch Medium mit 2% FBS ersetzt wurde. Dadurch wurde das Wachstum dahingehend gelenkt, dass die Zellen für längere Zeit großteils als Monolayer und nicht mehrschichtig vorlagen. Dies ist insbesondere für

fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (wie in Kapitel 2.2.3.6 erläutert) notwendig, um dort unspezifische Signale zu vermeiden. Auch für die in Kapitel 2.2.2.3 dargelegte Selektierung der Parasiten auf den C32-Zellen wird ein dichter Monolayer an C32-Zellen benötigt.

Waren die Kulturen nahezu zu 90% konfluent, d.h. waren die Böden der Zellkulturflaschen annähernd vollständig mit Zellen bewachsen, und wurden diese nicht für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen oder Parasiten-Selektionen verwendet, mussten diese gesplittet werden. Dazu wurde das Medium abgenommen und durch eine Trypsin-EDTA-Lösung ersetzt, welche die Zellen andaute und somit von der Zellkulturflasche ablöste. Eine Inkubation im Brutschrank für wenige Minuten beschleunigte diesen Vorgang. Die Inaktivierung der Verdauung erfolgte über zwei Waschschriffe mit 10% FBS-Medium. Dabei wurden die Zellen wieder bei 1200rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet im Anschluss durch „ratschen“ gelöst. Die Zellen wurden daraufhin in 10% FBS-Medium aufgenommen und erneut auf Zellkulturflaschen (25–175cm²) und Chamber-Slides aufgeteilt, in die bereits Medium mit 10% oder 2% FBS vorgelegt wurde. Das Medium mit 2% FBS wurde vorwiegend verwendet, wenn die Zellen für mehrere Wochen nicht benötigt wurden. Dadurch wurde das Splitten der Zellen erst nach etwa 4 Wochen nötig, was die Zellen schonte, da sie unter diesen Bedingungen langsamer wachsen konnten. Bei der Verteilung der Zellen auf die neuen Zellkulturflaschen wurde die Zellzahl nicht bestimmt, da eine exakte Zelldichte oder -konzentration in dieser Arbeit nicht benötigt wurde. Die Menge der zugegebenen Zellen wurde über eine Kontrolle am inversen Mikroskop abgeschätzt.

Beim Einfrieren dieser Zellen wurde zunächst in derselben Weise vorgegangen wie beim Splitten. Bei Verwendung einer konfluent bewachsenen 175cm²-Zellkulturflasche wurden die Zellen nach dem letzten Zentrifugationsschritt allerdings in 5ml Medium ohne Zusätze aufgenommen und auf 5 Cryoröhrchen verteilt. Zu jedem Cryoröhrchen wurde daraufhin jeweils 1ml Einfriermedium gegeben und die Röhrchen wurden sofort in den -80°C-Schrank gestellt. Nach wenigen Tagen konnten die Zellen für eine Langzeitlagerung in Flüssigstickstoff überführt werden.

2.2.2 Kultivierung von *P. falciparum*

Für die Kultivierung der Parasiten wurde sich an [102] und [149] orientiert, da dort die für die Malaria-Kultivierung etablierten Methoden zusammengefasst dargestellt sind. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist in Kapitel 2.3.1.1 aufgeführt.

2.2.2.1 Auftauen und Kultivierung

Die bei -150°C gelagerten infizierten Erythrozyten wurden zunächst vorsichtig bei 37°C aufgetaut und anschließend in ein 50ml Tube überführt. Daraufhin wurde bei vorsichtigem Schütteln des Tubes 1/10 des Volumens an 12% NaCl-Lösung zugetropft. Dadurch war eine gleichmäßige Vermischung der beiden Lösungen gewährleistet. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde das 10-fache des Ausgangsvolumens an 1,6% NaCl-Lösung vorsichtig unter Schütteln zugetropft. Durch diesen Prozess wurden die in der Einfrierlösung vorliegenden Zellen wieder auf physiologische osmotische Verhältnisse gebracht.

Im Anschluss an die Zugabe der NaCl-Lösungen wurden die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur bei 500xg zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen in einem 10-fachen Volumen der ursprünglichen Suspension an vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur bei 1500rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet bestimmt. Für die Kultivierung wurden die Zellen in 9,5ml vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen und der Hämatokrit (prozentualer Anteil an Erythrozyten in der Lösung) mit Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ auf 5% eingestellt. Damit sich die Zellen unter möglichst natürlichen Bedingungen entwickeln konnten, wurden sie in einem Brutschrank bei 37°C mit einem Gasgemisch aus 5% CO_2 , 5% O_2 und 90% N_2 begast.

Das Wachstum der Parasiten wurde täglich über Giemsa-gefärbte Blutausstriche kontrolliert. In der verwendeten Giemsa-Lösung ist ein Farbstoff enthalten, der DNA anfärbt. Dadurch ist es möglich, die in den zellkernlosen Erythrozyten liegenden Parasiten zu erkennen. Zur Herstellung eines Blutausstrichs wurde etwas Blut aus der Kulturflasche genommen und auf einen Objektträger getropft. Dieser Tropfen wurde mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen und an Luft getrocknet. Bei der Herstellung des Ausstriches war darauf zu achten, dass der zweite Objektträger in einem Winkel von etwa 45° angelegt wurde, um die auf die Zellen wirkenden Scherkräfte so gering wie möglich zu halten und damit ein Platzen der Zellen zu vermeiden. Zur Abtötung der infektiösen Stadien wurden die Blutausstriche für etwa eine Minute in Methanol fixiert, erneut an Luft getrocknet und in einer 10%-igen Giemsalösung für 20 Minuten gefärbt. Dabei wurden die Zellkerne der Parasiten dunkelrot bis violett und das Zytoplasma der Erythrozyten in einem hellen Rot gefärbt. Die Färbelösung wurde anschließend mit Leitungswasser abgewaschen und der Ausstrich getrocknet. Die Auswertung des Ausstrichs erfolgte am Mikroskop unter Verwendung eines 100x Öl-Immersion-Objektivs. Dabei wurden etwa 300 Zellen des Ausstrichs ausgezählt und der

prozentuale Anteil an infizierten Zellen, also die Parasitämie bestimmt. Abbildung 24 liefert eine Übersicht über die bei *P. falciparum* nachweisbaren Blutstadien.

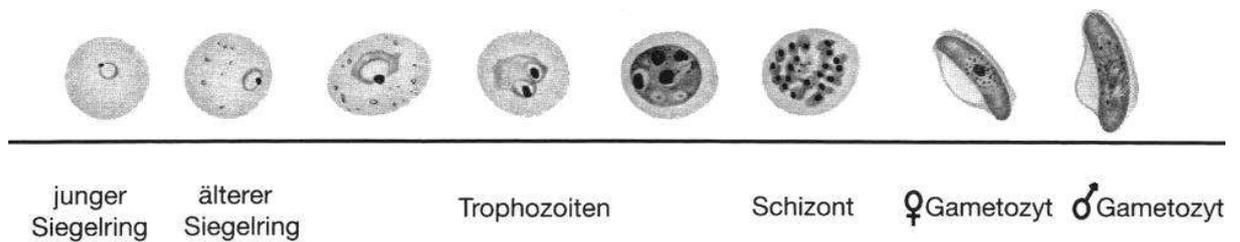


Abbildung 24: Übersicht über das im Giemsa-gefärbten Blutausstrich auftretende Erscheinungsbild der Blutstadien von *P. falciparum*, aus [15].

Lag die Parasitämie bei 4-5%, wurde die Kultur dahingehend verdünnt, dass eine Parasitämie von 1% erreicht wurde, wobei zu berücksichtigen war, dass der Hämatokrit erneut auf 5% eingestellt wurde, damit ausreichend Wirtszellen für den Befall durch die Parasiten zur Verfügung standen. War die Parasitämie geringer, wurde lediglich das Medium gewechselt. Es wurden mehrheitlich 20ml-Kulturen gehalten, wobei stets 1ml Zellen in 19ml Kulturmedium verdünnt vorlag. Um die PfEMP1-Expression herunter zu regulieren, wurden NF54^{CD36}-infizierte Zellen mit Blastocidin selektioniert.

2.2.2.2 Synchronisierung der Kultur

Im Laufe der Kultivierung kam es häufig vor, dass die Kulturen asynchron wurden, d.h. es waren sämtliche Stadien in der Kultur vorhanden, was für die geplanten Untersuchungen nicht optimal war. Über die Synchronisierungsmethode unter Verwendung einer 5%-igen Sorbitol-Lösung wurde die Kultur regelmäßig wieder synchronisiert. Hierbei wurden die empfindlichen späten asexuellen Blutstadien der Kultur abgetötet und nur die Ringstadien blieben erhalten. Dazu wurde die zu synchronisierende Kultur mit einer Parasitämie von mindestens 3-5% zunächst für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1800rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zu dem Pellet wurden 10ml 5%-ige Sorbitol-Lösung unter Schütteln getropft und für 10 Minuten bei gelegentlichem Invertieren des Tubes bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen um die Sorbitol-Lösung zu entfernen. Dabei wurde erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1800rpm zentrifugiert. Zuletzt erfolgte eine Bestimmung des Pellets, der Hämatokrit wurde auf 5% eingestellt und die Parasiten wurden wieder in Kultur genommen.

2.2.2.3 Selektion der Parasiten auf einen spezifischen Adhäsions-Phänotypen

Etwa alle 4 Wochen erfolgte ein „panning“ der iRBCs an ihre spezifischen Rezeptoren, um gute und stabile Bindungen zwischen Rezeptor und iRBCs zu erhalten. Mit dieser Methode soll gewährleistet werden, dass die Parasiten aufgrund der Antigen-Varianz nicht auf eine andere als die gewünschte PfEMP1-Variante umschalten. In den folgenden Abschnitten werden die angewandten Methoden zur Selektion der Parasiten auf CD36 und CSA dargestellt.

Selektion der CD36-Bindung

Bei dieser Methode wurden die iRBCs von 3D7 und FCR3-CD36 auf die CD36-Bindung hin über die in Kapitel 2.1.2 beschriebenen C32-Zellen selektiert, da diese CD36 in großen Mengen exprimieren. Dabei wurden stets 4 Zellkulturflaschen à 25cm² verwendet, die zu etwa 80-90% konfluent bewachsen waren.

Für den Prozess der Selektion wurde zunächst eine 20ml-Kultur von Parasiten, die großteils als Trophozoiten und/oder Schizonten und mit einer Parasitämie zwischen 8 und 10% vorlagen, in ein Tube überführt. Es folgten 3 Waschschrte mit binding-Medium, welches auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt war (vgl. auch Kapitel 1.2.3, Abschnitt CD36). Dabei wurde jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 500xg zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde daraufhin auf einen Hämatokrit von 2-3% verdünnt. Mit dieser Kultur wurden die C32-Zellen, die zuvor einmal mit binding-Medium gewaschen wurden, überschichtet. Die Zellen wurden dann für 90 Minuten bei 37°C ohne Begasung inkubiert und die iRBCs etwa alle 15 Minuten durch vorsichtiges Schütteln der Kulturflaschen resuspendiert. Nach dieser Inkubation wurden die ungebundenen Zellen durch 3 vorsichtige Waschschrte, bei denen das Medium und die ungebundenen Zellen abgesaugt und frisches Medium vorsichtig in die Flaschen pipettiert wurde, entfernt. Nach diesen Waschschrten wurden den Zellen in den 4 Zellkulturflaschen jeweils 5ml Kulturmedium und 0,25ml Erythrozytenkonzentrat zugegeben, sodass wieder ein Hämatokrit von 5% vorlag. Die Zellen wurden daraufhin erneut in Kultur genommen und am nächsten Tag, als die Merozoiten der selektierten späten Blutstadien neue Erythrozyten befallen hatten und nicht mehr an den C32-Zellen gebunden vorlagen, in eine neue Zellkulturflasche überführt und dort weiter kultiviert.

Selektion der CSA-Bindung

Bei diesem Prozess wurde ein vom Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen abgewandeltes Protokoll zu [102] verwendet. Dazu wurden 6-well Polystyrol-

Platten verwendet. Jedes well wurde mit 1ml CSA-Lösung der Konzentration 100µg/ml in PBS über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde überschüssiges CSA zweimal mit PBS abgewaschen. Die Parasiten einer 20ml-Kultur, die wie bei der obigen Methode großteils als späte Blutstadien vorlagen und eine Parasitämie von etwa 4% aufwiesen, wurden in ein Tube überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1800rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 12ml Adhäsionsmedium aufgenommen und auf die 6 wells verteilt. Nach einer Inkubation ohne Schütteln von 30 Minuten bei 37°C wurden die ungebundenen Zellen durch 4 Waschschriffe mit PBS vorsichtig entfernt. Damit die adhärenierten iRBCs wieder in Kultur genommen werden konnten, wurden sie mit 9,5ml Kulturmedium stark von den wells abgespült und mit 0,5ml Erythrozytenkonzentrat in eine Kulturflasche überführt.

2.2.2.4 Akkumulation später asexueller Stadien über magnetic cell sorting (MACS)

Wie in Kapitel 2.2.4. noch ausführlicher erläutert wird, wurden für die Untersuchung der Zytoadhäsion mit den Schwingquarz-Sensoren reine späte Blutstadien, also späte Trophozoiten und Schizonten verwendet. Eine Anreicherung dieser Stadien ist über das magnetic cell sorting (MACS) möglich [150]. Dabei wird ausgenutzt, dass das in diesen Stadien akkumulierte paramagnetische Hämoglobin-Abbauprodukt Hämozoïn (vgl. Kapitel 1.1.3, Abschnitt Lebenszyklus) über magnetische Kräfte an einer MACS-Säule gebunden werden kann. Dadurch werden späte von frühen Blutstadien getrennt.

Dazu wurden die verwendeten MACS-Säulen in das Magnetfeld gebracht und zunächst mit 5ml Kulturmedium gewaschen. Währenddessen wurden die Zellen einer 20ml-Parasitenkultur für 5 Minuten bei 1800rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis auf etwa 3ml abgenommen, das Pellet wurde resuspendiert und auf die Säule gegeben. Danach wurde die Säule mit Kulturmedium gespült, bis der Durchfluss klar war. Die Säule wurde daraufhin aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein 15ml Tube gesetzt, in dem die sich nun aus der Säule lösenden späten Blutstadien aufgefangen wurden. Der zuvor aufgefangene Durchfluss wurde verworfen.

Das weitere Vorgehen bzgl. der iRBCs wird in den Kapiteln 2.2.4.1-2.2.4.3 zu den jeweiligen Schwingquarz-Messungen erläutert.

2.2.2.5 Einfrieren der Parasitenkultur

Von den verwendeten Kulturen wurden zeitweise Zellen abgezweigt und eingefroren, um Reserven an den jeweiligen Kulturen zu schaffen. Dazu musste der einzufrierende Teil der jeweiligen Kultur zunächst bei 1800rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert

werden. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet bestimmt. Zu diesem Pellet wurde 1/3 des Volumens an Einfriermedium tropfenweise zugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde nochmals das Ausgangsvolumen des Pellets an Einfriermedium tropfenweise zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen auf Cryoröhrchen verteilt und zunächst bei -80°C eingefroren. Nach einigen Tagen konnten die Zellen in den -150°C -Schrank zur endgültigen Lagerung überführt werden.

2.2.3 Schichtentwicklungen

Um die Adhäsion der iRBCs bzw. der verschiedenen PfEMP1-Domänen auf dem Schwingquarz-Sensor darstellen zu können, war es zunächst notwendig geeignete Beschichtungssysteme zu entwickeln, mit denen die Rezeptoren auf dem Sensor immobilisiert werden konnten. Dies ist in den folgenden Kapiteln dargestellt.

2.2.3.1 Reinigung der Sensoroberfläche

Die Oberfläche der Schwingquarze wurde bei einem Teil der Beschichtungssysteme vor der Immobilisierung der Rezeptoren gereinigt. Dazu wurden die Sensoren in einem ersten Schritt für 1 Minute in Aceton getaucht, was der Entfettung diente. Dies wurde anschließend mit bidestilliertem Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) gründlich abgespült und der Quarz mit Stickstoff getrocknet. Darauf folgte eine Hydrophilisierung der Sensoroberfläche durch eine einminütige Behandlung mit einer stets frisch hergestellten „Piranha“-Lösung. Diese wurde ebenfalls gründlich mit bidestilliertem Wasser abgespült und der Quarz gründlich mit Stickstoff getrocknet. Je nach Schichtsystem wurden die Sensoren entweder direkt beschichtet und dann in die bereits in 2.1.4 beschriebene Quarzhalterung eingeklebt, oder die Beschichtung erfolgte nach dem Einkleben in die Quarzhalterung. Dies wird in den entsprechenden Unterkapiteln, die die verschiedenen Schichtsysteme behandeln, erläutert.

2.2.3.2 Basisbeschichtungen der Sensoroberfläche

Damit die verschiedenen Rezeptoren auf dem Quarz immobilisiert werden konnten, mussten zunächst geeignete Basisbeschichtungen generiert werden, die es ermöglichten über bestimmte Wechselwirkungen die Rezeptoren zu binden. Diese Schichtsysteme werden im Folgenden beschrieben.

Funktionalisierung der Goldoberfläche mit Poly-L-Lysin (PLL)

Diese Beschichtung ist aufgrund des polykationischen Charakters von PLL geeignet, um negativ geladene Moleküle und auch Zellen über elektrostatische Wechselwirkungen zu

binden. Um eine optimale PLL-Schicht zu generieren, wurden zunächst wie in [110] beschrieben 20µl einer PLL-Lösung mit einer Konzentration von 0,5mg/ml in H₂O_{bidest} auf einen zuvor gereinigten und bereits geklebten Quarz pipettiert und im schwachen Stickstoffstrom kreisförmig eingetrocknet. Eine vollständige Trocknung des Quarzes wurde durch eine Inkubation für 15 Minuten bei 37°C gewährleistet. Anschließend wurde die beschichtete Quarzoberfläche sehr stark mit H₂O_{bidest} gespült um eine möglichst dünne PLL-Schicht zu erhalten. Darauf wurde der Quarz im starken Stickstoffstrom getrocknet. Da eine längere Lagerung der mit PLL funktionalisierten Quarze aufgrund der relativ starken Alterung der Schicht, die sich in einer Verminderung der elektrostatischen Wechselwirkungen äußert, zu vermeiden war, wurden diese immer sofort weiter behandelt. Eine Testung dieser Schicht wurde mithilfe des Analysegerätes FidgeType durchgeführt (s. Kapitel 2.2.3.7).

Beschichtung der Sensoroberfläche mit NeutrAvidin (NAV)

Mit NAV als Basisschicht können biotinylierte Moleküle gebunden werden, da NAV eine sehr starke Affinität für Biotin besitzt. Die Immobilisierung von NAV erfolgte dabei, ebenfalls wie bei PLL, über Physisorption, d.h. das Protein bindet unspezifisch an die zuvor gereinigte Goldoberfläche des Sensors. Dazu wurden wie in [111, 134] beschrieben 50µl einer NAV-Lösung, die mit einer Konzentration von 100µg/ml in PBS vorlag, auf den bereits geklebten Quarz pipettiert. Die Lösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Wasserdampf-atmosphäre, also in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde ungebundenes NAV mit PBS abgespült und der so beschichtete Quarz in feuchtem Zustand weiter behandelt (s. Kapitel 2.2.3.4).

Hydrophobe Funktionalisierung der Sensoroberfläche

Da die gängigen Adhäsionsassays, wie bereits in den Kapiteln 1.3 und 2.2.2.3 dargestellt, bei Verwendung aufgereinigter Rezeptoren auf Petrischalen oder 6-well-Platten aus Polystyrol (PS) durchgeführt werden, wurden in dieser Arbeit ebenfalls PS-beschichtete Quarze verwendet. Dazu wurden nach [112] 20µl einer PS-Lösung, die in einer Konzentration von 2mg/ml in Toluol vorlag, auf den gereinigten, nicht geklebten Quarz per Spin-Coating aufgeschleudert. Dazu wurde der Quarz für 2 Minuten bei 3000rpm rotiert. Nach dem Spin-Coating wurde der Quarz in die Haltevorrichtung geklebt.

2.2.3.3 CD36-Immobilisierung

Bei der Immobilisierung von CD36 auf den Sensor wurde darauf geachtet, dass das Protein in einer möglichst natürlichen Form auf den Quarz gebracht wurde. Um dies zu gewährleisten

wurden die CD36-tragenden Membranen der C32-Zellen, die über den Prozess einer fraktionellen Zentrifugation gewonnen wurden, auf dem Sensor immobilisiert. Diese Prozesse werden nun in den unteren Abschnitten erläutert.

Gewinnung der C32-Membranen

Der erste Schritt zur Gewinnung der CD36-tragenden Membranen war die Homogenisierung der Melanomzellen. Meist wurden für jeden Ansatz Zellen von 4 Kulturflaschen mit einer Bodenfläche von etwa 175cm² verwendet. Dort wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit Dulbecco-PBS++ gewaschen. Das PBS wurde anschließend durch einen Fraktionierungspuffer ersetzt, in welchem die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflaschen abgeschabt wurden. Die abgeschabten Zellen wurden in einem 50ml Tube gesammelt und bei 1200rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5ml Fraktionierungspuffer aufgenommen und resuspendiert. Daran folgte der Aufschluss der Zellen auf Eis mit einem Handhomogenisator. Dabei wurde jeweils 1ml der Zellsuspension für etwa 4 Minuten homogenisiert. Die folgenden Schritte mussten ebenfalls bei 4°C durchgeführt werden um zu verhindern, dass verschiedene freigesetzte Enzyme wie z.B. Proteasen die Proteine in der Membran zerstörten.

Die homogenisierten Zellen wurden im Anschluss bei 540xg für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, wodurch sich anschließend Zellkerne und noch intakte Zellen im Pellet befanden. Im nächsten Schritt wurde daher der Überstand bei 2500xg für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert um weitere Organellen abzutrennen. Zur Aufkonzentrierung der leichten Membranen wurde der erhaltene Überstand in einer Ultrazentrifuge für 1 Stunde bei 100.000xg und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Pellets in insgesamt 400µl Fraktionierungspuffer aufgenommen und resuspendiert. Um noch mögliche in der Lösung vorhandene Proteinase zu inaktivieren, wurden zu den Membranlösungen je 800µl Proteinase-Inhibitoren zugegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden Aliquots von je 120µl bei -20°C eingefroren.

Versuche zur weiteren Homogenisierung der Membranen

Da die Membranpellets nach der Ultrazentrifugation nicht vollständig aufgelöst werden konnten und die Membranen daher in größeren Klumpen vorlagen, wurden verschiedene Methoden ausgetestet um diese Klumpen weiter aufzulösen. Dies war notwendig um bei der Beschichtung der Sensoren mit den Membranen homogene Schichten zu erhalten, an die die infizierten Erythrozyten binden konnten. Dazu wurde ein Teil der Membranlösung mit

Ultraschall oder in einer 1:1-Verdünnung mit PBS-Tween behandelt, wobei Inkubationszeiten bis zu 20 Minuten eingehalten wurden. Bei der dritten Methode wurde ein Teil der Membranlösung 1:1 mit 0,2% Triton X-100 in PBS verdünnt und für bis zu 10 Minuten inkubiert. Mithilfe dieser Methoden sollten die Membranklumpen über mechanische Kräfte, wie sie beim Ultraschall wirkten, auseinander gerissen oder durch das Herabsetzen der Oberflächenspannung in die einzelnen Membranfragmente aufgelöst werden. Um die optimale Behandlung erfassen zu können, wurde von jeder Membranlösung alle 5 Minuten ein Teil entnommen und auf jeweils einem wie im folgenden Abschnitt beschriebenen funktionalisierten Schwingquarz immobilisiert.

Beschichtung der Sensoren mit C32-Membranen

Um die erhaltenen Membranen der C32-Zellen auf der Goldoberfläche des Sensors immobilisieren zu können, musste dieser wie in 2.2.3.2 beschrieben zunächst mit Poly-L-Lysin (PLL) funktionalisiert werden. Da es sich bei PLL um ein polykationisches Molekül handelt, war es möglich die negativ geladenen Membranen über Anionen-Kationen-Wechselwirkungen zu binden.

Auf einen frisch mit PLL beschichteten Quarz wurden dazu 60µl der weiter homogenisierten Membransuspension für 10 Minuten aufgebracht, ungebundene Membranen wurden anschließend mit PBS abgewaschen. Die Membranen wurden daraufhin mit einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) in PBS für 7 Minuten auf Eis oder im Kühlschrank fixiert um zu verhindern, dass die Proteine in und auf der Membran durch Zersetzung oder sonstige Einflüsse verändert werden. Das PFA wurde danach gut mit PBS abgespült und mögliche freie unspezifische Bindungsstellen auf dem Quarz wurden mit einer 2%-igen BSA-Lösung in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert.

Eine Überprüfung der Beschichtung mit den C32-Membranen erfolgte am Auflichtmikroskop Axioskop2Mat, da die Membranen gut zu erkennen und darzustellen waren.

2.2.3.4 CSA-Immobilisierung

Zur Immobilisierung von CSA auf dem Sensor wurden verschiedene Methoden ausgetestet, wie in den folgenden Abschnitten dargestellt wird.

Immobilisierung von biotinyliertem CSA (bCSA)

Da in der Arbeitsgruppe die Bindung biotinylierter Analyte über NAV bereits etabliert war, wurde von Frau Stefani Kleiner im Rahmen ihrer medizinischen Doktorarbeit ein entsprechendes System, welches sich an [151] anlehnte, für CSA entwickelt. Dazu musste das

zu bindende CSA zunächst mit einem Biotinylierungs-Kit biotinyliert werden. Der Prozess hierzu ist in [152] ausführlich dargestellt.

Um bCSA an NAV zu binden, wurden 50µl der bCSA-Lösung auf den noch feuchten, mit NAV beschichteten Quarz pipettiert. Dabei wurde eine bCSA-Lösung mit einer Konzentration von 100µg/ml in PBS verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde nicht gebundenes bCSA mit PBS abgespült.

Immobilisierung von CSA auf PS

Diese Methode orientierte sich an der Standardmethode bei Adhäsionsassays, bei denen aufgereinigte Rezeptoren verwendet werden. Dabei wurden auf einen PS-beschichteten Quarz 50µl einer CSA-Lösung mit einer Konzentration von 1mg/ml in PBS pipettiert und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde überschüssiges CSA mit PBS abgewaschen und der Quarz feucht bis zur Messung gelagert.

Immobilisierung von CSA über PLL

Da CSA, ebenso wie Zellen, negativ geladen ist, wurde dieses in einem dritten Beschichtungsmodell über PLL, welches auf einen ungereinigten Quarz aufgebracht wurde, auf dem Sensor gebunden. Die Beschichtung erfolgte dabei in der Messanlage wie in Kapitel 2.2.3.7 beschrieben wird.

2.2.3.5 ICAM-1-Immobilisierung

Hierbei wurde nach demselben Prinzip verfahren wie bei der Immobilisierung von CD36. Allerdings wurden hier Membranen von CHO-Zellen eingesetzt. Diese wurden nach demselben Protokoll wie in 2.2.3.3 gewonnen und mit Proteinase-Inhibitoren eingefroren. Die Bindung dieser Membranen auf die Goldoberfläche erfolgte ebenfalls über elektrostatische Wechselwirkungen mit PLL (s. Kapitel 2.2.3.3).

2.2.3.6 Immunfluoreszenztest (IFT)

Das Prinzip dieser Methode ist, dass Proteine über eine direkte oder indirekte Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern in oder auf Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop oder im FACS nachgewiesen werden können. Bei der direkten Variante ist dabei der an das Antigen bindende Antikörper bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Diese finden meist in der FACS-Analyse Verwendung. Bei der Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop werden die Antigene meist durch einen spezifischen Antikörper (Primärantikörper) gebunden, an den kein Farbstoff gekoppelt ist.

Dieser wird dann über einen weiteren, gegen den Primärantikörper gerichteten sekundären Antikörper, welcher mit einem Farbstoff assoziiert ist, markiert. Daher wird diese als Sandwich aufgebaute Variante auch als indirekter Immunfluoreszenztest bezeichnet.

Im Hinblick auf CD36 wurde mittels geeigneter Antikörper zunächst bestimmt, in welchem Umfang dieses Protein auf der Oberfläche der C32-Zellen vorkam. Des Weiteren wurde diese Methode eingesetzt um zu untersuchen, ob das Protein durch die Prozesse der Zellhomogenisierung und der anschließenden fraktionellen Zentrifugation noch detektiert werden konnte und somit noch funktionsfähig war. In Bezug auf CSA wurde über Immunfluoreszenz die Homogenität der Beschichtung überprüft, welche mit der normalen Lichtmikroskopie nicht nachvollzogen werden kann.

CD36

Für die Untersuchung der Verteilung von CD36 auf den C32-Zellen wurden bewachsene Chamber-Slides verwendet, auf denen die Zellen als Monolayer vorlagen.

Bei der Markierung des CD36 auf den intakten C32-Zellen wurden diese in den Chamber-Slides zur Entfernung des Kulturmediums mit PBS gewaschen. Die anschließende Fixierung erfolgte mit 4%PFA in PBS für 7 Minuten auf Eis oder im Kühlschrank. Dadurch wurde gewährleistet, dass der Zustand bzw. die Konformation des Proteins erhalten blieb. Über ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS für je 5 Minuten wurde die Fixierlösung restlos entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 2%-igen BSA-Lösung in PBS blockiert, wobei für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Dieses Vorgehen entspricht somit auch der Präparation der Quarzbeschichtung mit C32-Membranen.

Im Anschluss an den Blockierungsschritt wurden sowohl die Zellen in den Chamber-Slides, als auch die auf dem Quarz gebundenen Membranen mit einem spezifischen, gegen CD36 gerichteten primären Antikörper beschichtet, der in PBS 1:10 verdünnt wurde. Bei diesem Antikörper handelte es sich um einen gegen humanes CD36 gerichteten Antikörper der IgG-Klasse, der in der Maus generiert wurde. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden ungebundene Antikörper durch 3 Waschschrte à 5 Minuten mit PBS-Tween entfernt.

Darauf folgte in einer feuchten Kammer eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper, der zuvor in PBS 1:30 verdünnt wurde. Bei diesem Antikörper handelte es sich um einen aus dem Schaf gewonnenen, gegen IgG-Antikörper der Maus gerichteten Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)

gekoppelt war. Die ungebundenen Antikörper wurden wiederum durch 3 Waschschriffe à 5 Minuten mit PBS-Tween entfernt.

Bei dem CD36-Nachweis auf den C32-Zellen wurden diese im Anschluss noch mit dem DNA-Farbstoff DAPI, der 1:30.000 in PBS verdünnt wurde, überschichtet. Inkubiert wurde dabei in der feuchten Kammer für 5 Minuten. Die Zellen wurden danach erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Zuletzt wurden die Proben mit Einbettmedium (Fluoromount) eingebettet, welches über mehrere Tage im Kühlschrank aushärtete. Dieses Einbettmedium stellte einen Schutz für die Fluoreszenzfarbstoffe dar, d.h. die Proben blieben weniger schnell aus.

CSA

Bei CSA wurde ebenfalls der indirekte IFT angewandt, um aufzuklären wie homogen die jeweiligen Beschichtungen ausgefallen sind.

Dazu wurden die Quarze mit NAV/bCSA, PS/CSA bzw. mit PLL beschichtet. In letzterem Fall wurden auf den frischen PLL-beschichteten Quarz 50µl einer CSA-Lösung mit einer Konzentration von 1mg/ml in PBS pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die folgenden Schritte wurden bei allen Proben gleich durchgeführt. Ungebundenes CSA wurde zunächst gut mit PBS abgespült und es folgte eine Fixierung für 7 Minuten auf Eis oder im Kühlschrank mit einer 4%-igen PFA-Lösung. Die Fixierlösung wurde durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten mit PBS entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden ebenfalls mit einer 2%-BSA-Lösung in PBS blockiert, wobei in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nachdem das BSA abgenommen war, wurden die Quarze mit dem primären Antikörper, der in PBS 1:100 verdünnt vorlag, überschichtet. Dabei handelte es sich um einen in der Maus generierten Antikörper der IgM-Klasse, der gegen CSA gerichtet war. Die Inkubation erfolgte wiederum in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend wurden ungebundene Antikörper in 3 Waschschriffen à 5 Minuten mit PBS-Tween entfernt.

Daran schloss sich die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, bei dem es sich um einen gegen IgM-Antikörper der Maus gerichteten Antikörper aus der Ziege, der ebenfalls mit FITC gekoppelt war, handelte. Die Inkubation mit diesem 1:128 in PBS verdünnten Sekundärantikörper erfolgte wieder bei Raumtemperatur und in der feuchten Kammer. Durch 3 Waschschriffe mit PBS-Twen-20 für je 5 Minuten wurden die ungebundenen Antikörper entfernt und die Proben wurden mit Fluoromount eingebettet.

Die Auswertung bzw. das Abfotografieren der Fluoreszenz-Proben erfolgte an den Mikroskopen Axioskop2MAT und AxioImager der Firma ZEISS. Die Anregungswellenlänge für FITC betrug dabei 495nm und für DAPI 358nm. Die Aufnahmen wurden mithilfe des Programms AXIOVISION erstellt und digital abgespeichert.

2.2.3.7 QCM-Messungen zur Überprüfung der Schichten

Neben der Fluoreszenzmikroskopie stellten auch die Schwingquarze ein gutes Mittel dar um die entwickelten Beschichtungen zu testen. Dabei konnte direkt festgestellt werden, ob die zu immobilisierenden Rezeptoren, besonders CSA, banden.

Überprüfung der PLL-Schicht

Obwohl am Mikroskop einfach überprüft werden kann, ob Membranen an PLL gebunden hatten oder nicht, ist es nicht möglich eine Aussage über die Dicke der PLL-Schicht zu treffen. Ist diese zu dick, können zwar Membranen binden, die Eindringtiefe des Quarzes könnte allerdings zu gering sein, um eine Anbindung von iRBCs an die Schicht zu erkennen. Daher wurde über Ankopplungsmessungen von Blut an die mit PLL beschichteten Quarze getestet, ob die mit dem Beschichtungsprotokoll erhaltene Schicht dünn genug war.

Dazu wurden die mit PLL frisch beschichteten Quarze in die Messanlage eingebaut und mit EDTA/Tris-Puffer oder entgastem RPMI bzw. complete-Medium bei einer Pumpgeschwindigkeit von 100 μ l/min gespült. Nach Einstellung einer stabilen Basislinie wurden ebenfalls mit 100 μ l/min 50 μ l einer im entsprechenden Puffer/Medium 1:10 verdünnten Erythrozytensuspension über den Sensor geleitet.

Überprüfung der mit C32-Membranen präparierten Quarze

In diesem Fall wurde geprüft, ob die Eindringtiefe des Quarzes trotz der gebundenen Membranfragmente für die Detektion einer Bindung an CD36 ausreichte. Dabei wurde ein wie in Kapitel 2.2.3.3 beschichteter Quarz verwendet, der in die bereits mit PBS äquilibrierte Anlage eingebaut wurde. Es wurde dann mit PBS bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 μ l/min gespült, bis sich eine stabile Basislinie eingestellt hatte. Daraufhin wurde zusätzlich zu der zuvor vollzogenen Blockierung erneut eine 50 μ l-Probe einer 2%-igen BSA-Lösung über den Quarz geleitet, um mögliche verbliebene unspezifische Stellen abzublocken. War das Signal wieder stabil, wurden 50 μ l einer Antikörperlösung, die wie beim indirekten Fluoreszenztest aus einem 1:10 in PBS verdünnten anti-CD36-Antikörper bestand, in die Messkammer gepumpt. Hatte die Antikörperlösung den Sensor erreicht, wurden die Pumpen für eine Stunde abgeschaltet, was der Inkubationszeit beim IFT entsprach. Nach dieser Stunde

wurde der Fluss wieder auf 100 μ l/min gestellt um ungebundene Antikörper mit PBS aus der Messkammer zu spülen.

Bindung von CSA an PLL-beschichtete Quarze

Wie bereits in Kapitel 2.2.3.4 angedeutet wurde, erfolgte die Immobilisierung von CSA über PLL in der Messanlage. Dafür wurde ein mit PLL beschichteter Quarz in die auf 37°C erwärmte und mit entgastem RPMI-complete gespülte Anlage eingebaut. Die von den obigen Messungen abweichenden Parameter beruhen darauf, dass, wie im nachfolgenden Kapitel 2.2.4.3 erläutert wird, bei diesem Schichtsystem nach der CSA-Immobilisierung direkt eine Ankopplungsmessung mit iRBCs durchgeführt wurde.

Nach dem Einbau des Quarzes in die Messkammer wurde mit 25 μ l/min gespült. War eine stabile Basislinie erreicht, wurden 50 μ l einer CSA-Lösung (1mg/ml in PBS) injiziert. Nach einer Stabilisierung des Signals wurde zur Entfernung von ungebundenem CSA die Flussrate auf 100 μ l/min erhöht. War das Signal wieder stabil, wurde die Flussrate auf 25 μ l/min reduziert und nach der erneuten Stabilisierung des Signals wurden 50 μ l einer 2%-igen BSA-Lösung (20mg/ml) über den Quarz geleitet, um noch unspezifische freie Bindungsstellen zu blockieren. Ungebundenes BSA wurde nach der Signalstabilisierung mit 100 μ l/min ausgespült und die Flussrate wurde nach diesem Spülschritt erneut auf 25 μ l/min herabgesetzt. Die langsame Flussrate von 25 μ l/min wurde lediglich für diese Testung und Prüfung der Schicht angewandt. Wie in Kapitel 2.2.4.3 noch gezeigt wird, wurde bei Messungen mit iRBCs letztlich eine Flussrate von 50 μ l/min eingeführt.

2.2.3.8 Externe Anbindung von iRBCs an CD36 und CSA

Bevor Messungen mit iRBCs in der Messanlage *FidgeType* durchgeführt wurden, wurde zuvor extern getestet, ob diese auf die entsprechend präparierten und beschichteten Quarze (PLL/C32-Membranen, NAV/bCSA und PS/CSA) banden. Um mögliche unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden parallel dazu stets uiRBCs (Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+) verwendet. Getestet wurden dabei Parasiten der Stämme 3D7 und FCR3-CD36 (auf CD36) bzw. FCR3-CSA (auf CSA). Dazu wurden die Zellen (iRBCs und uiRBCs in Kulturmedium) auf die entsprechenden Quarze pipettiert und bei 37°C für 30 Minuten bis 2,5 Stunden inkubiert. Im Fall der CD36-Testung mit 3D7 wurden die mit iRBCs beladenen Quarze zur Entfernung ungebundener Zellen jeweils nach 30 Minuten, einer Stunde bzw. nach 2 Stunden vorsichtig mit Kulturmedium gewaschen und für etwa eine Minute mit Methanol fixiert. Im Fall der CSA-Testung und bei der CD36-Bindung durch FCR3-CD36 wurden die Quarze nach 2 Stunden gewaschen und mit Methanol fixiert. Zur Auswertung

wurden die Quarze anschließend für 20 Minuten mit Giemsa gefärbt und am Auflichtmikroskop mit einem 100x-Objektiv untersucht.

Zur Prüfung der Spezifität der Bindung an CD36 wurden von Frau Stefani Kleiner mit dieser Methode verschiedene Lösungen zur Blockierung einer unspezifischen Bindung durch PLL ausgetestet [152]. Dazu zählten das zur Selektion auf CD36 verwendete binding-Medium, das zur Selektion auf CSA verwendete Adhäsionsmedium und das in der Beschichtung mit C32-Membranen verwendete 2%-ige BSA in PBS (vgl. auch [153]). Dabei wurden die Quarze mit den entsprechenden Lösungen für je eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Weiterhin wurde von ihr extern untersucht, ob die Bindung an C32-Membranen durch den Einsatz eines 1:10 in PBS verdünnten anti-CD36-Antikörpers verhindert werden konnte.

2.2.4 Messungen zur Zytoadhäsion mit iRBCs

In den folgenden Unterkapiteln werden die verschiedenen Messabläufe erläutert, die für die Untersuchung der Zytoadhäsion angewandt wurden. Allen Messabläufen gemein waren die vorbereitenden Maßnahmen, die in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

Da die Messungen bei 37°C und über mehrere Stunden durchgeführt werden mussten, war die Wahrscheinlichkeit der Luftblasenbildung durch Ausgasen bei den verwendeten Medien (RPMI oder RPMI-complete) sehr hoch. Daher mussten diese vor jeder Messung über das Anlegen eines Vakuums unter Rühren entgast werden. Dieser Prozess dauerte je nach Einstellung der Vakuumpumpe 2-4 Stunden. Da dies nur unter unsterilen Bedingungen durchgeführt werden konnte, musste das Medium vor der Messung wieder steril filtriert werden. Dabei war darauf zu achten, dass dabei entstehende Verwirbelungen vermieden wurden, um nicht wieder Luft in das entgaste Medium einzuschleusen. Dieses Medium wurde in autoklavierte Schnappdeckelgläschen gefüllt, welche in die auf 37°C thermostatisierte Messanlage gestellt werden konnten. Dort wurde das Medium mit dem bereits in Kapitel 2.2.2.1 erwähnten Gasmisch aus 5% O₂, 5% CO₂ und 90%N₂ geflutet um eine gute Entwicklung der iRBCs zu gewährleisten.

Die Desinfektion des verwendeten fluidischen Systems der Messanlage, (bestehend aus je einem kurzen Zulauf-, Absaug- und Pumpenschlauch pro Messkammer) erfolgte mit einer 1%-igen Natriumhypochlorit-Lösung (NaOCl), welche für 10 Minuten im fluidischen System einwirkte. Diese wurde danach zunächst gut mit sterilem Wasser und daran anschließend mit dem entsprechend verwendeten Medium aus dem System gespült.

Auch die Vorbereitung der iRBCs war bei allen Messabläufen gleich. Da nur die späten Blutstadien für die Untersuchungen verwendet wurden, wurden diese über MACS

aufkonzentriert (s. Kapitel 2.2.2.4). Im Anschluss daran wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1800rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bestimmt. Mit einer geringen Menge des Pellets wurde, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, ein Blutausschlag angefertigt. Die iRBCs wurden, ebenso wie die als Kontrolle verwendeten uiRBCs (Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+), für die jeweilige Messung entsprechend verdünnt und in einer Halterung der Messanlage auf 37°C gehalten. Dort wurden sie über den gesamten Zeitraum der Messung hinweg mit dem notwendigen Gasgemisch aus 5% O₂, 5% CO₂ und 90%N₂ begast.

Nach Beendigung der jeweiligen Messungen wurden die Quarze aus der Anlage ausgebaut, zur Entfernung ungebundener Zellen vorsichtig mit Medium gewaschen und mit 4%-iger PFA-Lösung für 7 Minuten im Kühlschrank fixiert. Diese Fixierlösung wurde darauf gut mit Wasser abgespült und die Quarze wurden an Luft getrocknet. Die getrockneten Quarze wurden zunächst mit dem Auflichtmikroskop abfotografiert und anschließend für 5 Minuten mit DAPI behandelt, wodurch eine Darstellung der gebundenen iRBCs mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht wurde. Nach dieser Inkubationszeit wurde überschüssiges DAPI in 3 Waschschrritten à 5 Minuten mit PBS abgewaschen und die Quarze wurden mit Fluoromount eingebettet. Eine Analyse der Quarzbelegung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden im Schnitt jeweils 3 Ausschnitte à 22,1*10³µm² der jeweiligen Quarze abfotografiert. Die bei der Auszählung der dort vorkommenden Zellen erhaltenen Werte wurden letztlich mittels t-Test statistisch ausgewertet.

Die nach der Messung verbliebenen iRBCs wurden in ein Falcon-Tube überführt und für 5 Minuten bei 1800rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Aus dem erhaltenen Pellet wurde erneut ein Ausstrich gemacht, der ebenso wie der vor der Messung gemachte Ausstrich am Mikroskop mit einem 100x Öl-Immersionsobjektiv ausgewertet wurde.

Zuletzt wurde die Messanlage mit 1% NaOCl desinfiziert, welches wiederum für 10 Minuten im fluidischen System belassen wurde. Durch Spülen mit Wasser wurde die NaOCl-Lösung aus dem System gewaschen und die Fluidik wurde trocken laufen gelassen.

2.2.4.1 Langzeitmessung über nahezu 24 Stunden

Diese Art der Messung wurde von der Autorin mit dem Parasitenstamm FCR3-CSA angewandt. Da bei diesem System das bereits über den Quarz geleitete Probenmaterial verworfen wurde, war ein entsprechend großes Probenvolumen nötig. Daher wurde sowohl das nach der MACS-Aufreinigung erhaltene Pellet an iRBCs als auch die zur Kontrolle verwendeten uiRBCs in 10ml entgastem Medium verdünnt, wobei die Verdünnungsrate

zwischen 1:300 und 1:667 lag. Bei dem hierbei verwendeten Medium handelte es sich um RPMI, dem Gentamicin zur Vermeidung von Kontaminationen zugesetzt wurde. Über den Zeitraum der gesamten Messung, der etwa 20-24 Stunden betrug, wurden die Zellen bei 37°C gehalten und mit dem bereits oben aufgeführten Gasgemisch begast.

Zu Beginn der Messung wurden die mit NAV/bCSA bzw. PS/CSA beschichteten Quarze in die mit Medium äquilibrierte Messanlage eingebaut, und es wurde mit Medium bei einer Flussrate von 100µl/min gespült. Nach Einstellen einer stabilen Basislinie wurde der Fluss gestoppt und die Probe mit iRBCs an den Zulaufschlauch der einen Messzelle, und die Probe mit den uiRBCs als Kontrolle an den Zulaufschlauch der zweiten Messzelle angeschlossen. Anschließend wurden die Proben ebenfalls mit 100µl/min aufgezogen. Nachdem sich die Frequenz wieder stabilisierte und die Messkammer mit Probenmaterial vollständig befüllt war, wurde die Flussrate auf 4µl/min reduziert, damit sich die Zellen absetzen und Bindungen ausbilden konnten. Durch den steten Fluss über 24 Stunden wurden ungebundene Zellen aus der Messzelle und neue Zellen in die Messzelle gepumpt. Auch war dadurch die Versorgung der in der Messzelle vorhandenen Zellen mit Medium und Gas gewährleistet.

2.2.4.2 Adhäsionsassay mit höherer Zelldichte („Kurzzeitmessung“)

Zur Gewinnung deutlicherer Signale wurden die Zellen im Unterschied zur vorigen Methode für nur wenige Stunden (2-5 Stunden) vermessen, was in etwa den in den Standardmethoden angegebenen Inkubationszeiten entsprach. Auch wurden die Zellen aufgrund des geringeren Bedarfs an Probenvolumina weniger stark verdünnt, die Verdünnungsrate betrug 1:10. Mit diesem System wurden die beiden FCR3-Stämme und entsprechend als Kontrolle uiRBCs vermessen. Bei dem verwendeten Medium handelte es sich ebenfalls um mit Gentamicin versetztes RPMI. In späteren Versuchen fand jedoch auch das von Frau Dr. H. Bustos getestete RPMI-complete Anwendung.

Der Messablauf war identisch mit dem oben erläuterten Ablauf bei der Langzeitmessung, d.h. es wurde nach Einbau der beschichteten Sensoren in die Messanlage mit Medium bei einer Flussrate von 100µl/min gespült. Hatte sich der Quarz eingeschwungen, wurden die Proben mit 100µl/min injiziert und die Flussrate nach Stabilisierung der Frequenz und Beladung des Sensors mit Probenmaterial auf 4µl/min reduziert.

Zur Überprüfung der Spezifität der Bindung an CSA wurden verschiedene Schichten vermessen, wie rein mit NAV oder mit NAV und bBSA beschichtete Quarze. Beim System PS/CSA wurden unter Verwendung dieser Messabläufe reine PS-Quarze, mit PS und BSA oder mit PS und Glucose beschichtete Quarze verwendet um das Auftreten unspezifischer

Bindungen auszuschließen. Zudem wurde getestet, ob die Bindung an PS/CSA durch eine vor der Messung durchgeführte einstündige Inkubation des Quarzes mit einem 1:100 in PBS verdünnten anti-CSA-Antikörper verhindert werden könnte.

2.2.4.3 Messungen mit einem geschlossenen fluidischen System

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Messsystemen wurde ein weiteres entwickelt, bei dem die Proben in einem ständigen Kreislauf über den Sensor geleitet wurden. Dabei konnten Messungen mit höheren Fließgeschwindigkeiten und geringerem Probenvolumen durchgeführt werden. Mit diesem System wurde die Bindung an CD36 und an CSA gemessen, wobei bei Letzterem die Belegung von PLL-Quarzen mit CSA in der Messanlage (s. Kapitel 2.2.3.2) verwendet wurde. Bei dem Schichtsystem PLL/CSA betragen die Flussraten abweichend von den Vorversuchen nicht 25µl/min sondern 50µl/min und es wurde im Anschluss an die Bindung des CSA an das PLL nicht mehr mit BSA blockiert.

Bei den untersuchten iRBCs handelte es sich um die Parasitenstämme FCR3-CD36 und FCR3-CSA, als Kontrollen wurden uiRBCs bzw. im Fall von FCR3-CD36 zusätzlich iRBCs des NF54^{CD36}-Stammes verwendet. Die Zellen lagen meist in einer Verdünnung von 1:83 in 1ml entgastem RPMI-complete vor und wurden wie bei den anderen beiden Systemen bei 37°C gehalten und mit dem speziellen Gasgemisch begast.

Nach dem Einbau der extern beschichteten Quarze in die Messanlage, bzw. nach Vollzug der Beschichtung der PLL/CSA-Quarze in der Anlage, wurden diese mit entgastem RPMI-complete bei 50µl/min gespült. Hierbei war das fluidische System noch offen, d.h. der Durchfluss wurde verworfen. Nachdem sich eine stabile Basislinie eingestellt hatte, wurde der Fluss gestoppt, die Proben an jeweils einen Zulaufschlauch angeschlossen und die Flussrate wieder auf 50µl/min eingestellt. Nach 1000 Sekunden, die benötigt wurden um die gesamte Fluidik mit Probenmaterial zu befüllen, wurden die von jeder Messzelle abführenden und an das Abfallgefäß angeschlossenen Ablaufschläuche an das der jeweiligen Messzelle entsprechende Probengefäß angeschlossen. Damit war das System geschlossen und die Proben wurden wiederholt über ihren jeweiligen Sensor geleitet. Die Messzeit betrug hierbei meist 3-5 Stunden.

2.2.5 Kontrollmessungen mit Erythrozytenkonzentrat

Zusätzlich zu den bereits erläuterten verschiedenen Kontrollmessungen wurden hinsichtlich der Adhäsion an CSA weitere Messungen auf den verschiedensten Schichten mit verschiedenen Puffern/Medien (EDTA/Tris, RPMI, RPMI-complete) durchgeführt, um die Schichten hinsichtlich ihrer Spezifität weiter zu prüfen (s. Tabelle 4).

CSA		
NAV/bCSA	PS/CSA	PLL/CSA
NAV	PS	PLL/CSA
NAV/BSA	PS/BSA	PLL/CSA/BSA
NAV/bCSA	PS/CSA	
NAV/bCSA/BSA	PS/CSA/BSA	

Tabelle 4: Übersicht über die mit uiRBCs auf ihre Spezifität getesteten Schichten

Dabei wurde Erythrozytenkonzentrat verwendet, das entweder frisch aus dem Kühlschrank entnommen wurde, oder das entsprechend den iRBCs wie diese kultiviert wurde. Das bedeutet, dass letztere Zellen über mehrere Tage und Wochen in Parasiten-Kulturmedium bei 37°C unter Begasung gehalten wurden, wobei täglich das Medium gewechselt und der Kontrollkultur zeitweise frische Zellen zugegeben wurden. Dadurch wurde der Einfluss möglicher morphologischer Veränderungen der Zellen, die in der Kultur durch Alterung auftreten können, auf das Bindungsverhalten untersucht. Die Messungen wurden nach demselben Messprotokoll durchgeführt wie in 2.2.4.2. Nach den Messungen wurden die Quarze zur Entfernung ungebundener Zellen vorsichtig mit Puffer/Medium gespült und für 7 Minuten im Kühlschrank mit 4% PFA fixiert. Dies wurde gut mit Wasser abgespült, die Quarze wurden an Luft getrocknet und am Auflichtmikroskop mittels eines 100x-Objektivs abfotografiert.

2.2.6. Prüfung der Spezifität der Standardmethode bzgl. CSA

Entsprechend den CSA-Kontrollmessungen mit Schwingquarzen wurden auch mit dem etablierten Zytoadhäsionsassay Kontrollen unter Verwendung verschiedener Beschichtungen und Medien durchgeführt.

Dazu wurden 2 6-well-Platten verwendet, von denen 3 wells über Nacht mit einer CSA-Lösung (100µg/ml in PBS) im Kühlschrank inkubiert wurden. Dort wurde am nächsten Tag überschüssiges CSA in zwei Waschschrritten mit PBS entfernt. Daneben wurden ein well mit Adhäsionsmedium und 2 wells mit 2% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, 2 wells blieben ohne Beschichtung. Nach der Einwirkzeit von einer Stunde wurden das Adhäsionsmedium und das BSA abgenommen.

Die Parasiten des FCR3-CSA-Stammes wurden aus der Kultur genommen, bei 1800rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 3 Teile geteilt. Ein Teil

wurde in Adhäsionsmedium, der zweite Teil in RPMI und der dritte Teil in 2%BSA/PBS aufgenommen. Von jedem dieser Ansätze wurden Zellen in die mit CSA beschichteten wells gegeben. In das mit Adhäsionsmedium vorbehandelte well wurden Zellen in Adhäsionsmedium gegeben und die mit BSA beschichteten wells wurden ebenso wie die unbeschichteten PS-wells mit Zellen in Adhäsionsmedium und RPMI belegt. Darauf folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37°C. Danach wurden ungebundene Zellen durch vorsichtiges viermaliges Waschen mit PBS entfernt und die gebundenen Zellen für etwa 3 Stunden mit 4% PFA bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierlösung wurde anschließend gut mit Wasser ausgewaschen und die iRBCs mit Giemsa für 20 Minuten gefärbt. Nach dem Abwaschen der Färbelösung und dem Trocknen der Proben wurden diese mit einem 100x Öl-Immersionsobjektiv ausgewertet. Eine Bestimmung der Zellzahl erfolgte bei diesem System nicht. Es erfolgte lediglich eine qualitative Abschätzung durch die Autorin.

2.2.7 Adhäsionsmessungen mit PfEMP1-Domänen

Durch den Kontakt zum Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg konnten im Rahmen dieser Arbeit einzelne Domänen des PfEMP1-Proteins in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sabine Predehl vermessen werden. Dabei lag das Augenmerk auf der Bindung an CD36 und an ICAM-1. Getestet wurden dabei 15 verschiedene PfEMP1-Domänen, die im Vorfeld von Frau Dr. Sabine Predehl in *E. coli* rekombinant exprimiert wurden. Eine Übersicht über die verschiedenen Domänen findet sich in Tabelle 3.

Als Schichtsysteme wurden hierbei PLL/C32-Membranen (für CD36) und PLL/CHO-Membranen (für ICAM-1) verwendet. Der Messablauf, der für die großen und schweren Erythrozyten etabliert war, musste dabei dem Anspruch der Detektion kleiner Moleküle (11,5-30,4kDa) angepasst werden. Dazu wurden niedrige Flussraten gewählt, die es den Domänen erlauben sollten sich abzusetzen und zu binden. Auch wurden die mit den Membranen beschichteten Sensoren in der Anlage mit einer BSA-Lösung (1mg/ml in PBS) blockiert, um sicherzustellen, dass alle unspezifischen Bindungsstellen geblockt waren. Vor Beginn der Messung wurde die Messanlage ebenfalls auf 37°C thermostatisiert um ein möglichst natürliches Umfeld zu schaffen. Äquibriert wurde die Fluidik mit dem Puffer, in dem die Domänen vorlagen.

In die so vorbereitete Anlage wurden die mit den Membranen beschichteten Quarze eingebaut und es wurde mit dem Puffer bei einer Flussrate von 25µl/min gespült. Nachdem der Quarz eingeschwungen war, erfolgte der erste Blockierungsschritt, indem 50µl der BSA-Lösung über den Sensor geleitet wurden. Nach der Stabilisierung des Signals wurde ungebundenes BSA mit 100µl/min aus der Messkammer gespült und nach der erneuten Stabilisierung des

Signals wurde der Fluss wieder auf 25 μ l/min herabgesetzt. Im Anschluss erfolgte in jedem Fall noch ein zweiter und bei einzelnen Messungen noch ein dritter Blockierungsschritt mit BSA. Wenn davon ausgegangen werden konnte, dass unspezifische Stellen blockiert waren, wurden 50 μ l einer Domäne (die in einer Konzentration von 100 μ g/ml oder 1mg/ml vorlag) mit einer Flussrate von 25 μ l/min über den Sensor geleitet. Nach Stabilisierung der Frequenz wurde ungebundenes Material wieder mit 100 μ l/min aus der Messkammer gespült, gefolgt von einer erneuten Herabsetzung der Flussrate auf 25 μ l/min. Fand keine Bindung durch die verwendete Domäne statt, wurde häufig eine zweite, in manchen Fällen auch noch eine dritte Domäne über den Quarz geleitet.

2.2.8 Auswertung der QCM-Messungen

Die mittels der über die Mess-Software erhaltenen Daten wurden mit der Auswertesoftware Origin ausgewertet. Die am Mikroskop Axioskop2Mat mittels digitaler Kamera erstellten Bilder der Quarze wurden auf den PC transferiert und dort über Photoshop mit Messbalken versehen.

2.3 Verwendete Materialien. Lösungen und Geräte

2.3.1 Materialien und Lösungen

2.3.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
di-Natriumhydrogen-phosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka, Neu-Ulm/D
EDTA	Merck, Darmstadt/D
Guanidin Hydrochlorid (GuHCl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Paraformaldehyd (PFA, 95%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Phosphate buffered saline (PBS, Dulbecco A-Tablets)	Oxoid Ltd., Cambridge/UK
Rinderserumalbumin (BSA Fraktion V)	Fluka, Neu-Ulm/D
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Toluol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Trishydroxylmethylaminomethan (Tris, 99,8 %)	Merck, Darmstadt/D
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm/D
Trizma hydrochloride (Tris HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Tween	Fluka, Neu-Ulm/D
Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30%-ig)	Merck, Darmstadt/D

EDTA/Tris-Puffer: 9g NaCl (154mM)
 0,5g Tris (4mM)
 1g EDTA (3,4mM)

Chemikalien in 1l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen, dann Zugabe von 0,1ml Tween. Durch Rühren gut mischen und den pH-Wert auf 7,9 einstellen.

PBS-Puffer: 10 Tabletten in 1l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen.

PBS-Tween-Puffer: 500µl Tween (0,1%) in
500ml PBS-Puffer lösen, gut mischen.

2.3.1.2 Zellkultur und fraktionelle Zentrifugation

Bezeichnung	Hersteller
C32	ATCC/USA
CHO	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg/D
3D7	Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen/D
FCR3	Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen/D
NF54 ^{CD36-}	Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen/D
Albumax II-Pulver	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
Blasticidin S-Hydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt/D
Chondroitin-4-Sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
DMEM (1X)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Erythrozytenkonzentrat (0+)	Blutbank des IKET, Universitätsklinikum Tübingen/D
Foetal Bovine Serum (FBS)	„GOLD“, EU approved PAA Laboratories GmbH, Cölbe/D
Gentamicin (50mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
Giemsa	Merck, Darmstadt/D
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
HEPES (1M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
HEPES-Buffer (1M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Humanserum (AB+)	Blutbank des IKET, Universitätsklinikum Tübingen/D
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D

Kaliumdihydrogen-phosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka, Neu-Ulm/D
L-Glutamin (200µM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe/D
MEM-NEAA-Solution (100X)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
RPMI 1640-Lösung (ohne NaHCO ₃ , mit L-Glutamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
RPMI 1640-Lösung (mit NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
RPMI-Pulver (mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D

Kulturmedium C32-Zellen: 500ml DMEM
 50ml/10ml FBS (10%/2%)/
 5ml NEAA (1%)
 5ml L-Glutamin (200µM)
 500µl Gentamicin

Einfriermedium C32-Zellen: 15ml DMEM
 30ml FBS
 5ml DMSO

Mit H₂O_{bidest} auf 1l auffüllen und den pH-Wert auf 8,0 einstellen.

AlbumaxII (10X): 5,20g RPMI-Pulver
 500µl Gentamicin
 2,98g HEPES
 1,67g NaHCO₃
 1,00g Glucose
 0,10g Hypoxanthin
 25g Albumax II-Pulver

Die Chemikalien in 500ml H₂O_{bidest} unter Rühren für mehrere Stunden lösen, bis keine Pulverrückstände mehr zu erkennen sind. Dann den pH-Wert zwischen 7,0 und 7,4 einstellen. Die Lösung unter der Sterilbank steril filtrieren und 50ml-Aliquots einfrieren.

Kulturmedium *P. falciparum*: 500ml RPMI 1640 (ohne Glutamin, mit NaHCO₃)
500µl Gentamicin
5ml L- Glutamin (200µM)
12ml HEPES-Buffer
50ml AlbumaxII 10X (1X)
25ml Humanserum (5%)

BSD-Stocklösung: 10mg BSD in
1ml sterilem Wasser aufnehmen.

Aliquots der Lösung einfrieren.

BSD-Medium: 500ml RPMI 1640 (ohne Glutamin, mit NaHCO₃)
500µl Gentamicin
5ml L- Glutamin (200µM)
12ml HEPES-Buffer
50ml AlbumaxII 10X (1X)
25ml Humanserum (5%)
250µl BSD-Stocklösung (5µg/ml)

Einfriermedium *P. falciparum*: 0,325g NaCl mit
1,5g Sorbitol in 30ml H₂O_{bidest} lösen, dann
14ml Glycerol dazugeben und mit H₂O_{dest} auf 50ml
auffüllen

Die fertige Lösung unter der Sterilbank steril filtrieren und im Kühlschrank aufbewahren.

Phosphatpuffer für Giemsa (10X): 4,1g KH₂PO₄ und
6,5g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

Mit H₂O_{dest} auf 1l auffüllen und den pH-Wert auf 7,1 einstellen. Für den Ansatz einer Giemsa-Lösung wurde stets 1X Puffer verwendet, weshalb dieser 10x-Puffer immer 1:10 mit H₂O_{dest} verdünnt wurde.

Giemsa-Färbelösung: 5ml Giemsa mit
45ml 1X Phosphatpuffer verdünnen und filtrieren

binding-Medium: 500ml RPMI 1640 (mit Glutamin, ohne NaHCO₃)
 12ml HEPES-Buffer
 50ml Humanserum (10%)

Den pH-Wert auf 6,8 einstellen und das Medium unter der Sterilbank steril filtrieren.

Adhäsionsmedium: Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum

2.3.1.3 Quarze und Beschichtungen

Bezeichnung	Hersteller
AT-cut Quarze	KVG, Neckarbischofsheim/D
BupH MES-Buffered saline packs	Pierce Biotechnology, Rockford/USA
Dulbecco-PBS++	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
EDC	Pierce Biotechnology, Rockford/USA
EZ-Link Biotin-LC-Hydrazide	Pierce Biotechnology, Rockford/USA
NeutrAvidin (NAV)	Pierce Biotechnology, Rockford/USA
Poly-L-Lysin (70-150kDa)	Fluka, Neu-Ulm/D
Polystyrol (PS, ~192kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Proteinase-Inhibitoren (Complete Mini)	Roche,

Fraktionierungspuffer: 7,88g Tris/HCl (50mM)
 8,766g NaCl (150mM)
 0,37224g EDTA (1mM)

Piranha-Reinigungslösung: 5ml H₂O₂ vorlegen,
 15ml H₂SO₄ zugeben; gut mischen

2.3.1.4 Fluoreszenzmikroskopie

Bezeichnung	Hersteller
4',6-Diamidino-2-phenyindolilactate (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Dako Fluorescent Mounting Medium (Fluoromount)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg/D
Goat anti-mouse-IgM (FITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Monoklonaler anti-CD36-Antikörper (aus	Abcam, Cambridge/UK

Maus, IgG)	
Monoklonaler anti-CSA-Antikörper (aus Maus, IgM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Sheep anti-mouse-IgG (FITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D

2.3.1.5 QCM-Messungen

Bezeichnung	Hersteller
Biotinylated Bovine Serum Albumin (bBSA)	Pierce Biotechnology, Rockford/USA
Immersionsöl	Carl Zeiss AG, Jena/D
Natriumhypochlorit (4%, NaOCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
RPMI 1640-Lösung (ohne NaHCO ₃ , mit L-Glutamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D

AlbumaxII-NaHCO₃ (10X):

- 5,20g RPMI-Pulver
- 500µl Gentamicin
- 2,98g HEPES
- 1,00g Glucose
- 0,10g Hypoxanthin
- 25g Albumax II-Pulver

Die Chemikalien in 500ml H₂O_{bidest} unter Rühren für mehrere Stunden lösen, bis keine Pulverrückstände mehr zu erkennen sind. Dann den pH-Wert zwischen 7,0 und 7,4 einstellen. Die Lösung unter der Sterilbank steril filtrieren und 50ml-Aliquots einfrieren.

RPMI-complete:

- 500ml RPMI 1640 (mit Glutamin, ohne NaHCO₃)
- 500µl Gentamicin
- 5ml L- Glutamin (200µM)
- 12ml HEPES-Buffer
- 50ml AlbumaxII-NaHCO₃ 10X (1X)

Puffer PfEMP1-Domänen:

- 1,24g Tris (10mM)
- 2,92g NaCl (50mM)
- 4,78g GuHCl (50mM)
- 250µl Tween (0,05%)

Die Chemikalien in 1l H₂O_{bidest} unter Rühren lösen und den pH-Wert auf 5,9 einstellen.

2.3.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Auflichtmikroskop Axioskop 2 MAT	Carl Zeiss AG, Jena/D
Brutschrank HeraCell 150	Heraeus Instruments, Hanau/D
CO ₂ -Inkubator MCO-18AIC	Sanyo E&E Europe BV, Etten Leur/NL
Digitalkamera Casio QV 5700 für Mikroskop Axioskop 2MAT	Casio Europe GmbH, Hamburg/D
Inkubator Incucell	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Gräfelfing/D
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach/D
Mikroskop AxioImager	Carl Zeiss AG, Jena/D
Mikroskop Leica DM1000	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar/D
QCM-Messanlage FidgeType FgT1	Konstruktion und Herstellung: Dr. F. K. Gehring, IKET Tübingen/D
SpinCoater Spin 150-v3-NPP	SPS Europe, Ingolstadt/D
Sterilbank HERA-safe	Heraeus Instruments, Hanau/D
Ultraschallreiniger	Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf/D
Ultrazentrifuge, Servall Discovery 90SE	Kendro Laboratory Products, Langenselbold/D
Zellhomogenisator	Sartorius AG Göttingen/D
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus Instruments, Hanau/D
Zentrifuge ROTINA 46R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D

3. Ergebnisse

3.1 Immobilisierung von CD36

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Adhäsion von iRBCs an CD36 mittels Schwingquarzen zu untersuchen. Damit dies möglich war, musste der Rezeptor auf die Oberfläche der Sensoren aufgebracht werden. Dazu wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.3.3 ausführlich beschrieben, Membranen von CD36-exprimierenden amelanotischen Melanomzellen (C32) verwendet. Die Verteilung des Proteins auf diesen Zellen wurde dabei mittels IFT geprüft. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte durch hin und her fokussieren festgestellt werden, ob das Protein in der Membran oder angereichert im Zytoplasma der Zellen vorlag. Da die Fluoreszenz für CD36 außerhalb des Fokus des Zellkerns lag, der mit DAPI gefärbt war, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein ausschließlich in der Membran lokalisiert war. Auch konnte gezeigt werden, dass CD36 großflächig und homogen über die gesamte Membran der Zellen verteilt war, wie aus Abbildung 25b und c zu entnehmen ist. Bei der Kontrollprobe wurde kein Primärantikörper zugegeben, um mögliche unspezifische Signale durch den FITC-gelabelten Sekundärantikörper auszuschließen.

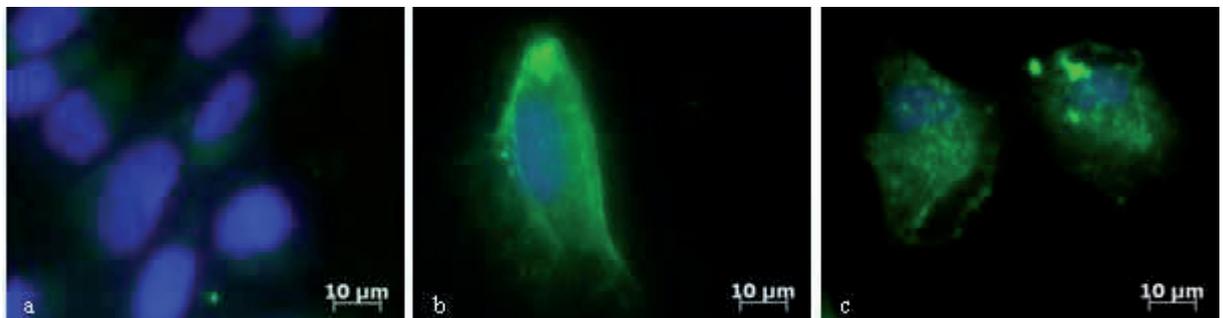


Abbildung 25: Fluoreszenzaufnahmen von C32-Zellen ohne (a) und mit gegen CD36-gerichtetem Primärantikörper (b, c). Das Protein (grün) ist homogen in der Membran der Zellen verteilt. Der mit DAPI gefärbte Zellkern (blau) liegt etwas außerhalb der Fokusebene. Vergrößerung: 500x.

Die Membranen dieser C32-Zellen wurden über PLL an die Goldoberfläche gebunden. Da diese nach dem Prozess der fraktionellen Zentrifugation in recht großen Klumpen vorlagen (s. Tafel 1a), wurde über die Einwirkung von Ultraschall bzw. von verschiedenen Detergenzien (0,2% Triton X-100 und PBS-Tween) versucht, diese aufzulösen, um eine homogene Schicht auf dem Sensor zu erhalten. Dabei wurden auch verschiedene Inkubationszeiten ausgetestet. Eine Prüfung der Funktionsfähigkeit von CD36 nach der fraktionellen Zentrifugation und der

weiteren Homogenisierung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind ebenfalls in Tafel 1 dargestellt.

Hierbei zeigte sich bei der Behandlung mit Ultraschall, dass die Membranklumpen bereits nach einer Einwirkzeit von 5-10 Minuten (Tafel 1b und c) deutlich homogenisiert vorlagen und dass CD36 über ein deutliches Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte, welches bei einer 20-minütigen Behandlung mit Ultraschall (Tafel 1e) bedeutend schwächer ausfiel. Ebenfalls konnten nach 20 Minuten Ultraschall nur noch sehr wenige Membranen auf dem Sensor gebunden werden. Ähnliches wurde bei der Behandlung mit Triton X-100 beobachtet, wo nach einer 5-minütigen Inkubation keine weitere Homogenisierung festzustellen war (Tafel 1f) und nach 10-minütiger Inkubation lediglich vereinzelte Membranfragmente gebunden auf dem Sensor vorlagen (Tafel 1g). Aus diesem Grund wurde in diesem Fall kein IFT bzgl. der CD36-Funktion durchgeführt. Eine gute Homogenisierung konnte bereits bei einer 5-minütigen Behandlung der Membransuspension mit PBS-Tween erreicht werden (Tafel 1h), längere Inkubationen zeigten keinen verstärkenden Effekt (Tafel 1i-k). Daher wurde nur mit der Probe, die für 5 Minuten mit PBS-Tween inkubiert wurde, ein IFT zur Detektion von CD36 durchgeführt, wobei ein deutliches Signal erhalten werden konnte.

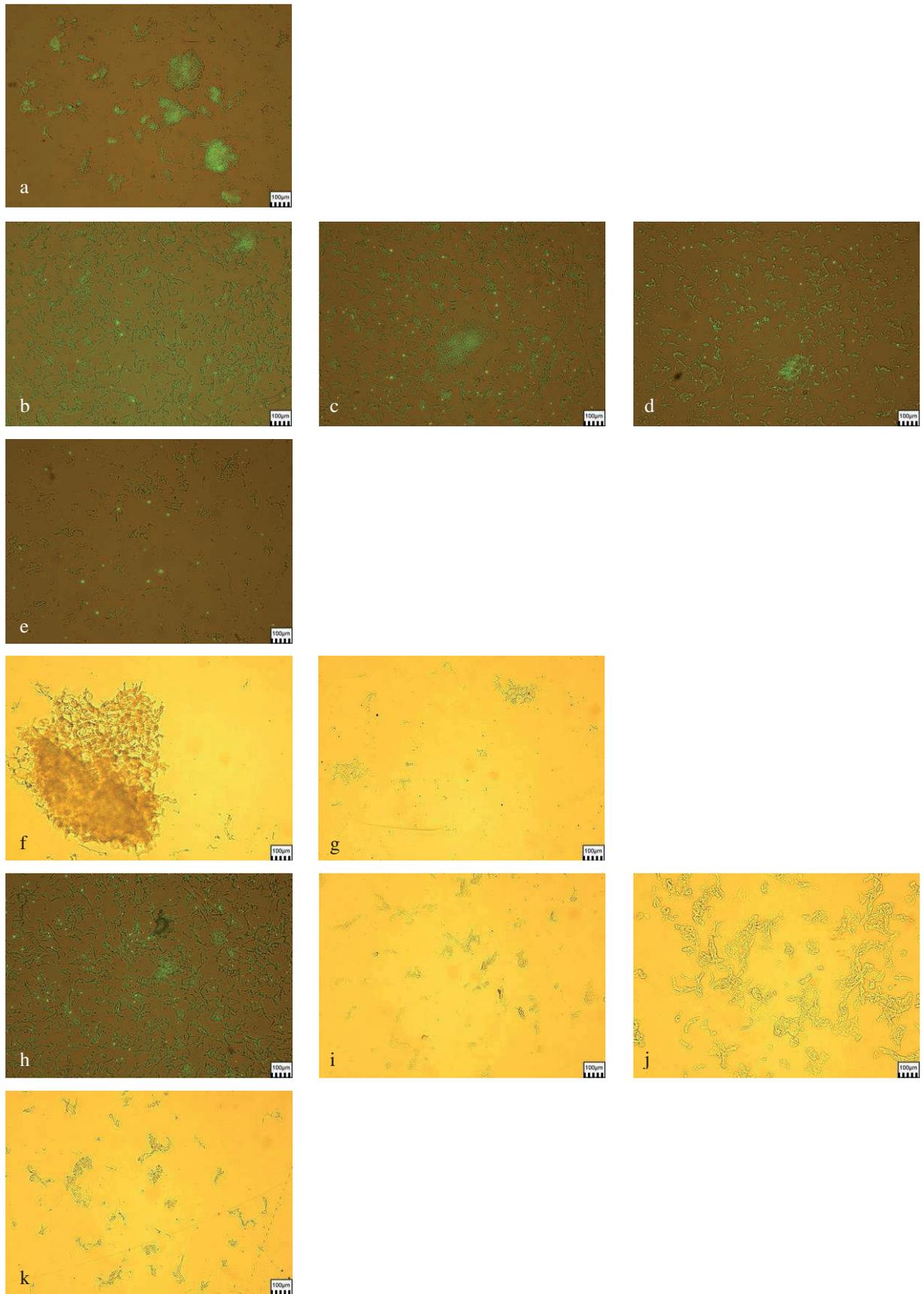
Tafel 1

a: Kontrolle, d.h. die Membranen dieser Probe wurden vor der Immobilisierung auf den Quarz nicht weiter homogenisiert und liegen in größeren Klumpen vor. Bei der Aufnahme handelt es sich um eine Auflichtaufnahme des Quarzes mit der korrespondierenden Fluoreszenzaufnahme des mit FITC markierten Rezeptors CD36.

b-e: Mit entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen überlagerte Auflichtaufnahmen von C32-Membranen, die für 5 (**b**), 10 (**c**), 15 (**d**) bzw. 20 Minuten (**e**) mit Ultraschall behandelt wurden. Nach 5-10 Minuten wurde eine gute Homogenisierung erreicht, und CD36 war noch nachweisbar. Nach 20 Minuten lagen nur wenige Fragmente gebunden vor, ein Nachweis von CD36 war nicht mehr möglich.

f-g: Auflichtaufnahmen von C32-Membranen, die zur weiteren Homogenisierung für 5 (**f**) bzw. 10 Minuten (**g**) mit 0,2% Triton X-100 behandelt wurden. Nach 5 Minuten war keine Auflösung der Membranklumpen festzustellen, nach 10 Minuten konnten lediglich vereinzelte Fragmente gebunden werden.

h-k: Auflichtaufnahmen (**i-k**) bzw. mit der korrespondierenden Fluoreszenzaufnahme überlagerte Auflichtaufnahme (**h**) von PBS-Tween-behandelten C32-Membranen. Bereits nach 5 Minuten (**h**) waren nur noch sehr kleine bis keine Membranklumpen mehr vorhanden, auf denen das CD36 noch gut nachgewiesen werden konnte. Längere Inkubationen von 10 (**i**), 15 (**j**) bzw. 20 Minuten (**k**) zeigten keine weitere Homogenisierung.



Tafel 1: Mikroskopaufnahmen von auf PLL-beschichteten Quarzen immobilisierten C32-Membranen, die zur weiteren Homogenisierung nach der fraktionellen Zentrifugation mit Ultraschall (**b-e**), Triton X-100 (**f-g**) oder PBS-Tween-20 (**h-k**) behandelt wurden. Vergrößerung: 100x.

3.1.2 Überprüfung der PLL-Schicht mittels QCM-Messungen

Zusätzlich zum IFT wurde, wie in Kapitel 2.2.3.7 beschrieben, zunächst mittels QCM-Messungen geprüft, ob die auf den Quarz aufbrachte PLL-Schicht dünn genug war, um eine Anbindung von Zellen zu erkennen. Dazu wurden einige Messungen mit verschiedenen Puffern/Medien durchgeführt, um zusätzlich zu testen, ob diese Lösungen einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von PLL haben. Abbildung 26a zeigt exemplarisch einen dabei erhaltenen Kurvenverlauf. Dieser zeichnete sich durch einen deutlichen Frequenzabfall aus, der häufig mehrere tausend Hertz (Hz) betrug. Hervorgerufen wurde dieser Frequenzabfall durch die an das PLL gebundenen uiRBCs, die beinahe die gesamte Oberfläche des Schwingquarzes belegten (Abbildung 26b).

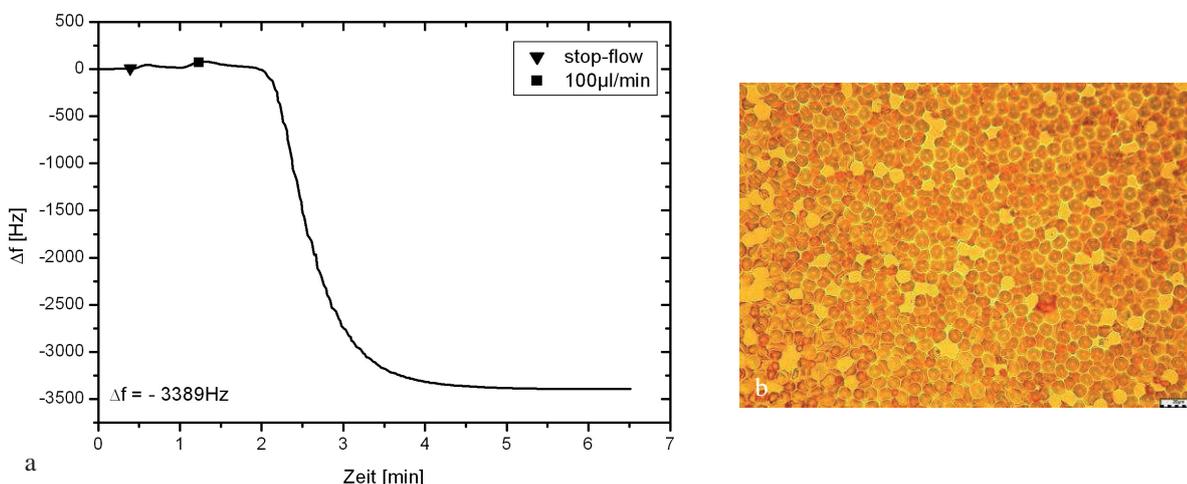


Abbildung 26: QCM-Messung zur Bindung von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz (a). Das starke Bindungssignal von über 3000Hz korrelierte sehr gut mit der korrespondierenden Auflichtaufnahme des Quarzes (b). Diese zeigt eine dichte Belegung der Sensoroberfläche mit Zellen. Vergrößerung: 500x.

In Abbildung 27 sind die mit den verschiedenen Puffern/Medien erhaltenen Frequenzänderungen nebeneinandergestellt, wobei sich zeigte, dass bei Verwendung von RPMI die besten Bindungssignale erhalten werden konnten, welche im Schnitt etwa -2500Hz betragen. Mit EDTA-Tris konnten vergleichbare Messwerte erhalten werden, die durchschnittlich bei etwa -2000Hz lagen. RPMI-complete hingegen verminderte die Bindungssignale auf durchschnittlich etwa -500Hz. Bei der Belegung der Quarze nach den Messungen konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden, sie waren meist vergleichbar mit dem in Abbildung 26b gezeigten Quarz. Daher war eine Bindung von Zellen mit RPMI-complete ebenfalls möglich, es wurde lediglich die Sensitivität des Quarzes herabgesetzt, wie in Kapitel 4 noch ausführlich diskutiert wird.

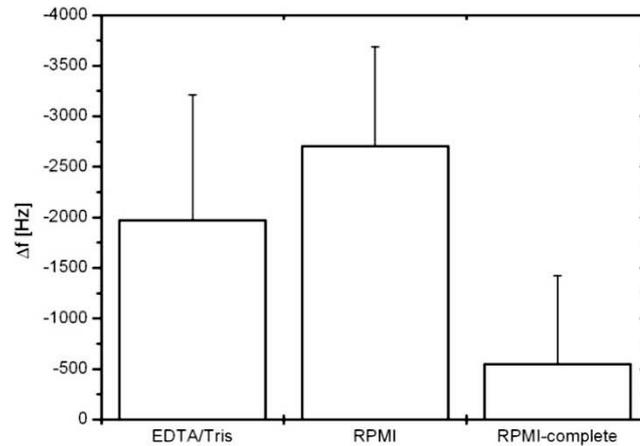


Abbildung 27: Vergleich der bei Verwendung verschiedener Puffer resultierenden Frequenzabfälle nach der Bindung von Erythrozyten auf PLL-Quarze.

Bevor Messungen mit iRBCs durchgeführt wurden, musste im Vorfeld mittels einer QCM-Messung (Abbildung 28) geprüft werden, ob über die immobilisierten Membranen Bindungen detektiert werden konnten. Wie bereits in Kapitel 2.2.3.7 erwähnt wurde, wäre es möglich, dass die aufgetragenen Membranen hinsichtlich der Eindringtiefe des Quarzes bereits eine zu dicke Schicht darstellen. Daher wurde ein anti-CD36-Antikörper über den mit C32-Membranen beschichteten Sensor geleitet. Zusätzlich zu dem für die Beschichtung vorgesehenen Blockierungsschritt mit 2% BSA für eine Stunde wurde der Quarz erneut in der Messanlage mit 2% BSA blockiert, um noch mögliche freie Stellen zu blockieren. Dies resultierte in einem geringen Frequenzabfall von etwa 11 Hz. Anschließend wurde der gegen das CD36 gerichtete Antikörper über den Quarz geleitet. Bei Beginn der Anbindung des gegen das CD36 gerichteten Antikörpers wurde der Fluss abgeschaltet und der Antikörper für eine Stunde in der Messkammer belassen. Nach dem folgenden Spülschritt, bei dem ungebundene Antikörper aus der Messzelle gespült wurden, konnte ein Frequenzabfall, verursacht durch die Bindung des Antikörpers, von etwa 8 Hz festgestellt werden, d.h. mit dieser Schicht konnten Bindungen detektiert werden. Die in der Messkurve auftauchenden kurzzeitigen Frequenzerhöhungen wurden durch vorübergehendes Ab- und wieder Einschalten der Pumpen verursacht, welches nötig war, um den Zulaufschlauch vom Puffer zum jeweiligen Probengefäß umzustecken. Dadurch wurde verhindert, dass Luft in das System gepumpt wurde, was zu einer Luftblasenbildung über dem Sensor und damit zu starken Störungen des Signals geführt hätte. Der Frequenzanstieg beim Abschalten der Pumpen (stop-flow) wurde wie bei den kurzen Anstiegen dadurch verursacht, dass durch den fehlenden Fluss kein Druck mehr auf den Sensor einwirkte. Umgekehrt kam es beim erneuten

Einschalten des Flusses auf 100 μ l/min durch den erhöhten Druck zu einem kurzen Ausschlag des Frequenzsignals.

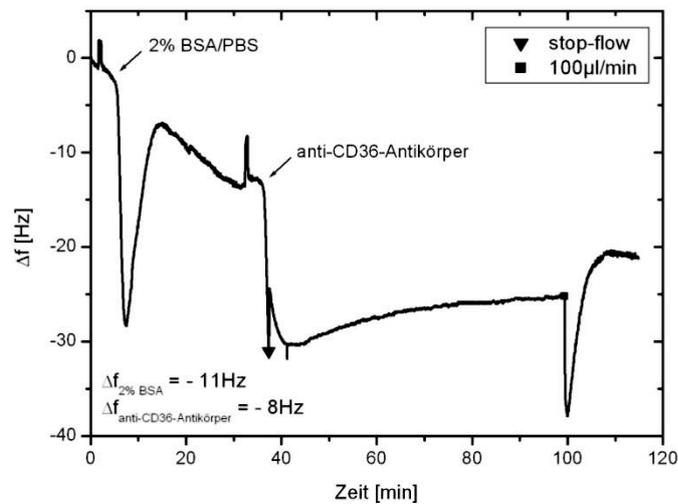


Abbildung 28: Messkurve zur Prüfung der CD36-Schicht. Nach einem in der Messanlage durchgeführten Blockierungsschritt mit 2% BSA/PBS, der zu einem geringen Frequenzabfall führte, konnte die Bindung eines spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörpers nachgewiesen werden

3.2 Immobilisierung von CSA

3.2.1 Immobilisierung von biotinyliertem CSA (bCSA) über NeutrAvidin (NAV)

Wie in Kapitel 2.2.3.4 erläutert, wurden für die Anbindung von CSA verschiedene Beschichtungsmethoden getestet. So wurde zum Einen die biotinylierte Variante über NAV gebunden. Die Belegung des Quarzes mit bCSA wurde dabei von Frau Stefani Kleiner zunächst mittels einer QCM-Messung überprüft [152].

Die Homogenität dieser Beschichtung wurde von der Autorin zusätzlich über Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Dabei zeigte sich, dass das gebundene bCSA gleichmäßig über die Quarzoberfläche verteilt war, wie in Abbildung 29b zu erkennen ist. Bei der Kontrolle wurde die Inkubation mit dem primären Antikörper nicht durchgeführt um mögliche unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers aufzudecken. Es konnten jedoch keine unspezifischen Signale durch diesen FITC-markierten Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 29a).

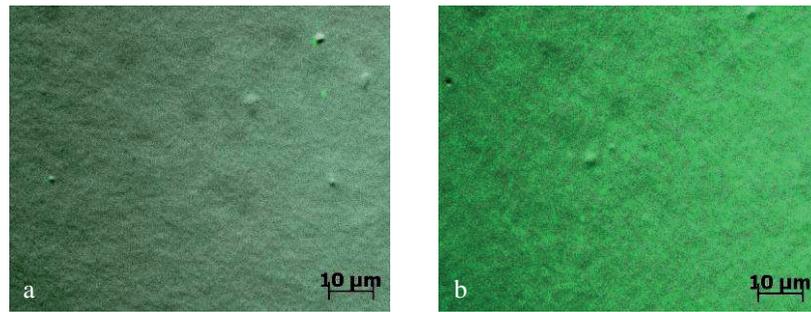


Abbildung 29: Überlagerte auflicht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NAV/bCSA-beschichteten Quarzen; **a:** Kontrolle ohne primären Antikörper, **b:** mit anti-CSA-Antikörper behandelt. Das bCSA leuchtet durch die FITC-Markierung grün auf. Vergrößerung: 500x.

3.2.2 Immobilisierung von CSA auf Polystyrol (PS)

Bei der zweiten Beschichtungsmethode mit CSA auf Polystyrol, die sich an den Standardmethoden zur Untersuchung der Zytoadhäsion orientierte, wurde die Beschichtung allein über den IFT überprüft. Wie aus Abbildung 30 zu entnehmen ist, zeigte sich bei dieser Methode eine ungleichmäßigere Verteilung des CSA auf dem mit PS beschichteten Sensor. Auffällig war hier das Auftreten von stäbchenförmigen CSA-Clustern auf der Oberfläche, die sehr deutliche und starke Fluoreszenzsignale lieferten. Daher wurde hier eine rauere Schicht generiert als mit NAV/bCSA. Das auf PS physisorbierte CSA konnte in diesem Fall ebenfalls unter Verwendung des entsprechenden spezifischen anti-CSA-Antikörpers über den mit FITC markierten sekundären Antikörper nachgewiesen werden.

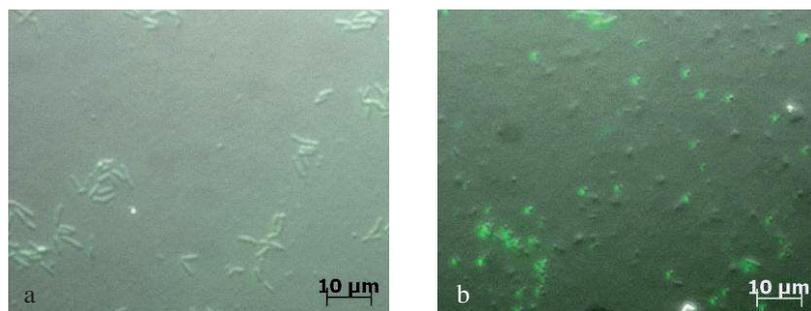


Abbildung 30: Mit den korrespondierenden Fluoreszenzaufnahmen überlagerte auflichtmikroskopische Aufnahmen von PS/CSA-beschichteten Quarzen; **a:** Kontrolle (ohne primären Antikörper), **b:** mit anti-CSA-Antikörper, wobei das gebundene CSA grün markiert ist. Vergrößerung: 500x.

3.2.3 Immobilisierung von CSA über Poly-L-Lysin (PLL)

Als drittes Beschichtungssystem wurde eine auf elektrostatischen Wechselwirkungen basierte Immobilisierung von CSA (1mg/ml in PBS) auf PLL etabliert. Dabei wurde mittels einer QCM-Messung, beschrieben in Kapitel 2.2.3.7, zunächst überprüft, ob CSA stabil über PLL

gebunden wird. Eine solche Messung ist exemplarisch in Abbildung 31 dargestellt. Dabei führte die Ankopplung von CSA an den mit PLL beschichteten Quarz zu einem deutlichen Frequenzabfall, der nach einem Spülschritt mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 60 Hz betrug.

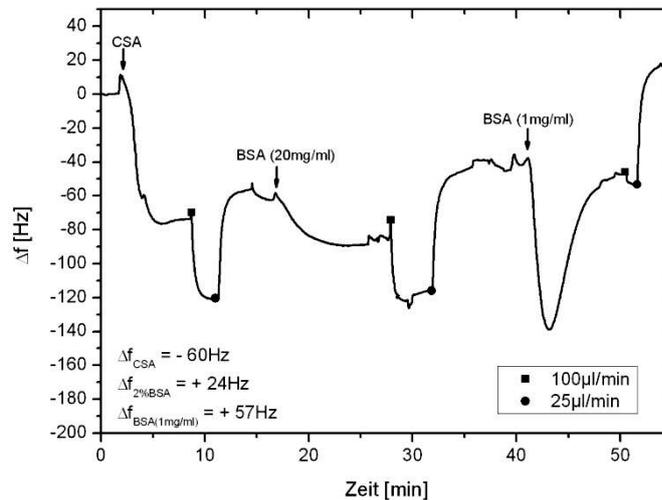


Abbildung 31: Messkurve zur Überprüfung der Bindung von CSA an einen PLL-beschichteten Schwingquarz. Die Bindung von CSA (1 mg/ml) resultierte in einem deutlichen Abfall der Frequenz. Nachfolgende Schritte zur Blockierung möglicher freier Stellen mit BSA zeigten keine weitere Proteinanlagerung.

Anschließend wurde untersucht, ob nach der Bindung von CSA noch freie Stellen auf dem Sensor vorhanden waren. Dazu wurden hintereinander zwei BSA-Lösungen (20 mg/ml = 2% ig bzw. 1 mg/ml in PBS) über den Quarz geleitet. In beiden Fällen fand keine Anbindung statt, welches sich durch das Ausbleiben eines Frequenzabfalls äußerte. Auch hier hatten die Veränderungen der Flussraten auf 100 bzw. 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, bzw. die kurzen Pumpenstopps einen Einfluss auf das Sensorsignal, was sich entsprechend in einem Frequenzabfall bzw. -anstieg darstellte.

Wie bei den vorigen Beschichtungsmethoden wurde auch in diesem Fall die Homogenität der Schicht über Immunfluoreszenz überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 32 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass bei dem Kontrollquarz (Abbildung 32a) keine unspezifischen Signale durch den FITC-gelabelten Sekundärantikörper zustande kamen. In Abbildung 32b ist deutlich zu erkennen, dass das über PLL gebundene CSA sehr homogen über die Sensoroberfläche verteilt vorlag, was sich in einem deutlichen und gleichmäßigen Fluoreszenzsignal äußerte. Die Verteilung des Rezeptors entsprach in etwa der des bCSA (vgl. Abbildung 29b) und war somit dichter als jene mit CSA, welches über PS immobilisiert wurde (vgl. Abbildung 30b)

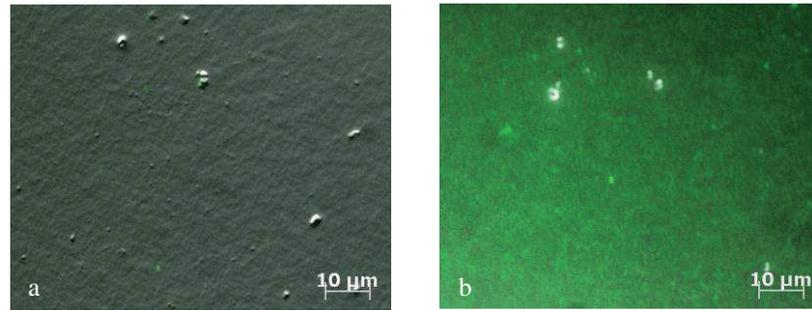


Abbildung 32: Mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen überlagerte Auflichtaufnahmen von PLL/CSA-beschichteten Quarzen; **a:** Kontrolle (ohne primären Antikörper), **b:** mit anti-CSA-Antikörper, wobei das gebundene CSA durch das FITC grün aufleuchtet. Vergrößerung: 500x.

3.3 Externe Anbindung von iRBCs an CD36/CSA

Wie in Kapitel 2.2.3.8 bereits ausführlich beschrieben wurde, wurde zunächst außerhalb der Anlage überprüft, ob an die entwickelten Schichten iRBCs gebunden werden konnten. Im Falle der CD36-Bindung wurden dabei Parasiten der Stämme 3D7 und FCR3-CD36, sowie Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ als Kontrolle verwendet. Wie aus Tafel 2a und e entnommen werden kann, banden uiRBCs nicht oder kaum an die Quarze. Die vorkommenden Zellen lagen etwas außerhalb des Fokus der C32-Membranen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass diese auf den selbigen auflagern. Bei den Proben mit iRBCs konnten jedoch sowohl bei 3D7 als auch bei FCR3-CD36 gebundene Zellen nachgewiesen werden. Bei der Probe mit 3D7 zeigte sich kein erheblicher Unterschied zwischen den unterschiedlichen Inkubationszeiten (Tafel 2b-d), nach 30 Minuten (Tafel 2b) waren etwa gleich viele Zellen gebunden wie nach 2 Stunden (Tafel 2d). Auffällig waren bei dieser Probe längliche Gebilde, die an der Kontaktzone zur Membran bzw. zu anderen iRBCs auftraten (Tafel 2b & d). Bei FCR3-CD36 (Tafel 2f) wurden entsprechende Strukturen nicht beobachtet.

Bei dem von Frau Stefani Kleiner [152] durchgeführten Versuch zur Verhinderung der Bindung von FCR3-CD36 an die Membranen über einen gegen CD36-gerichteten Antikörper konnten keine gebundenen iRBCs auf der Sensoroberfläche nachgewiesen werden (s. Tafel 2g).

Des Weiteren wurden von Frau Stefani Kleiner Kontrollversuche zur Blockierung der PLL-Schicht mit verschiedenen Lösungen durchgeführt, die zum besseren Verständnis der weiteren Vorgehensweise aufgeführt werden. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung von Adhäsionsmedium eine Bindung von Zellen vollständig unterband (s. Tafel 2i). Bei Verwendung der anderen Lösungen (binding-Medium und 2% BSA/PBS) wurde die Bindung ebenfalls fast vollständig unterbunden (Tafel 2g und j). Es konnten lediglich vereinzelte

Zellen nachgewiesen werden. Verglichen mit einem unblockierten PLL-Quarz (s. Abbildung 26b) zeigten alle Lösungen eine zufriedenstellende Blockierung der Schicht.

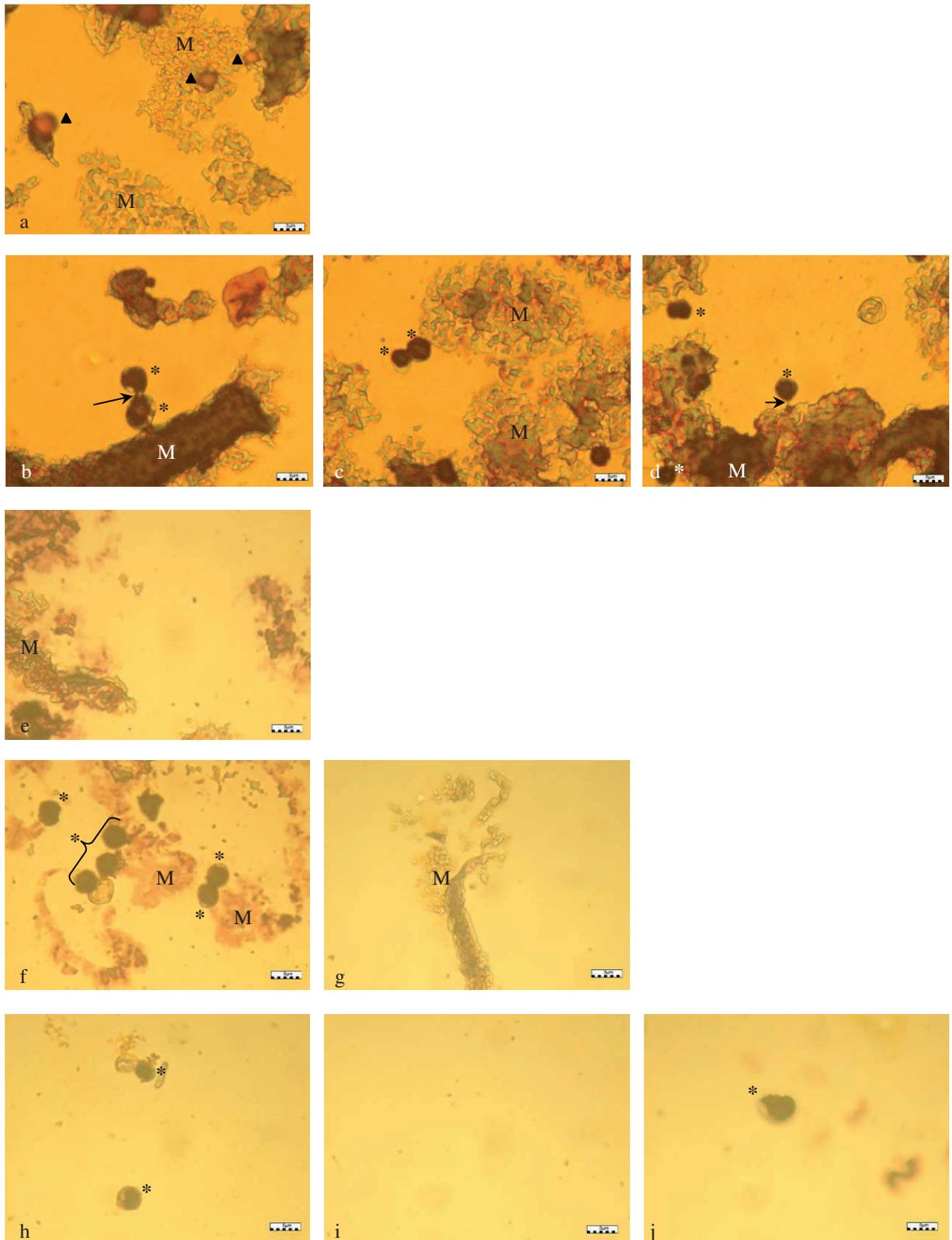
Tafel 2

a-d: Versuch zur externen Ankopplung von 3D7-infizierten Erythrozyten (**b-d**; Sterne) im Vergleich zur Kontrolle mit uiRBCs (**a**; Dreiecke); Auflichtaufnahmen. Bei der Kontrolle (**a**) wurde der beschichtete Quarz für 2h mit uiRBCs inkubiert. Dort lagen vereinzelte Zellen auf den C32-Membranen (M) vor. Die Proben mit iRBCs wurden 30 Minuten (**b**), 1h (**c**) bzw. 2h (**d**) inkubiert. Deutlich zu erkennen ist, dass die Zellen direkt an die Membranen gebunden vorlagen, wobei längliche Gebilde (Pfeile) ausgebildet wurden. Die Zellkerne der Parasiten wurden durch die Giemsa-Färbelösung deutlich dunkel gefärbt. In den membranfreien Arealen adhärten keine iRBCs.

e-f: Auflichtaufnahmen eines entsprechenden Versuchs unter Verwendung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten. Bei der Kontrolle mit uiRBCs (**e**) waren keine Zellen auf dem Quarz lokalisiert. Auf dem Quarz mit iRBCs (**f**) ist gut zu erkennen, dass die Zellen immer an den Membranen gebunden vorlagen und nicht im freien Raum.

g: Kontrollversuch zur Unterbindung der Adhäsion von FCR3-CD36 an die Membranen unter Verwendung eines anti-CD36-Antikörpers; Auflichtaufnahme. Bei dieser Probe hafteten keine Zellen an den Membranen oder an den freien Räumen an.

h-j: Auflichtaufnahmen von mit binding-Medium (**h**), Adhäsionsmedium (**i**) bzw. 2% BSA/PBS (**j**) blockierten PLL-Quarzen. Diese wurden nach der Blockierung mit iRBCs (FCR3-CD36) inkubiert. Das Adhäsionsmedium zeigte eine vollständige Unterbindung der Anheftung von Zellen (**i**), mit binding-Medium und 2% BSA/PBS lagen noch wenige vereinzelte iRBCs auf der Quarzoberfläche vor.



Tafel 2: Auflichtmikroskopische Aufnahmen von Quarzen, die mit PLL/C32-Membranen (a-g) bzw. mit PLL (h-j) beschichtet und außerhalb der Anlage mit uiRBCs (a; e; Dreiecke) bzw. mit iRBCs (b-d; f-j; Sterne) inkubiert wurden. Vergrößerung: 1000x.

In Bezug auf die Adhäsion mit FCR3-CSA-infizierten Erythrozyten wurden entsprechende Tests auf NAV/bCSA- (Abbildung 33a und b) bzw. PS/CSA-beschichteten (Abbildung 33c und d) Quarzen durchgeführt. Die Zellen (iRBCs bzw. uiRBCs) wurden für zwei Stunden inkubiert. Bei beiden Versuchen hafteten viele uiRBCs auf der Oberfläche an (Abbildung 33a und c). Die Zahl gebundener iRBCs (Abbildung 33b und d) war dabei vergleichsweise gering. Die Morphologie der Zellen war in allen Proben nicht optimal, es lagen meist nur noch Ghosts (Membranen) vor.

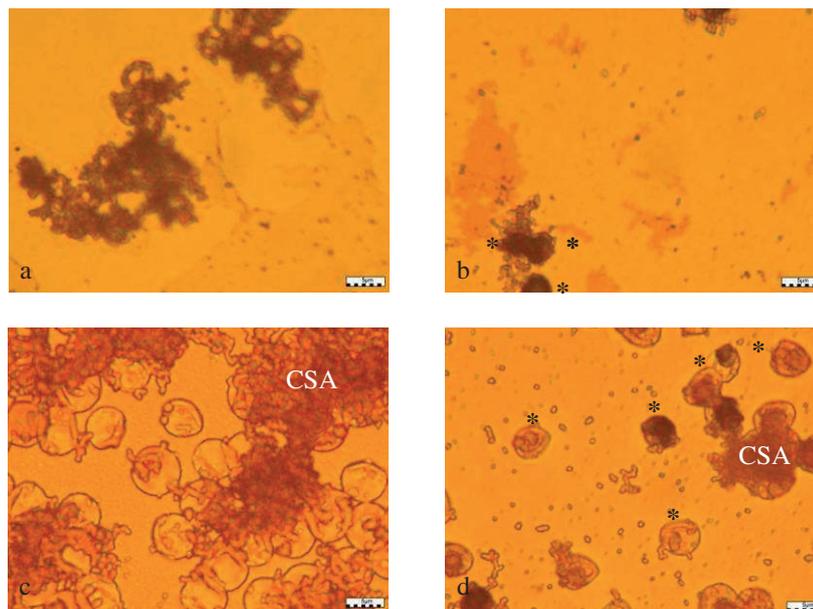


Abbildung 33: Versuche zur externen Immobilisierung von FCR3-CSA-infizierten Erythrozyten (**b, d**; Sterne) im Vergleich mit uiRBCs (**a, c**) auf NAV/bCSA (**a-b**) bzw. PS/CSA (**c-d**). Vergrößerung: 1000x.

3.4 Nachweis der Zytoadhäsion von 3D7 und FCR3-CD36 an CD36

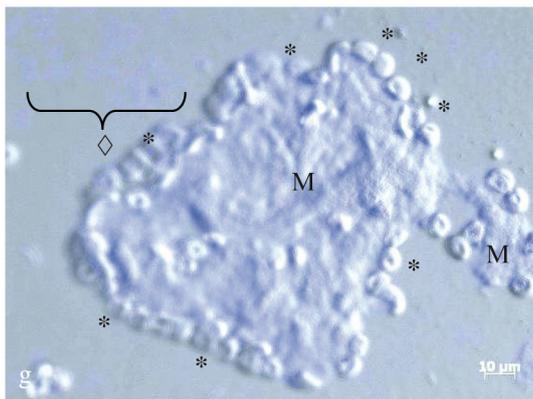
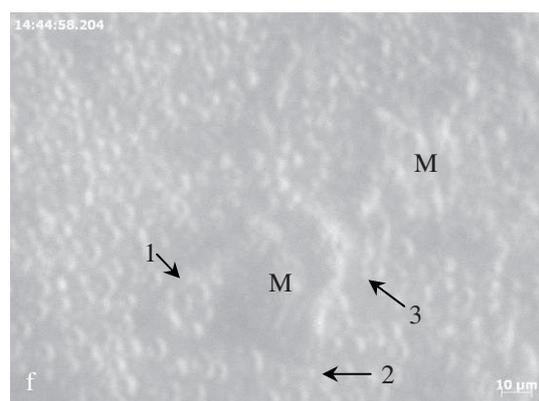
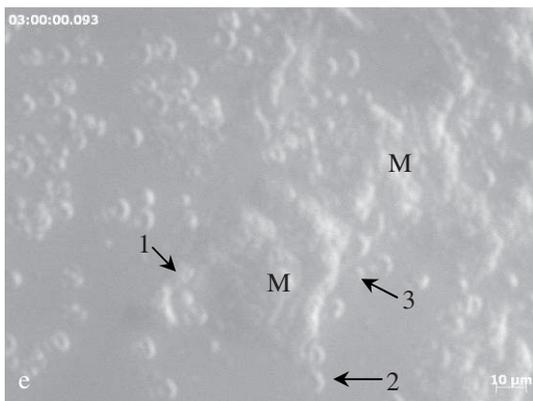
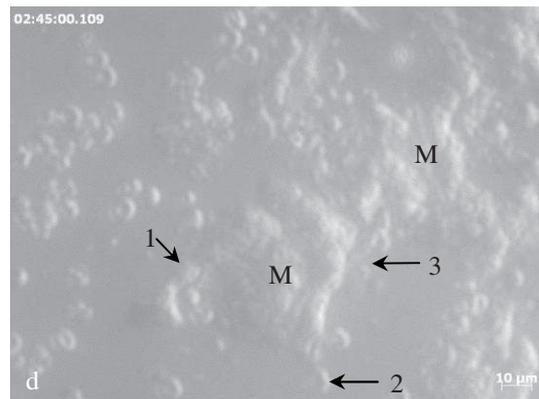
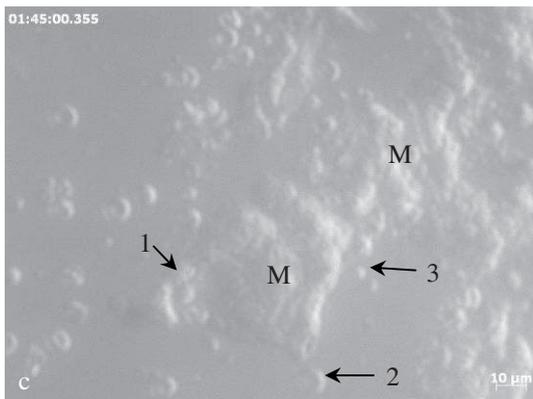
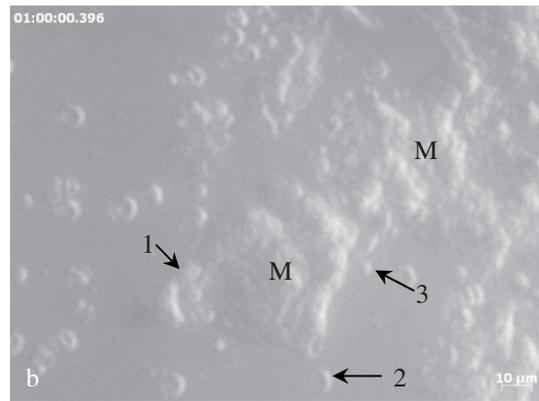
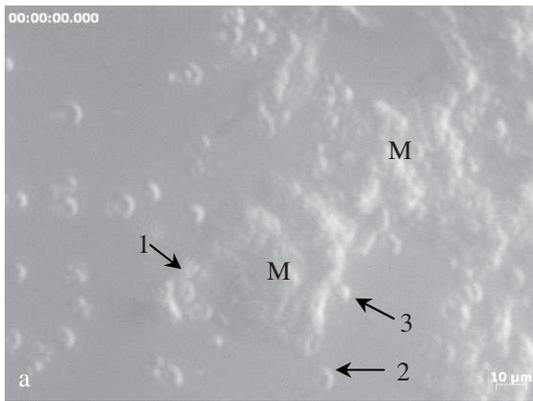
Zur Untersuchung der Zytoadhäsion infizierter Zellen an den Hauptrezeptor CD36 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Messsysteme entwickelt. Dabei handelte es sich um ein Langzeitsystem über annähernd 24 Stunden, welches von Frau Stefani Kleiner im Rahmen ihrer Dissertation angewandt wurde [152], und um ein System, bei dem höhere Zelldichten vorlagen. Die Messzeit wurde dabei zudem auf wenige Stunden verringert, weswegen dieses System als „Kurzzeitmessung“ bezeichnet wurde. Auch waren die hierbei eingehaltenen Flussraten sehr gering, was den Bedingungen der Standardassays entspricht, da dort zumeist keine Flüssigkeitsbewegungen stattfinden. Das letzte System war durch höhere Flussraten gekennzeichnet, was den Bedingungen *in vivo* näherkam. Die mit diesen Systemen erhaltenen Ergebnisse werden nun nachfolgend dargestellt.

3.4.1 Ergebnisse der Langzeitmessungen über Nacht

Die entsprechenden QCM-Messungen wurden von Frau Stefani Kleiner durchgeführt, die Ergebnisse sind in [152] dargestellt. Es sei erwähnt, dass mit diesem System Bindungen an die C32-Membranen detektiert werden konnten.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Ablauf einer Adhäsion von iRBCs an C32-Membranen in enger Zusammenarbeit mit Frau Kleiner mittels mikroskopischer Aufnahmen deutlicher veranschaulicht. Dabei wurde unter Verwendung eines in der Arbeitsgruppe entwickelten mikrofluidischen Elements ein der Langzeitmessung entsprechender Messablauf konzipiert. Dieses Element wurde unter dem Mikroskop angebracht, was eine direkte Beobachtung des Bindevorgangs an einer ausgesuchten Stelle auf dem Sensor ermöglichte. Durch entsprechende Time-Lapse-Aufnahmen wurde im Abstand von 15 Minuten eine Bilderfolge der stattfindenden Adhäsion aufgenommen. Die Messung erfolgte über Nacht und dauerte insgesamt 15 Stunden. Die Flussrate in diesem Versuch wurde dabei von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ nach Befüllung der Messkammer mit Zellen auf 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ reduziert. Ausschnitte aus der gesamten Bilderfolge sind in Tafel 3a-f dargestellt, wobei zur Auswertung drei definierte iRBCs ausgewählt wurden, die in den Aufnahmen entsprechend markiert wurden (1-3). Dabei zeigte sich, dass die iRBCs 1 und 2 bereits früh ihre Position an der C32-Membran fanden und über den gesamten Zeitraum von 15 Stunden dort verblieben und nicht weggespült wurden. Diese Zellen adhärten somit fest an der Membran. Der iRBC 3 zeigte zunächst ein initiales Rollen entlang der Membran (Tafel 3a-b) bevor er nach etwa zwei Stunden an einer Stelle adhärte. Eine anschließende Färbung des Quarzes mit DAPI (Tafel 3g) veranschaulichte zusätzlich die Lokalisierung der vitalen iRBCs an den Membranen. Dabei wurde deutlich, dass es sich bei den in der Bilderfolge vorhandenen iRBCs in den Zwischenräumen zwischen den Membranen um ungebundene Zellen handelte, die über den externen Waschschrift vor der Fixierung und DAPI-Färbung abgewaschen wurden.

Da der sensorische Aufbau zur Detektion des Schwingquarzverhaltens nicht an das mikrofluidische Modul angebracht werden konnte, sind zu diesem Versuch keine Messkurven vorhanden.



Tafel 3: Auflichtmikroskopische Zeitreihe zur Zytoadhäsion von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten an einen PLL/C32-Membranenbeschichteten Quarz (**a-f**). Aufnahmen zu Beginn des Versuchs (**a**), nach einer Stunde (**b**), nach 1:45 (**c**), 2:45 (**d**), 3 (**e**) bzw. nach 14:45 Stunden (**f**). Der Fokus lag dabei auf drei iRBCs (1-3), deren jeweilige Positionen an der C32-Membran (M) über die Zeit festgehalten wurden.

Aufnahme **g** zeigt eine korrespondierende Fluoreszenzaufnahme (überlagert mit der entsprechenden Auflichtaufnahme) mit den am Rand der Membran lokalisierten iRBCs (Sterne) und einigen freigesetzten Merozoiten (Raute); Kernfärbung mit DAPI. Vergrößerung: 500x.

3.4.2 Ergebnisse des verkürzten Adhäsionsassays

Wie bereits in Kapitel 2.2.4.2 ausführlich beschrieben, wurde von der Autorin der vorliegenden Arbeit ein Adhäsionsassay an CD36 mit höherer Zelldichte (Kurzzeitmessung) durchgeführt. Bei diesem Ablauf entsprechen die Messzeiten in etwa den Inkubationszeiten der in der Malaria-Forschung eingesetzten Standardmethoden zur Selektion. Auch wurden die Zellen weniger stark verdünnt. Bei diesem Messversuch wurde der Parasitenstamm FCR3-CD36 zusammen mit uiRBCs als adäquate Kontrolle vermessen. Abbildung 34a zeigt exemplarisch eine dabei resultierte Messkurve, aus der eindeutig entnommen werden kann, dass die infizierten Zellen an die C32-Membranen auf dem Quarz banden.

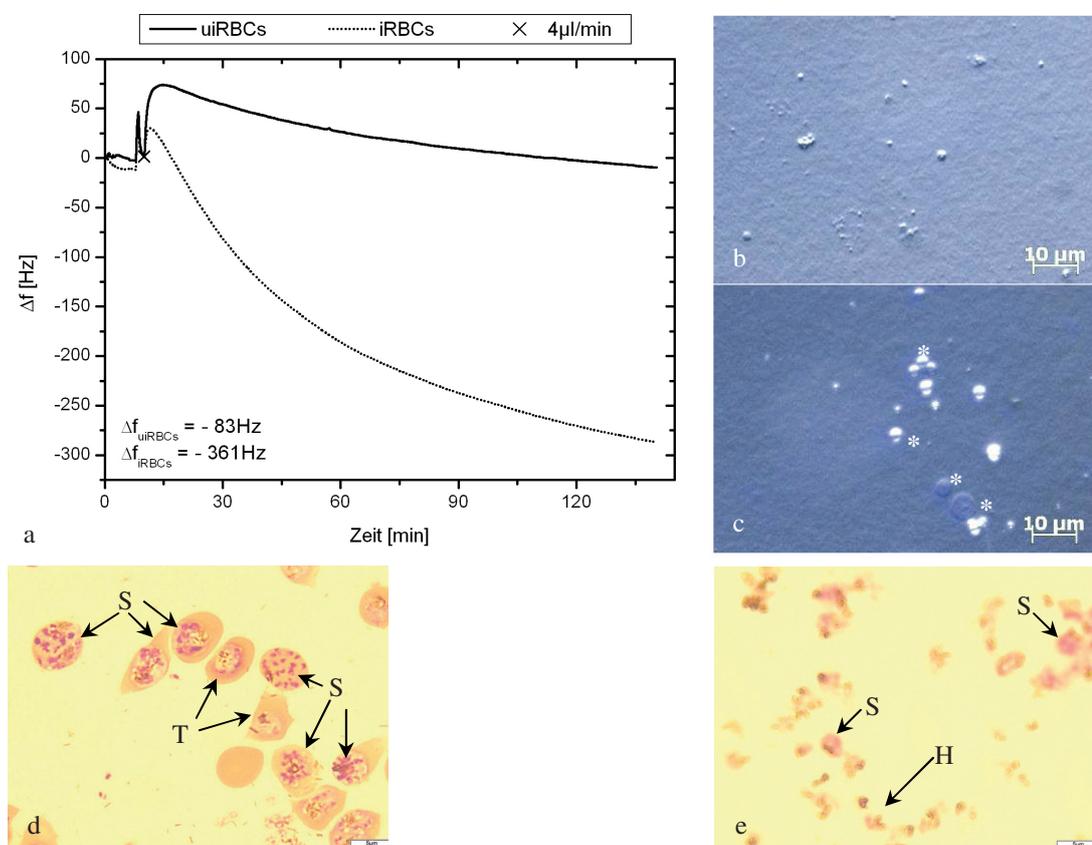


Abbildung 34: Messung zur Detektion der Bindung von iRBCs (FCR3-CD36) an CD36 mit gleichzeitig vermessenen uiRBCs als Kontrolle; kürzerer Messablauf. Die mittels Schwingquarzen erhaltenen Messkurven (a) zeigten eine deutliche Bindung der iRBCs an den Sensor; b, c: korrespondierende Mikroskopaufnahmen (Auflicht- überlagert mit den entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen), wobei b den Quarz der Kontrolle und c den mit iRBCs belegten Quarz darstellt. Dort sind die iRBCs (Sterne) mit DAPI blau gefärbt. Die Aufnahmen d und e zeigen Blutausstriche der Probe mit iRBCs, die vor (d) bzw. nach der Messung (e) gemacht wurden; S: Schizont, T: Trophozoit, H: Hämozoin. Vergrößerung: 500x (b, c) bzw. 1000x (d, e).

Das mit diesen Zellen erhaltene Signal setzte sich aufgrund des vierfach höheren Frequenzabfalls deutlich von dem der Kontrolle ab. Der in der Kurve auftretende kurze

Ausschlag der Frequenz zu Beginn der Messung war wiederum auf ein kurzes Ab- und Anschalten der Pumpen beim Wechsel zwischen Puffer- und Probengefäß zurückzuführen. Auch führte die Verminderung der Flussrate von 100 auf 4 μ l/min zu einem kurzen Anstieg der Frequenz.

Ein der Messkurve entsprechendes Ergebnis konnte bei Betrachtung der nach der Messung fixierten und mit DAPI gefärbten Quarze erhalten werden. Hierbei zeigte sich, dass bei der Kontrolle keine Zellen auf dem Sensor gebunden vorlagen (Abbildung 34b). Bei der Probe mit iRBCs konnten hingegen eindeutig infizierte Zellen über die blau leuchtenden Zellkerne der Parasiten auf der Quarzoberfläche lokalisiert werden, wobei hier mit 9 Zellen/Ausschnitt wenige Zellen vorhanden waren (Abbildung 34c). Dies korrelierte jedoch wieder mit den Ausstrichen, die vor bzw. nach der Messung angefertigt wurden (Abbildung 34d und e). Dabei war zu erkennen, dass zu Beginn der Messung die Parasiten hauptsächlich als Schizonten und nur zu einem geringen Teil als Trophozoiten vorlagen. Am Ende der Messung waren nur noch sehr wenige intakte Zellen, dafür jedoch große Mengen an freiem Hämozoin vorhanden, da aus den Schizonten bereits Merozoiten freigesetzt wurden. Das bedeutet somit, dass auf dem Sensor bereits Merozoiten während der exemplarisch dargestellten Messung freigesetzt wurden, oder dass die sehr reifen Schizonten während des Fixierungsprozesses auf dem Quarz aufplatzten. Über alle Messungen hinweg ergab sich im Schnitt eine Zelldichte von 19 Zellen pro Ausschnitt, was, umgerechnet auf die gesamte Quarzfläche eine Gesamtbelegung von etwa 48.700 iRBCs ergeben würde.

3.4.3 Ergebnisse der Messungen mit geschlossener Fluidik

Im dritten Messsystem konnten durch die Verwendung eines geschlossenen fluidischen Kreislaufs höhere Flussraten eingesetzt werden (s. auch Kapitel 2.2.4.3). Als Proben fungierten uiRBCs und Erythrozyten, die mit Parasiten der Stämme FCR3-CD36 und NF54^{CD36-} infiziert waren. Dabei diente NF54^{CD36-} als zusätzliche Kontrolle, da dort das für die Bindung an CD36 verantwortliche PfEMP1 nicht exprimiert wurde. a zeigt eine kombinierte Darstellung eines charakteristischen Messverlaufs bei uiRBCs (Kurve ohne Symbol) und von zwei Messungen, bei denen die Frequenzabfälle bei FCR3-CD36 (Kurven mit offenen Symbolen) und NF54^{CD36-} (Kurven mit geschlossenen Symbolen) parallel aufgezeichnet wurden. Dabei stellen die Kurven mit quadratischen Symbolen eine Messung mit erst kurz in der Kultur gehaltenen NF54^{CD36-}-Parasiten dar (Messung 1). Die Kurven mit dreieckigen Symbolen wurden wenige Wochen später erhalten (Messung 2). Dabei ist zu erkennen, dass mit infizierten Zellen ein stärkerer Frequenzabfall als mit uiRBCs erhalten wurde.

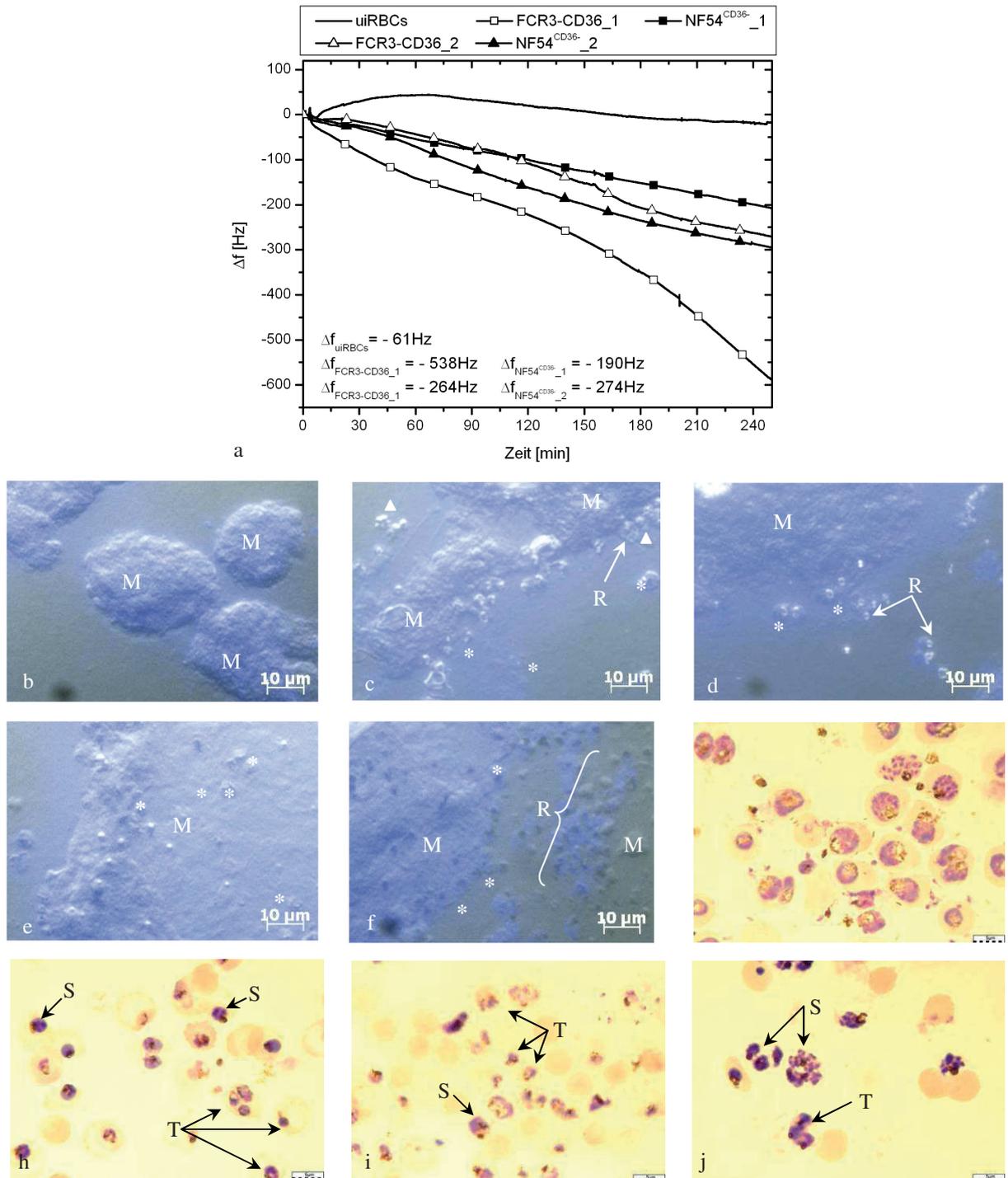


Abbildung 35: Messungen zur Zytoadhäsion an CD36 mit einem geschlossenen fluidischen System. **a** zeigt Messkurven aus 3 Messungen; die Signale von uiRBCs, mit FCR3-CD36 (offene Symbole) bzw. NF54^{CD36}- (geschlossene Symbole) infizierten Erythrozyten sind gegenübergestellt. Die Kurven mit quadratischen Symbolen stellen eine Messung mit frisch in Kultur genommenen, die mit Dreiecken versehenen Kurven eine Messung mit länger in Kultur gehaltenen NF54^{CD36}-Parasiten dar. **b-f**: mit Fluoreszenzaufnahmen überlagerte Auflichtaufnahmen der jeweiligen Quarze (**b**: uiRBCs; **c, d**: FCR3-CD36 bzw. NF54^{CD36}- der früheren; **e, f**: FCR3-CD36 bzw. NF54^{CD36}- der späteren Messung). Die Kerne der iRBCs (Sterne) leuchteten durch DAPI blau auf (M: Membran; R: Rosette/Autoaggregat; Dreiecke: uiRBCs). **g-j** zeigen exemplarisch die Entwicklung der Parasiten über die Messung hinweg (**g, i**: vor der Messung; **h, j**: nach der Messung); **g, h**: FCR3-CD36; **i, j**: NF54^{CD36}- (T: Trophozoit, S: Schizont, M: Merozoit). Vergrößerung: 500x (**b-f**) bzw. 1000x (**g-j**).

Die iRBCs des NF54^{CD36}-Stammes führten ebenfalls zu einem stärkeren Frequenzabfall als die uiRBCs, dieser fiel bei der ersten Messung dennoch geringer aus als bei FCR3-CD36. Bei der Messung, die mit länger kultivierten NF54^{CD36}-Parasiten durchgeführt wurde, zeigte sich allerdings, dass diese etwas stärker an den Sensor banden als der auf die CD36-Bindung selektierte FCR3-CD36-Stamm (vgl. auch Abbildung 36).

Das bei der Untersuchung der Quarze unter dem Mikroskop erhaltene Ergebnis korrelierte sehr gut mit den entsprechenden QCM-Messungen. Dabei zeigte sich zunächst, dass auf dem Quarz, mit welchem uiRBCs vermessen wurden, keinerlei Zellen auf der Oberfläche nachzuweisen waren (b). Ebenso entsprach die Zellverteilung beim Vergleich der mit FCR3-CD36 bzw. NF54^{CD36} belegten Sensoren den Messkurven. Waren bei den ersten Messungen mehr FCR3-CD36- als NF54^{CD36}-infizierte Zellen auf dem Quarz lokalisiert (im Schnitt 35 bzw. 8 Zellen pro Ausschnitt; c und d), so kehrte sich dies bei späteren Messungen um (26 bzw. 33 Zellen pro Ausschnitt; e und f). Zudem konnten auch auf diesen Quarzen, unabhängig vom Parasitenstamm, Rosetten bzw. Autoaggregate von iRBCs mit uiRBCs oder weiteren iRBCs nachgewiesen werden. Bei den auftretenden uiRBCs handelte es sich um Zellen, die bei der Aufreinigungsprozedur der iRBCs mittels MACS nicht entfernt werden konnten. Aus den Blutaussstrichen (g-j) ist zu entnehmen, dass sich die Parasiten gut entwickelt hatten. Des Weiteren traten die für *P. falciparum* charakteristischen Mehrfachbefälle von Erythrozyten auf.

Zur Übersicht ist in Abbildung 36a ein Vergleich der mit den verschiedenen Parasitenstämmen erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf die mittels Schwingquarzen gewonnenen Signale dargestellt. Die Daten zu dem Parasitenstamm 3D7 wurden von Frau Stefani Kleiner gewonnen [152]. Aus diesem Vergleich kann entnommen werden, dass bei den Kontrollen mit uiRBCs auch Frequenzabfälle zustande kamen. Diese waren allerdings im Vergleich zu den Messungen mit iRBCs signifikant geringer ausgeprägt (3D7: $p = 0,00$ bei $n = 20$ bzw. 10; FCR3-CD36: $p = 0,00$ bei $n = 20$ bzw. 16). Bei den verschiedenen Parasitenstämmen konnte gezeigt werden, dass der auf CD36-Bindung selektierte FCR3-CD36-Stamm stärkere Signale lieferte als der 3D7-Stamm, welcher nicht auf diese Bindung selektiert wurde. Der Unterschied dabei war jedoch nicht signifikant ($p = 0,13$ bei $n = 16$ bzw. 10; t-Test). Entgegen der Annahme, dass bei dem NF54^{CD36}-Stamm die Fähigkeit zur Bindung an CD36 ausgeschaltet wurde, konnten bei diesem Stamm Frequenzabfälle beobachtet werden, die nach einer Analyse mittels t-Test signifikant stärker waren als bei Verwendung von uiRBCs ($p = 0,00$ bei $n = 20$ bzw. 10). Auch wurden hierbei die Signale des

3D7-Stammes übertroffen. Der Unterschied zwischen diesen Stämmen war allerdings nicht signifikant ($p = 0,23$ bei $n = 10$). Diesen mittels Schwingquarz-Messungen erhaltenen Ergebnissen entsprechen auch die jeweiligen Analysen der Quarzbelegung (Abbildung 36b), die bei den uiRBCs und den beiden Parasitenstämmen FCR3-CD36 und NF54^{CD36-} durchgeführt wurden. So ist die Anzahl adhärerter Zellen bei den Parasitenstämmen FCR3-CD36 und NF54^{CD36-} signifikant höher als bei den uiRBCs ($p = 2,6E^{-4}$ bzw. $p = 0,01$ bei $n = 15, 19$ bzw. 30). Der Unterschied zwischen den Parasitenstämmen ist jedoch, wie bei den QCM-Messungen, nicht signifikant ($p = 0,13$ bei $n = 19$ bzw. 30).

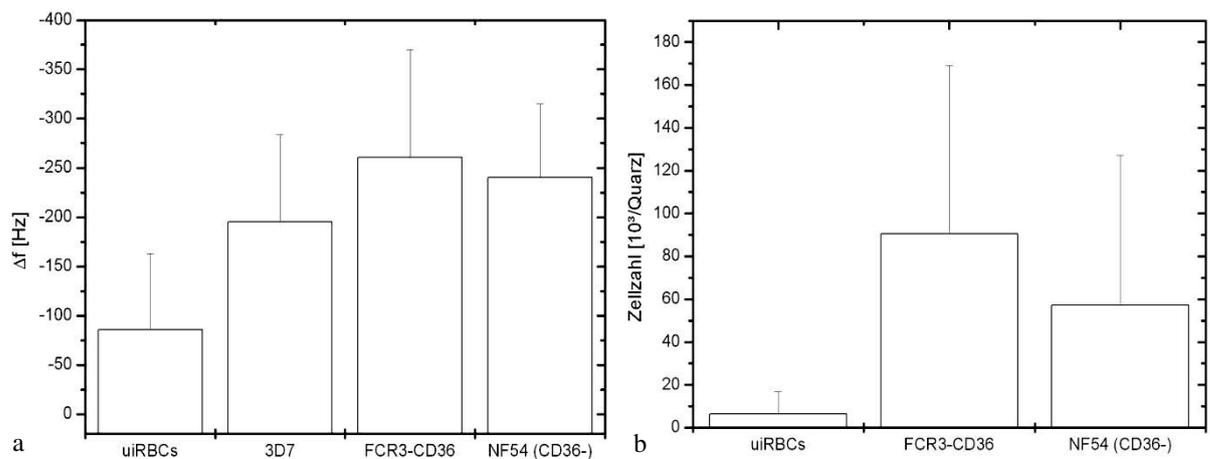


Abbildung 36: Vergleich der bei QCM-Messungen erhaltenen Frequenzabfälle (a) und Zelldichten pro Quarz (b) zwischen der Kontrolle mit uiRBCs und den verschiedenen Parasitenstämmen, bezogen auf die Bindung an CD36/C32-Membranen.

3.5 Nachweis der Zytoadhäsion von FCR3-CSA an CSA

Die für die Ausbildung der plazentalen Malaria bedeutende Zytoadhäsion an CSA wurde ebenso wie die Adhäsion an CD36 mit den bereits in Kapitel 3.4 erläuterten Messsystemen bzw. -abläufen untersucht. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse werden nun in den folgenden Unterkapiteln ausführlich erläutert.

3.5.1 Ergebnisse der Langzeitmessungen über Nacht an bCSA bzw. CSA

Um die Adhäsion von iRBCs des Stammes FCR3-CSA an den Rezeptor CSA zu untersuchen, wurden zunächst Langzeitmessungen durchgeführt, die häufig über annähernd 24 Stunden andauerten. Als Schichtsysteme wurden hierbei NAV/bCSA bzw. PS/CSA verwendet und miteinander verglichen. Beide Systeme finden in der Literatur Erwähnung, wobei die Immobilisierung von CSA über PS die gängigste Variante ist.

Abbildung 37a zeigt exemplarisch mit NAV/bCSA erhaltene Messkurven, bei denen eine unblockierte Schicht (quadratische Symbole) mit einer mit 2% BSA/PBS blockierten Schicht (dreieckige Symbole) verglichen wird. Dabei wurde untersucht, ob mögliche unspezifische Signale bei Verwendung der unblockierten Schicht durch das BSA unterbunden werden konnten. Als Kontrolle zu den iRBCs fungierte, ebenso wie bei den Messungen zur CD36-Bindung, entsprechend verdünntes Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ (geschlossene Symbole). Aufgrund der Flussverminderung von 100 auf 4µl/min kam es wie bei den entsprechenden Messungen mit CD36 zu Beginn der Messungen zu einem steilen Anstieg des Frequenzsignals.

Bei den erhaltenen Messkurven ist deutlich zu erkennen, dass bei Verwendung der blockierten Schicht keine Bindung mehr nachgewiesen werden konnte, es kam zu keinem Abfall der Resonanzfrequenz bei den iRBCs. Im Gegensatz dazu konnte bei der unblockierten Schicht sowohl mit uiRBCs als auch mit iRBCs ein deutliches Signal erhalten werden, wobei der Frequenzabfall bei den iRBCs in diesem Fall mit 132Hz mehr als doppelt so stark ausfiel als bei der entsprechenden Kontrolle. Dort betrug der Frequenzabfall 52Hz. Bei diesen unblockierten Proben korrelierten die Messkurven sehr gut mit den entsprechenden Mikroskopaufnahmen (Abbildung 37b und c). Es ist zu sehen, dass in diesen Ausschnitten bei den uiRBCs 26 Zellen und bei den iRBCs etwa 90 Zellen auf den jeweiligen Sensoren vorhanden waren. Bei Verwendung dieses Schichtsystems fiel zudem auf, dass ebenfalls große Zellaggregate auftraten, die zum Teil aus 30 bis 50 Zellen bestanden (vgl. Abbildung 37c). Bei den blockierten Quarzen zeigten die Mikroskopaufnahmen (Abbildung 37d und e) ein von der Messkurve etwas abweichendes Ergebnis, da hier ebenfalls Zellen auf der Sensoroberfläche immobilisiert vorlagen, wenn auch in geringerem Maße als bei den unblockierten Quarzen (9 bei uiRBCs bzw. 7 bei iRBCs). Auch traten keine Zellaggregate auf. Die den Messkurven entsprechenden Blutausstriche (Abbildung 37f-i) stellen wieder den Entwicklungsverlauf der Parasiten dar. Bei der Messung ohne Blockierung lag der Großteil der Zellen vor der Messung im Trophozitenstadium und nach der Messung im Schizontenstadium vor, wobei dort bereits erste Hämozoine vorlagen. Bei der Blockierungslage lagen die Parasiten dagegen vor der Messung bereits schon als Schizonten vor. Aufgrund der fortgeschrittenen Entwicklung lagen daher am Ende der Messung nur noch wenige Zellen, dafür vermehrt Hämozoine vor. In den Ausstrichen, die vor der Messung gemacht wurden, ist wiederum der typische Mehrfachbefall von Erythrozyten zu erkennen.

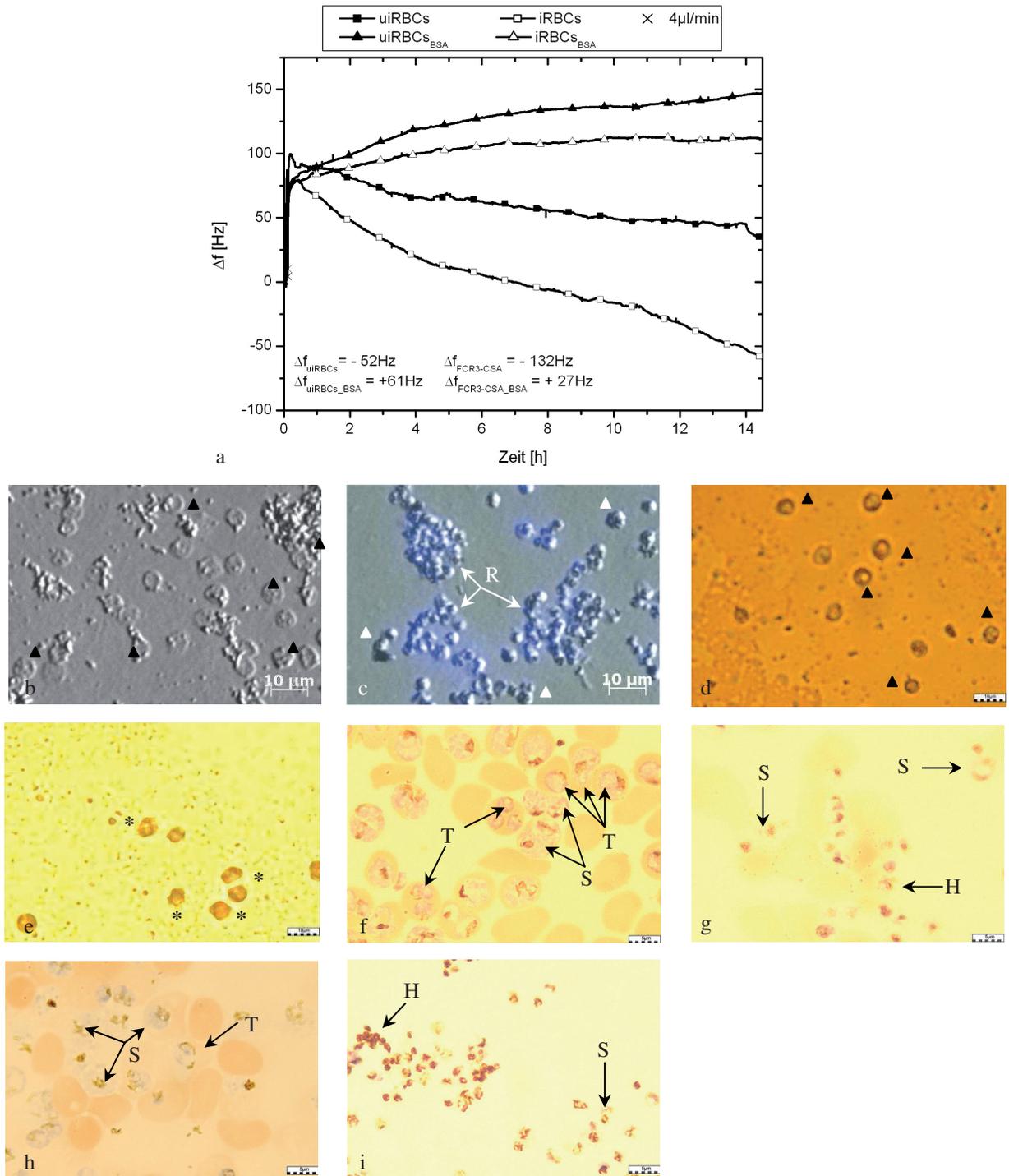


Abbildung 37: Exemplarische Langzeitmessung zur Untersuchung der Zytoadhäsion von FCR3-CSA an NAV/bCSA. In **a** liegen zwei Messungen vor, bei denen die resultierenden Frequenzverläufe auf unblockierten (quadratische Symbole), bzw. auf mit 2% BSA/PBS blockierten Schichten (dreieckige Symbole) verglichen werden. Die offenen Symbole stellen die Kurven der iRBCs dar, die geschlossenen Symbole die der uiRBCs. Die Mikroskopaufnahmen **b-c** zeigen mit Fluoreszenzaufnahmen überlagerte Auflichtaufnahmen der unblockierten Quarze, **d-e** hingegen Auflichtaufnahmen der mit BSA blockierten Quarze, wobei **b** und **d** die Kontrollen (uiRBCs; Dreiecke) und **c** und **e** mit iRBCs (Sterne) beladene Quarze zeigen (R: Rosette/Autoaggregat). Bei den Abbildungen **f-i** handelt es sich um entsprechende Blutausstriche, die vor (**f, h**) bzw. nach der Messung (**g, i**) gemacht wurden; **f, g**: ohne BSA-Blockierung; **h, i**: mit BSA-Blockierung (T: Trophozoit, S: Schizont, H: Hämozoin). Vergrößerung: 500x (**b-e**) bzw. 1000x (**f-i**).

Sowohl mit dem Langzeit-, als auch mit dem Kurzzeitmesssystem wurden Messungen durchgeführt, um das Schichtsystem PS/CSA zu testen. Wie bereits erwähnt, entspricht diese Schicht der etablierten Standardmethode zur Untersuchung der Zytoadhäsion von *P. falciparum* an CSA. Ein großer Vorteil dieses Systems wurde darin gesehen, dass hier Kontrollsubstanzen einfacher immobilisiert werden können, da eine Biotinylierung derselbigen nicht durchgeführt werden muss.

Zunächst wurde, wie in Abbildung 38 exemplarisch dargestellt, entsprechend den obigen Messungen mit NAV/bCSA Messungen auf mit 2% BSA/PBS blockierten (Kurven mit dreieckigen Symbole) und auf unblockierten Quarzen (quadratische Symbole) durchgeführt, um zu prüfen, ob bei der unblockierten Schicht unspezifische Signale zustande kamen. Erneut wurden mit FCR3-CSA-infizierte Erythrozyten (offene Symbole) und entsprechend verdünntes Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ als Kontrolle (geschlossene Symbole) vermessen. Die bei diesem Messsystem stets am Anfang der Kurven auftretenden steilen Anstiege der Frequenzen sind wieder auf Verminderungen der Pumpenflussraten von 100 auf 4µl/min zurückzuführen, welche einen verminderten Druck über dem Quarz verursachten.

Dabei zeigte sich, dass sich sowohl bei den uiRBCs als auch bei den iRBCs unspezifische Signale durch die Blockierung mit BSA auf etwa ein Siebtel (uiRBCs) bzw. auf die Hälfte (iRBCs) reduzieren ließen. Bei Betrachtung der jeweiligen Quarze unter dem Mikroskop (Abbildung 38b-e) konnte allerdings kein entsprechendes Verhalten beobachtet werden. Die hier erhaltenen Ergebnisse widersprachen den Messkurven dahingehend, dass auf den blockierten Quarzen (Abbildung 38d-e) mehr Zellen anhafteten (8 bei uiRBCs bzw. ca. 23 bei iRBCs) als bei den unblockierten Quarzen (0 bei uiRBCs bzw. 18 bei iRBCs; Abbildung 38b-c). Zudem konnte festgestellt werden, dass bei Verwendung der Beschichtung mit PS/CSA keine oder nur sehr wenige Zellaggregate vorkamen. Wie aus den korrespondierenden Aufnahmen der Blutausstriche entnommen werden kann, lagen die Parasiten zu Beginn der beiden Messungen großteils als Schizonten vor (Abbildung 38f, h). Am Ende der Messungen waren dagegen nur noch sehr wenige intakte Zellen und verstärkt Hämozoine vorhanden, wie in Abbildung 38g und i dargestellt.

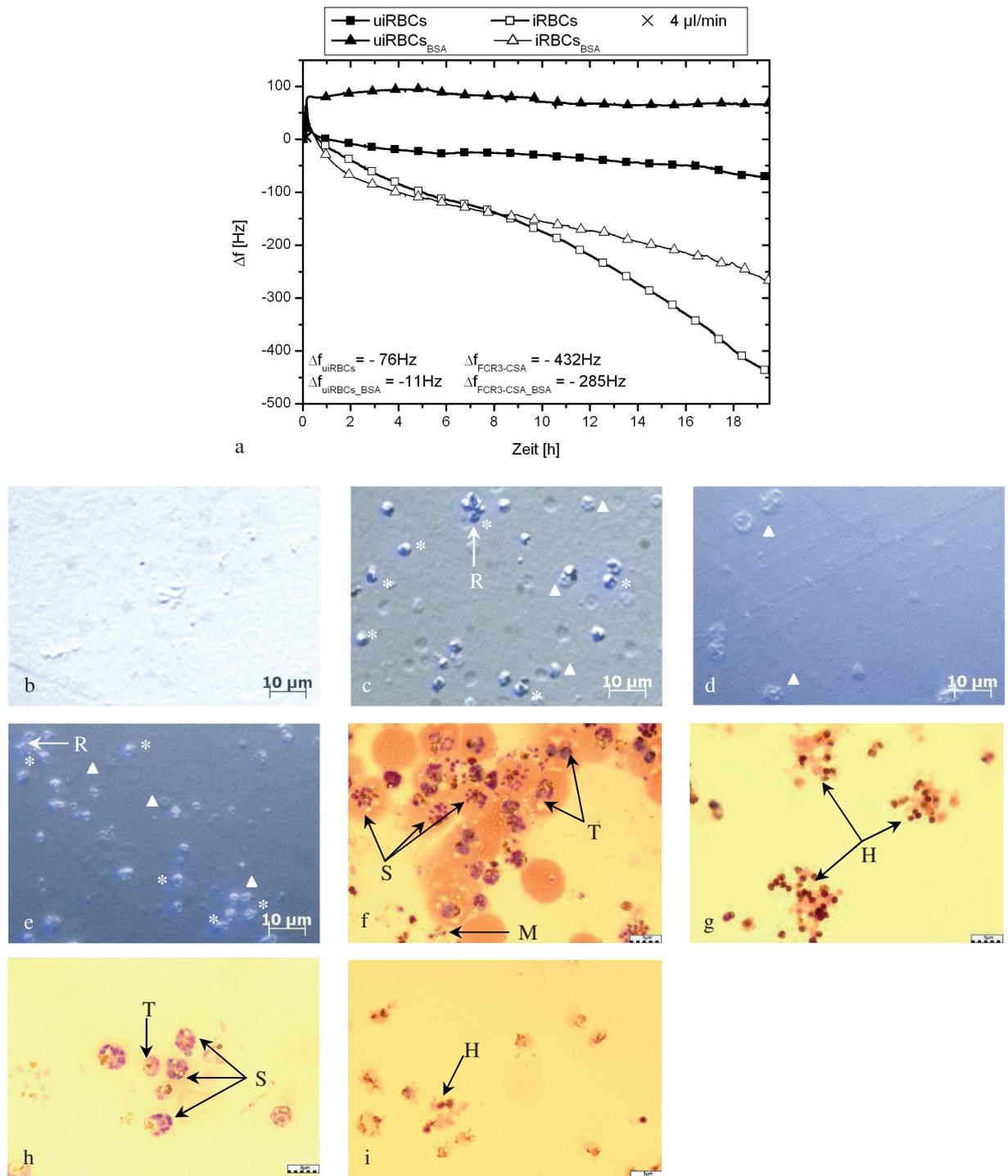


Abbildung 38: Exemplarische Langzeitmessung zur Detektion der Adhäsion von FCR3-CSA an PS/CSA. In **a** sind die Resultate bei Verwendung von mit BSA blockierten Schichten (dreieckige Symbole) bzw. von unblockierten Schichten (quadratische Symbole) gegenübergestellt, wobei die Kurven der uiRBCs mit jeweils geschlossenen, jene der iRBCs mit offenen Symbolen dargestellt wurden. Die korrespondierenden Auflichtaufnahmen, die mit Fluoreszenzaufnahmen überlagert wurden, sind in **b-e** dargestellt, wobei es sich bei den Quarzen in **b** und **c** um jene mit einer unblockierten, bei **d** und **e** um die mit BSA-blockierten Schichten handelt. Bei den iRBCs (Sterne; **c**, **e**) leuchteten die Zellkerne aufgrund der DAPI-Färbung blau auf; die Aufnahmen **b**, **d** zeigen die Quarze der entsprechenden Kontrollen (uiRBCs, Dreiecke). In **f-i** sind die jeweiligen Blutaussstriche vor (**f**, **h**) bzw. nach der Messung (**g**, **i**) gezeigt; **f**, **g**: ohne BSA-Blockierung; **h**, **i**: mit BSA-Blockierung (T: Trophozoit, S: Schizont, H: Hämozoin). Vergrößerung: 500x (**b-e**) bzw. 1000x (**f-i**).

3.5.2 Ergebnisse des verkürzten Adhäsionsassays

Mit dem Schichtsystem PS/CSA wurden, wie bereits in den Kapiteln 2.2.4.2 und 3.4.2 beschrieben, wiederholt Adhäsionsassays mit höherer Zelldichte (Kurzzeitmessung) durchgeführt, wobei die Zellen im Vergleich zum Langzeitassay weniger stark verdünnt wurden. In Abbildung 39a ist eine mit dieser Methode erhaltene Messkurve exemplarisch dargestellt, wobei wiederum mit FCR3-CSA-infizierte iRBCs und uiRBCs gegenübergestellt sind. Die bei diesen Kurven auffälligen Peaks zu Beginn der Messungen kamen erneut durch einen Pumpenstopp zum Wechseln des Zulaufschlauchs vom Medium zum Probenmaterial (kurzer Peak) bzw. durch eine Verminderung der Flussrate auf 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ zustande, welche den Druck über dem Quarz entsprechend beeinflussten.

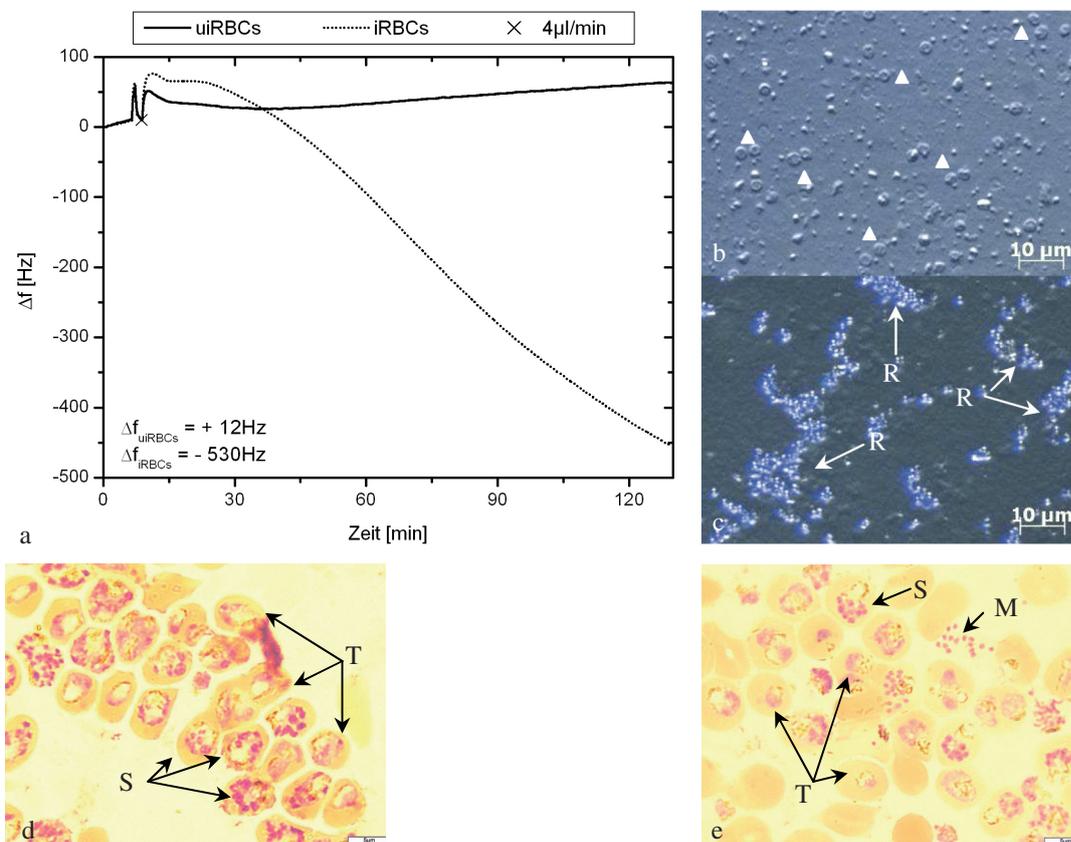


Abbildung 39: Detektion der Bindung von FCR3-CSA bzw. von uiRBCs als Kontrolle an CSA mittels eines kürzeren Messablaufs. Die mit Schwingquarzsensoren erhaltenen Messkurven (a) zeigten bei iRBCs (gepunktete Kurve) im Gegensatz zu uiRBCs eine deutliche Bindung an den Sensor; b, c: korrespondierende Mikroskopaufnahmen (Auflicht- überlagert mit den entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen), wobei b den Quarz der Kontrolle und c den mit iRBCs belegten Quarz darstellt. Dort sind die iRBCs durch die mittels DAPI blau gefärbten Zellkerne deutlich dargestellt. Die Aufnahmen d und e zeigen Blutausstriche der Probe mit iRBCs, die vor (d) bzw. nach der Messung (e) gemacht wurden; S: Schizont, T: Trophozoit, H: Hämazin. Vergrößerung: 500x (b, c) bzw. 1000x (d, e).

Verglichen mit der entsprechenden Langzeitmessung (vgl. Abbildung 38a) konnte hier über die kürzere Zeitspanne ein deutlicheres und stärkeres Signal erhalten werden, wie in Abbildung 39a zu sehen ist. Aus dieser Messung konnte erneut entnommen werden, dass bei den uiRBCs kein unspezifisches Bindesignal zustande kam, da die Frequenzänderung +12Hz betrug. Diese Beobachtung wurde allerdings bei der Untersuchung des entsprechenden Quarzes (Abbildung 39b) nicht bestätigt, da dort mit 21 Zellen im vorliegenden Ausschnitt, verglichen mit den entsprechenden Quarzen der Langzeitmessung (0 bzw. 8 Zellen; Abbildung 38b und d), eindeutig mehr Zellen auf der Quarzoberfläche vorlagen. Bei der Probe mit den infizierten Zellen korrelierten jedoch die Ergebnisse der QCM-Messung und der mikroskopischen Auswertung des Quarzes sehr gut. Mittels Schwingquarzen konnte in dieser beispielhaften Messung ein Abfall des Messsignals um 530Hz erhalten werden. Auch zeigte der zugehörige Quarz (Abbildung 39c) eine deutlich dichtere Belegung als jener der uiRBCs und derjenigen der Langzeitmessung (vgl. Abbildung 38c und e). Ein weiterer Unterschied zur entsprechenden Langzeitmessung mit PLL/CSA war das Auftreten sehr großer Zellaggregate aus iRBCs, die in etwa denen der Langzeitmessung aus Abbildung 37c entsprachen. Die vor bzw. nach der Messung hergestellten Blutausrüche (Abbildung 39d bzw. e) zeigen, dass über die Messzeit keine starke Veränderung der Parasiten stattgefunden hatte. Ebenso wie vor der Messung lagen die Parasiten auch nach der Messung als Trophozoiten bzw. Schizonten vor, wobei die Schizonten gegen Ende der Messung teilweise weit gereift, also kurz vor der Merozoitenfreisetzung vorlagen.

3.5.3 Kontrollmessungen zur Prüfung der Spezifität

Eine Überprüfung der Spezifität der bis dahin erhaltenen Signale erfolgte über verschiedene Kontrollmessungen mit der Langzeit- bzw. mit der Kurzzeitmethode. Die dabei verwendeten Beschichtungssysteme sind in Tabelle 5 dargestellt. Im Falle von NAV wurde als Kontrolle zunächst bBSA gewählt, an welches die Zellen nicht binden sollten. In weiteren Messungen wurde auf eine zusätzliche Schicht verzichtet, d.h. in diesem Fall lag das NAV in reiner Form vor. An dieses NAV sollten ebenfalls keine Zellen binden. Bei PS wurde zur Kontrolle neben reinem PS eine Beschichtung mit Glucose angewandt. Auch wurde in einer weiteren Messung versucht, die Bindung an CSA über eine Blockierung desselbigen mit einem gegen CSA-gerichteten Antikörper zu unterbinden.

Basisschicht	Zweite Schicht
NAV	+ bBSA
	ohne zusätzliche Schicht
PS	+ Glucose
	ohne zusätzliche Schicht
	+ CSA, + anti-CSA-Antikörper

Tabelle 5: Übersicht über die verschiedenen Schichten, die in den Kontrollmessungen zur Adhäsion von FCR3-CSA an NAV/bCSA bzw. PS/CSA vermessen wurden.

Eine Zusammenfassung der hierbei erhaltenen Frequenzänderungen ist in Abbildung 40a, die Zusammenfassung der entsprechenden Analysen zur Zelldichte ist in Abbildung 40b dargestellt. Dabei sind die Ergebnisse der verschiedenen Kontrollmessungen jenen der normalen Beschichtungen gegenübergestellt.

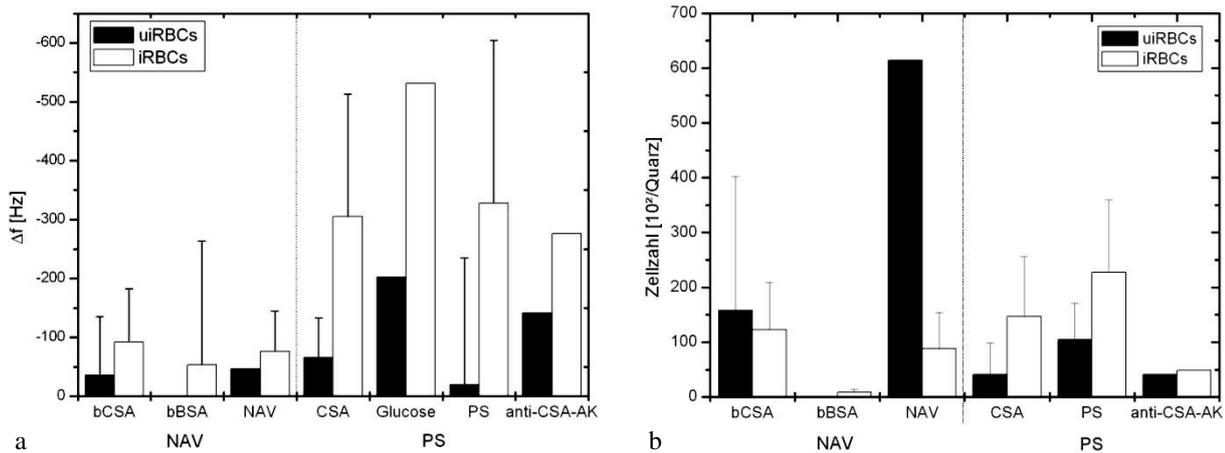


Abbildung 40: Vergleich der mit Schwingquarzen erhaltenen Messergebnisse (a) zur Bindung an NAV/bCSA bzw. an PS/CSA und den entsprechenden Kontrollen (n = 1-3). Gegenübergestellt sind die Zelldichten, die auf den jeweiligen Schichten verzeichnet wurden (b).

Im Hinblick auf die Bindung an das über NAV immobilisierte bCSA kann mittels einer durchgeführten statistischen Untersuchung (t-Test) gesagt werden, dass bei den jeweiligen Kontrollen keine signifikant unterschiedlichen Signale und Zelldichten erhalten wurden. Dies galt dabei für die iRBCs ebenso wie für die uiRBCs, wie aus Tabelle 6 entnommen werden kann. Entsprechendes konnte auch für das über PS gebundene CSA festgestellt werden, da dort bei den verschiedenen Kontrollen ebenfalls keine signifikant unterschiedlichen Signale und Sensorbelegungen erhalten wurden.

Schicht	Zellen/Probe	p - QCM	p - Zelldichte
NAV/bBSA	iRBCs	0,61	0,41
NAV	iRBCs	0,77	0,38
	uiRBCs	0,91	0,09
PS/Glucose	iRBCs	0,33	-
	uiRBCs	0,11	-
PS	iRBCs	0,90	0,73
	uiRBCs	0,60	0,93
PS/CSA/anti-	iRBCs	0,90	0,34
CSA- Antikörper	uiRBCs	0,33	0,71

Tabelle 6: Darstellung der mittels t-Test ermittelten Standardabweichungen der Kontrollmessungen im Vergleich zu den Schichten NAV/bCSA bzw. PS/CSA.

Des Weiteren war es hier unter Verwendung eines gegen CSA gerichteten Antikörpers nicht möglich, das Zustandekommen eines Signals zu unterbinden. Auch unterschied sich die Belegung der Quarze, dargestellt in Abbildung 41, bei diesem Versuch nicht von der einer normalen Messung.

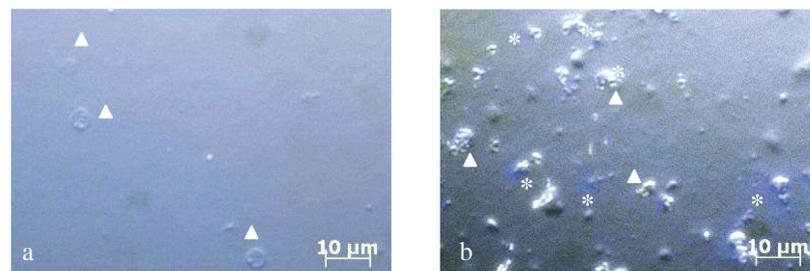


Abbildung 41: Quarzbelegung mit Zellen nach der Kontrollmessung mit einem gegen CSA gerichteten Antikörper; **a:** uiRBCs (Dreiecke), **b:** iRBCs (Sterne); Vergrößerung: 500x.

Das unspezifische Bindungsverhalten der Zellen zeigte sich ebenfalls bei der reinen PS-Beschichtung, da sich das dort erhaltene Signal im Schnitt nicht signifikant von jenem der eigentlich spezifischen Schicht unterschied.

3.5.4 Ergebnisse der Messungen mit geschlossener Fluidik

Zur Umgehung unspezifischer Beschichtungssysteme wurde in einem letzten Ansatz das CSA über PLL gebunden. Wie bereits in Abbildung 31 gezeigt, waren dabei kaum noch unspezifische Bindungsstellen durch das PLL vorhanden, da dort nur sehr wenig BSA gebunden wurde. Ein großer Vorteil dieses Systems war, dass sich ein unspezifisches Signal sehr deutlich identifizieren lässt, da die uiRBCs an das PLL in demselben Maße binden wie iRBCs. Bilden sich also bei dieser Schicht unter Verwendung von uiRBCs ebenso starke Signale aus wie bei den iRBCs, so kann eine spezifische Bindung der iRBCs sofort ausgeschlossen werden. Daher stellen die mittels uiRBCs erhaltenen Signale bei diesem System aussagekräftige Kontrollen dar. Das Bindungsverhalten der uiRBCs bzw. der iRBCs an diese Schicht wurde ausschließlich mit dem Messverfahren des geschlossenen fluidischen Systems untersucht, wie in Abbildung 42 dargestellt ist. In diesem Graphen (Abbildung 42a) sind erneut exemplarisch die Signale von iRBCs und uiRBCs dargestellt. Daneben sind in Abbildung 42b alle mit diesem System erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Die zu Beginn der Messungen auftretenden steilen Frequenzanstiege im Graphen der Abbildung 42a sind auf die Immobilisierung des Rezeptors CSA zurückzuführen. Durch den jeweils durchgeführten Spülschritt mit einer Flussrate von 100µl/min kam es aufgrund des erhöhten Druckes in der Messkammer zu einem Abfall der Frequenz. Dieser glich sich jedoch beim Zurückschalten der Pumpen auf 50µl/min wieder aus. Ebenso wie bei allen anderen Messungen sind die kurzzeitigen Peaks der Kurven auf kurze stop-flow-Phasen zurückzuführen, die benötigt wurden, um den Zulaufschlauch unter Vermeidung einer Luftblasenbildung vom Puffer- zum Probengefäß zu wechseln.

Bei Betrachtung der Kontrolle mit uiRBCs konnte die Ausbildung eines unspezifischen Signals eindeutig ausgeschlossen werden, da diese sowohl im Hinblick auf die exemplarisch aufgeführte Messung in Abbildung 42a als auch in der Gesamtübersicht stets einen niedrigeren Frequenzabfall oder gar einen Anstieg der Frequenz hervorriefen. Dies konnte auch bei der Untersuchung der entsprechenden Quarze, von denen ein Exemplar in Abbildung 42c dargestellt ist, bestätigt werden, da dort nur vereinzelte Zellen auf der Sensoroberfläche nachgewiesen werden konnten.

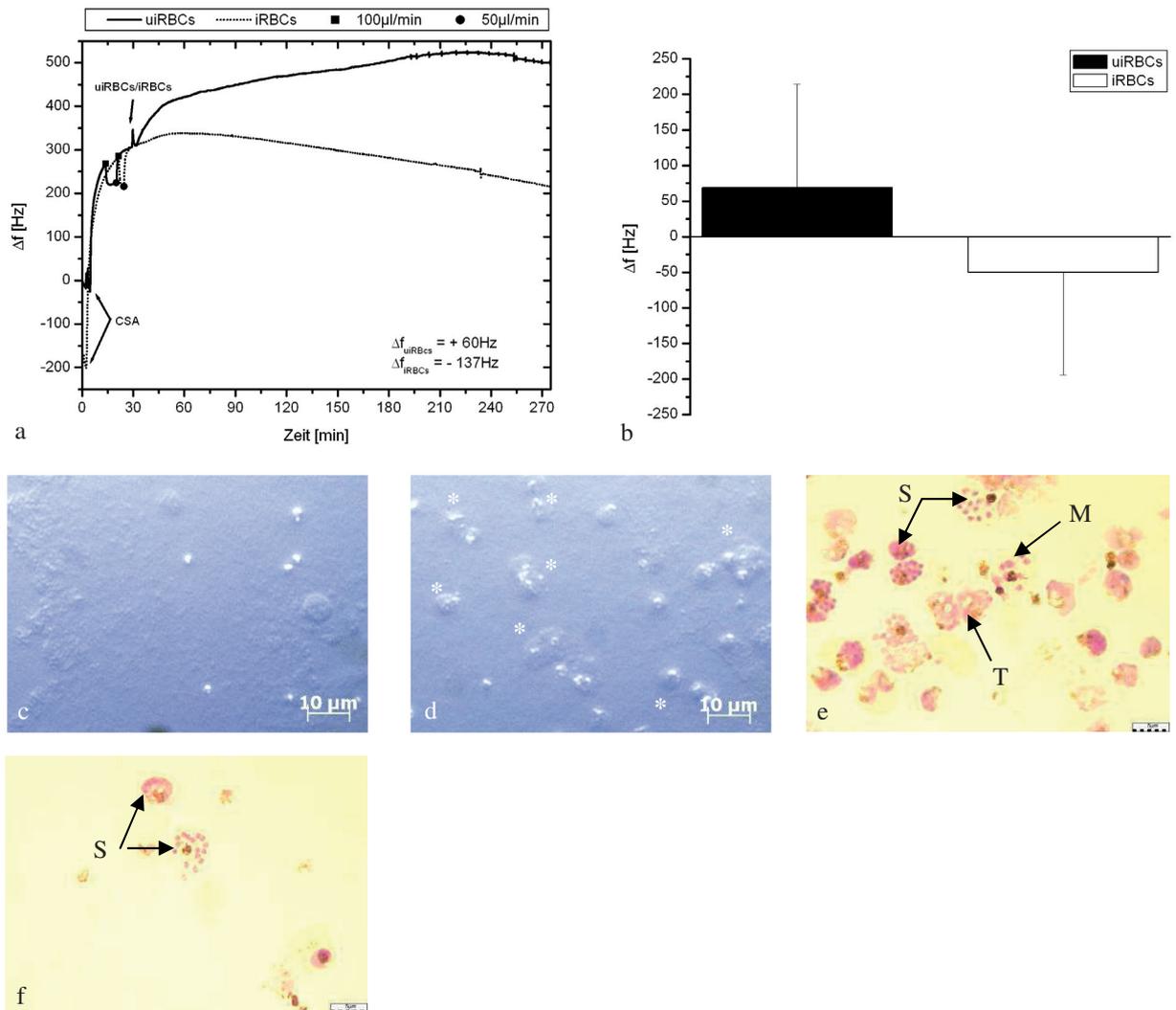


Abbildung 42: Messungen zur Zytoadhäsion an CSA mit geschlossener Fluidik. In Graph **a** liegen exemplarische Messkurven vor, wobei die resultierten Signale von uiRBCs (schwarze Kurve) mit iRBCs (gepunktete Kurve) gegenübergestellt sind. Bei **b** handelt es sich um eine Zusammenfassung aller mit diesem System erhaltenen Messergebnisse. Die mit Fluoreszenzaufnahmen überlagerten Auflichtaufnahmen der jeweiligen Quarze (**c** und **d**) zeigen die Belegung der Sensoroberfläche mit den Zellen, wobei die Zellkerne der Parasiten (Sterne) blau aufleuchteten (**c**: uiRBCs, Dreiecke, **d**: iRBCs). Die Giemsa-gefärbten Blutausstriche (**e** und **f**) zeigen exemplarisch die Entwicklung der Parasiten über die Messung hinweg (**e**: vor der Messung; **f**: nach der Messung) (T: Trophozoit, S: Schizont, M: Merozoit). Vergrößerung: 500x (**c,d**) bzw. 1000x (**e, f**).

Im Falle der iRBCs wurden hingegen deutliche Frequenzabfälle verzeichnet, die auf eine stattfindende Adhäsion der Zellen an die Schicht hinwiesen. Diese Signale korrelierten sehr gut mit der Belegung der Sensoroberfläche mit Zellen. Dort lagen durchschnittlich etwa 64.200 Zellen/Quarz vor (vgl. Abbildung 42d). Bei Betrachtung der jeweiligen Blutausstriche wurden keine morphologischen Veränderungen der Parasiten verzeichnet. In dem dargestellten Beispiel lagen vor der Messung neben einigen Trophozoiten bereits viele Schizonten vor, die zum Teil kurz vor der Merozoitenfreisetzung standen. Somit waren nach der Messung größtenteils reife Schizonten in der Probe vorhanden (Abbildung 42e und f).

3.6 Vergleich des Bindungsverhaltens an CD36 und CSA

Abschließend ist in Abbildung 43 das Bindungsverhalten der jeweiligen uiRBCs und iRBCs, welche mit den Parasitenstämmen 3D7, FCR3-CD36 bzw. FCR3-CSA infiziert waren, gegenübergestellt. Dort werden die im Mittel bei den Untersuchungen zur Zytoadhäsion erhaltenen Frequenzabfälle unabhängig vom Parasitenstamm (im Falle von CD36) aufgeführt. Im Falle der zu CSA erhaltenen Ergebnisse sind ausschließlich jene aufgeführt, die mit der geschlossenen Fluidik und der Schicht PLL/CSA erhalten wurden. Dies dient der Gewinnung eines allgemeinen Eindrucks auf das Bindungsverhalten an die verschiedenen Rezeptoren.

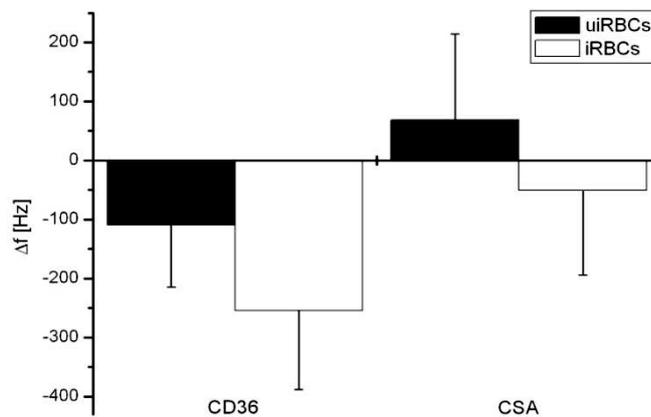


Abbildung 43: Allgemeiner Vergleich der mittels Schwingquarzen erhaltenen Messsignale bei der Untersuchung der Zytoadhäsion von iRBCs an CD36 bzw. CSA. Ihnen sind die entsprechenden Werte, die mit uiRBCs gewonnen wurden, gegenübergestellt.

Werden die mittels iRBCs erhaltenen Werte in Abbildung 43 verglichen, so zeigt sich, dass die CD36-bindenden Parasitenstämmen deutlich stärkere Signale hervorbrachten als die CSA-bindenden Parasiten. Eine statistische Analyse der Daten mittels t-Test ergab einen deutlich signifikanten Unterschied in der Bindungsstärke an die Rezeptoren ($p = 0,00$ bei $n = 32$ bzw. 31). Allerdings verursachten bei den Messungen mit CD36 die Kontrollzellen, also nicht infiziertes Erythrozytenkonzentrat, ebenfalls recht starke Signale, die in etwa jenen der CSA-bindenden iRBCs entsprachen. Dennoch war dort ein deutlicher Unterschied zwischen uiRBCs und iRBCs festzustellen, da die Signale der CD36-bindenden iRBCs mehr als doppelt so stark ausfielen als die der entsprechenden Kontrollen. Dieser Unterschied fiel bei den Versuchen mit FCR3-CSA-infizierten Erythrozyten noch deutlicher aus. Verursachten in diesem Fall die uiRBCs Frequenzanstiege, so konnten bei den iRBCs um bis zu etwa vierfache Frequenzabfälle erhalten werden.

3.7 Ergebnisse der Kontrollmessungen mit Erythrozytenkonzentrat

Wie bereits in Kapitel 2.2.5 beschrieben, wurden hinsichtlich der Bindung an CSA zusätzliche Kontrollmessungen mit kultiviertem (k.0+) bzw. unkultiviertem Erythrozytenkonzentrat (0+) aus dem Kühlschrank durchgeführt. Dabei wurde geprüft, ob mögliche morphologische Veränderungen während der Kultivierung der Erythrozyten einen Einfluss auf die Ausbildung von Signalen haben könnten. Dazu wurden die bereits beschriebenen CSA-Schichten verwendet und der Puffer EDTA/Tris bzw. die Medien RPMI und RPMI-complete getestet. Eine Übersicht über die verschiedenen Kombinationen sowie der entsprechenden Mittelwerte der resultierten Frequenzänderungen können aus der folgenden Tabelle 7 entnommen werden. Werden zunächst die beiden unterschiedlich gehaltenen Zellen betrachtet, so fällt auf, dass diese kein allzu sehr voneinander abweichendes Verhalten an den Tag legten. Die kultivierten Zellen wiesen in Bezug auf die Ausbildung des Signals eine ähnliche Tendenz wie die Zellen aus dem Kühlschrank auf. Unspezifische Signale waren eher schwächer ausgeprägt. Werden die verschiedenen Lösungen verglichen, so konnte das Zustandekommen unspezifischer Signale meist bei Verwendung von RPMI-complete vermieden werden. Der Einsatz von RPMI hingegen führte auch im Vergleich zu EDTA/Tris häufig zu stärkeren Frequenzabfällen.

Die stärksten unspezifischen Signale wurden bei den Basisschichten NAV und PS ausgebildet. In Bezug auf die mit dem Rezeptor CSA versehenen Schichten wurden die stärksten Frequenzabfälle bei NAV/bCSA/BSA unter Verwendung von RPMI und bei PLL/CSA/BSA unter Verwendung von EDTA/Tris erhalten. Wenn alle Kombinationen miteinander betrachtet werden, so kann festgestellt werden, dass die optimalste Kombination in Bezug auf die Zytoadhäsion von *P. falciparum* an CSA jene bestehend aus der Schicht PLL/CSA und des Mediums RPMI-complete war.

Schicht	Puffer/Medium	Δf [Hz] (k.0+)	Δf [Hz] (0+)
NAV	EDTA/Tris	-154	-262
	RPMI	-592,2	-441,5
	RPMI-complete	-117,5	-53
NAV/bCSA	EDTA/Tris	9	-76
	RPMI	262	35
	RPMI-complete	-26,33	-163,33
NAV/BSA	EDTA/Tris	-2	-182
	RPMI	-274,5	-332,5
	RPMI-complete	-43,5	127,5
NAV/bCSA/BSA	EDTA/Tris	8	-6
	RPMI	-356	55
	RPMI-complete	-12	-2
PS	EDTA/Tris	-64	-201
	RPMI	-57,4	-595,5
	RPMI-complete	-11	-40
PS/CSA	EDTA/Tris	-121	-163
	RPMI	-4	-78,5
	RPMI-complete	-9	-
PS/BSA	EDTA/Tris	1	-95
	RPMI	-11	-31
	RPMI-complete	61	-71
PS/CSA/BSA	EDTA/Tris	-119	-203
	RPMI	-105	312
	RPMI-complete	136	-23
PLL/CSA	EDTA/Tris	-	-94
	RPMI	91	-
	RPMI-complete	-35	125,43
PLL/CSA/BSA	EDTA/Tris	-	-312
	RPMI	-	-25
	RPMI-complete	-	14
PLL/CSA/BSA mit/ohne CSA-Vorinkubation	RPMI-complete	-	111,5/89,5

Tabelle 7: Übersicht über die bei Kontrollmessungen mit kultiviertem (k.0+) bzw. mit nicht kultiviertem Erythrozytenkonzentrat getesteten CSA-Schichten und Puffer/Medien.

3.8 Überprüfung der Standardmethode zur CSA-Zytoadhäsion

Da im Hinblick auf die Adhäsion an CSA über Schwingquarzmessungen gezeigt wurde, dass bei einer Beschichtung der Sensoren mit PS und CSA, basierend auf der Standardmethode zur Selektion, unspezifische Signale erhalten wurden, wurde diese Standardmethode überprüft. Dazu wurden die wells von zwei 6-well-Platten unterschiedlich behandelt und mit verschieden vorbehandelten iRBCs beladen, wie aus Tabelle 8 entnommen werden kann.

Well	Beschichtung	iRBCs
1	CSA (100µg/ml in PBS) üN im Kühlschrank	in Adhäsionsmedium
2	CSA (100µg/ml in PBS) üN im Kühlschrank	in RPMI
3	CSA (100µg/ml in PBS) üN im Kühlschrank	in 2% BSA/PBS
4	Adhäsionsmedium für 1h bei Raumtemperatur	in Adhäsionsmedium
5	2% BSA/PBS für 1h bei Raumtemperatur	in Adhäsionsmedium
6	2% BSA/PBS für 1h bei Raumtemperatur	in RPMI
7	-	in Adhäsionsmedium
8	-	in RPMI

Tabelle 8: Übersicht über die mit der Standardmethode eines Adhäsionsassays bzgl. CSA getesteten Parameter.

Wie in Kapitel 2.2.2.3 erläutert wurde, wurden die gebundenen Zellen zur Auswertung nach mehreren Waschschrinen mit 4% PFA fixiert und anschließend mit Giemsa gefärbt. Die dabei erhaltenen Aufnahmen sind in Abbildung 44 dargestellt, wobei die obere Bildreihe die mit CSA beschichteten, die zweite Reihe die blockierten und die dritte Reihe die unbeschichteten wells darstellt.

Wie aus Abbildung 44a zu entnehmen ist, banden bei der Probe in Adhäsionsmedium mit 10% Serum nur wenige Zellen an das immobilisierte CSA. Wurden die Parasiten dagegen in Serum-freien Medien inkubiert, so lagen nach den Waschschrinen geschätzt mehr Zellen vor (Abbildung 44b und c). Auffällig war ebenfalls, dass in diesen wells neben den eigentlich bindungsfähigen Trophozoiten und Schizonten auch Ringstadien nachgewiesen werden konnten.

Um zu testen, ob die Zellen hierbei spezifisch an das CSA oder unspezifisch an das PS gebunden vorlagen, wurden Blockierungsversuche mit Adhäsionsmedium bzw. 2% BSA durchgeführt. In Abbildung 44d ist ein mit Adhäsionsmedium blockiertes well dargestellt, in welchem einige Zellen bzw. Ghosts (Zellmembranen von Erythrozyten) vorlagen. Da in diesem Falle keine intakten Zellen vorhanden waren, kann nicht gesagt werden, ob es sich bei den detektierten Zellen vormals um iRBCs handelte. Die beiden mit 2% BSA/PBS blockierten wells (Abbildung 44e und f) zeigten keinen Unterschied was die gebundenen

Zellen anbetraf. In beiden Fällen konnten Trophozoiten und Schizonten nachgewiesen werden. Selbiges galt auch für die unblockierten wells (Abbildung 44g und i).

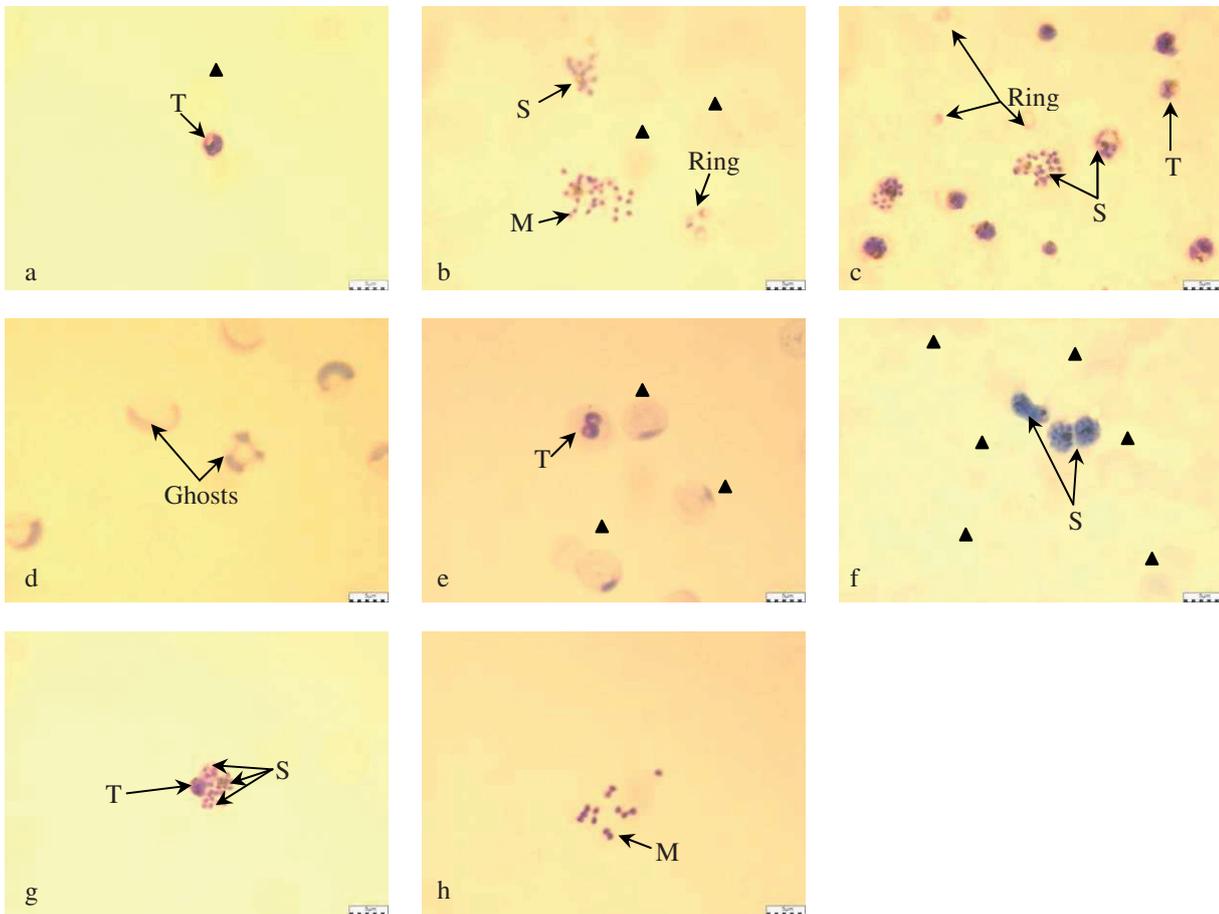


Abbildung 44: Mikroskopische Aufnahmen der in Tabelle 8 aufgeführten wells; **a:** well 1, **b:** well 2, **c:** well 3, **d:** well 4, **e:** well 5, **f:** well 6, **g:** well 7, **h:** well 8. Die vorkommenden *uiRBCs* sind mit Dreiecken markiert, bei den Parasitenstadien handelte es sich Trophozoiten (T), Schizonten (S), Merozoiten (M) und Ringstadien. Vergrößerung: 1000x.

Neben dem Vorkommen gebundener *iRBCs* war allen Proben gemein, dass ebenso *uiRBCs* an der Oberfläche anhafteten. Deren Zahl war bei Verwendung von Adhäsionsmedium am geringsten, konnte aber dennoch nicht gegen Null herabgesetzt werden.

3.9 Detektion der Bindung einzelner PfEMP1-Domänen an CD36 bzw. ICAM-1

Neben dem Nachweis der Zytoadhäsion an die Rezeptoren CD36 und CSA wurde durch die Zusammenarbeit mit dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg versucht die Bindung von PfEMP1 an CD36 bzw. ICAM-1 auf der Proteinebene nachzuweisen. Dabei wurden einzelne Domänen untersucht, bei denen es sich zunächst um eine CIDR1 α -Domäne,

eine DBL1 α und eine DBL2 β C2-Domäne handelte. Es ist bekannt, dass CD36 stets von einer CIDR1 α -Domäne und ICAM-1 von einer DBL2 β -Domäne gebunden wird, wie bereits in Kapitel 1.2 erläutert wurde (vgl. auch Tab 2 und Abbildung 10). Die DBL1 α -Domäne sollte dagegen weder CD36 noch ICAM-1 binden. Dies wurde nun mittels Schwingquarzsensoren überprüft. Dazu wurden wie in den Kapiteln 2.2.3.3 und 2.2.3.5 beschrieben mit C32- bzw. CHO-Membranen beschichtete Sensoren verwendet, die somit die entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche aufwies.

In einer ersten Messreihe wurden über je einen CD36- bzw. ICAM-1-tragenden Schwingquarz alle drei Domänen gepumpt, wobei jene, die nicht binden sollten, zuerst über den Sensor geleitet wurden. Zum Schluss wurde die entsprechende spezifische Domäne über den Quarz geleitet. Zwischen jeder Probe wurden Spülschritte mit 100 μ l/min durchgeführt um ungebundenes BSA bzw. um ungebundene Domänen aus der Messkammer zu entfernen. Die bei diesen Versuchen verwendeten Domänen lagen ebenso wie das zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen verwendete BSA in einer Konzentration von 1mg/ml vor. Die dabei erhaltenen Messkurven sind in Abbildung 45 gezeigt, wobei es sich bei Abbildung 45a um die Bindung an CD36, bei Abbildung 45b um die Bindung an ICAM-1 handelt. Die hierbei auftretenden kurzen Frequenzabfälle und darauf folgenden –anstiege wurden in allen Fällen durch Spülschritte mit Puffer verursacht, bei denen die Flussrate zunächst von 25 auf 100 μ l/min erhöht und nach einer erneuten Stabilisierung des Signals wieder auf von 100 auf 25 μ l/min vermindert wurde. Die dabei entstandenen veränderten Druckverhältnisse beeinflussten das Verhalten des jeweiligen Quarzes entsprechend.

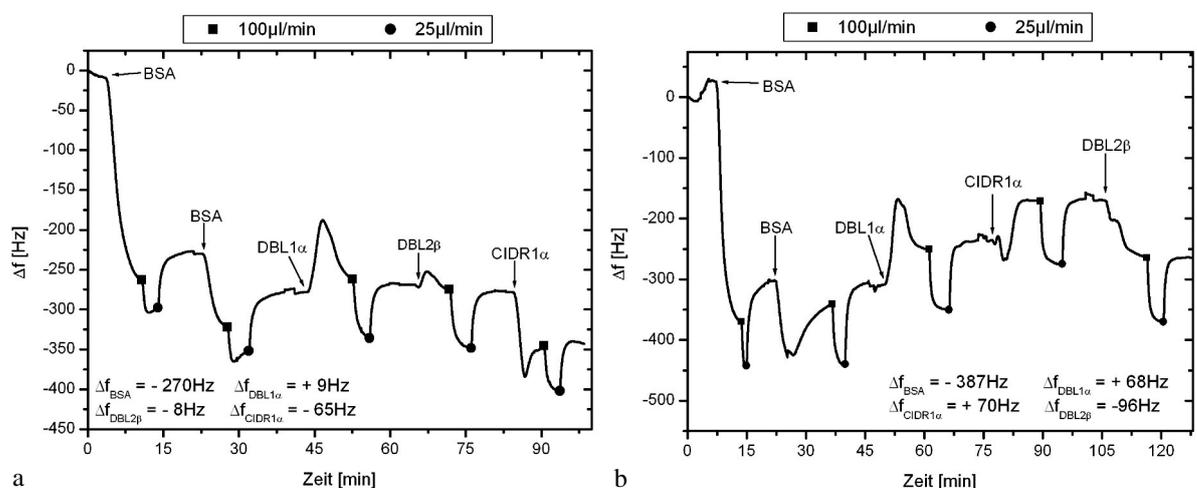


Abbildung 45: Messungen zur Detektion der Bindung einzelner PfEMP1-Domänen an CD36 (a) bzw. ICAM-1 (b).

Wie bereits erwähnt stellt Abbildung 45a den Versuch zum Nachweis der Bindung an CD36 dar. Dabei zeigte sich, dass bei der Blockierung des Quarzes mit BSA viele unspezifische Bindungsstellen blockiert werden konnten, da insgesamt ein Frequenzabfall von -270Hz zustande kam. Nachdem zweimal mit BSA blockiert wurde, wurde zunächst die Domäne DBL1 α (Nummer 20) über den Quarz geleitet, wobei kein Frequenzabfall zustande kam. Nach einem kurzen Anstieg der Frequenz stabilisierte sich das Signal wieder annähernd auf dem Ausgangslevel. Bei der im Anschluss in die Messkammer injizierten DBL2 β C2-Domäne (Nummer 24) zeigte sich ein ähnliches Verhalten der Resonanzfrequenz des Quarzes, wobei der zunächst resultierte Anstieg des Signals etwa nur ein Viertel so stark war als bei der zuvor vermessenen DBL1 α -Domäne. Die zuletzt eingeschleuste CIDR1 α -Domäne (Nummer 21) zeigte dann ein eindeutiges Bindsignal, welches in einem Frequenzabfall von -65Hz resultierte.

In Abbildung 45b ist ein entsprechender Versuch zum Nachweis der Bindung an ICAM-1 dargestellt. Dabei konnten ebenfalls zunächst über BSA einige unspezifische Bindungsstellen blockiert werden, wobei die Änderung des Quarzsignals -387Hz betrug. Nach den Blockierungsschritten wurde erneut zunächst eine Probe der DBL1 α -Domäne in die Messzelle geleitet, was zu einer Signaländerung führte, welche der in Abbildung 45a entsprach. Allerdings stabilisierte sich in diesem Falle das Signal auf einem um 68Hz höher gelegenen Niveau. Die anschließend eingeleitete CIDR1 α -Domäne führte ebenfalls zu einem Anstieg der Frequenz, welche sich nach dem Spülschritt nicht auf einem niedrigeren Level stabilisierte. Nachdem zuletzt die ICAM-1-spezifische DBL2 β C2-Domäne injiziert wurde, konnte eine Bindung derselbigen Domäne aufgrund eines eindeutigen Frequenzabfalls von 96Hz nachgewiesen werden.

Aufbauend auf diesen Versuchen wurden verfeinerte Analysen der ICAM-1-bindenden Domäne DBL2 β sowie weiterer DBL-Domänen durchgeführt. Dazu wurden die Domänen von Frau Dr. Sabine Predehl rekombinant hergestellt. Diese sind in Kapitel 2.2.7 aufgelistet. Die verwendeten DBL β -Domänen unterscheiden sich dabei in ihrer Position im Genom bzw. in ihrem Vorliegen als einzelne DBL β -Domäne bzw. als eine Assoziation aus einer DBL β -Domäne mit einer C2-Domäne. Insgesamt wurde bei diesen Versuchen die Bindung von 13 verschiedenen DBL-Domänen gemessen. Ein Vergleich der dabei erhaltenen Ergebnisse ist in Abbildung 46 dargestellt.

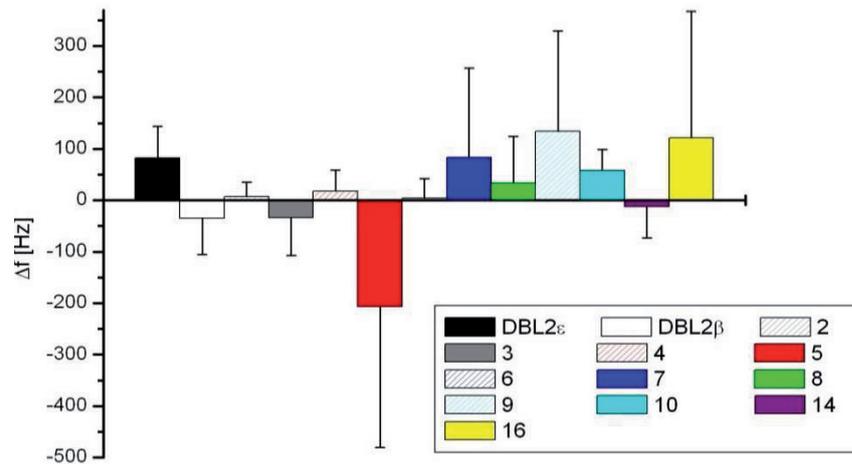


Abbildung 46: Vergleich der mit einer DBL ϵ , einer DBL1 α und elf DBL2 β -Domänen bzgl. der ICAM-1-Bindung erhaltenen Sensorsignale.

Hieraus kann entnommen werden, dass die verwendete DBL ϵ -Domäne keine Bindung an ICAM-1 zeigte. Bei der Untersuchung der verschiedenen DBL2 β -Domänen ergaben sich sehr unterschiedliche Resultate. So konnte mit Ausnahme der bereits in den vorigen Versuchen verwendeten DBL2 β -Domäne und der Domänen 3 (DBL4 β C2), 5 (DBL2 β C2) und 14 (DBL1 α) bei keiner weiteren der untersuchten Domänen eine Bindung nachgewiesen werden. Weiterhin fiel auf, dass bei den Domänen 3 und 5, die assoziiert mit einer C2-Domäne vorlagen, die entsprechenden Pendanten ohne C2-Domäne nicht zur ICAM-1-Bindung fähig waren. Im Hinblick auf die bindungsfähigen Domänen konnte festgestellt werden, dass dort unterschiedlich starke Affinitäten für ICAM-1 vorlagen. So fiel besonders auf, dass es sich bei der Domäne 5 um einen sehr starken, bei den Domänen 3 und DBL2 β um mittlere und bei der Domäne 14 um einen sehr schwachen Binder handelte. Ein Vergleich der bindenden Domänen ergab, dass der Unterschied zwischen der zuerst untersuchten DBL2 β -Domäne und der in Assoziation mit einer C2-Domäne vorliegenden DBL2 β -Domäne (Nr. 5) nicht signifikant war ($p = 0,09$ bei $n = 7$; t-Test). Hinsichtlich der Domäne 5 waren dort allerdings auch Messdaten beinhaltet, die mit geringeren Konzentrationen als 1mg/ml erhalten waren. Werden allerdings ausschließlich die Daten verglichen, die mit Konzentrationen von 1mg/ml erhalten wurden, so ergibt sich bei Anwendung des t-Tests ein signifikanter Unterschied ($p = 0,01$ bei $n = 7$ bzw. 3). Die Domäne 3 (DBL4 β C2) zeigte dagegen eine annähernd gleiche Bindungsaffinität wie die in den Vorversuchen untersuchte DBL2 β -Domäne ($p = 0,85$ bei $n = 7$ bzw. 4; t-Test). Selbiges ergab sich nach einer statistischen Auswertung unter Verwendung des t-Tests für die Domäne 14 (DBL1 α), da sich das dort erhaltene Signal nicht signifikant von denen der DBL2 β - und der DBL4 β C2-Domäne unterschied ($p = 0,89$ bei $n = 7$ bzw. 2).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Einsatz der Schwingquarzsensoren die Zytoadhäsion später Blutstadien von *Plasmodium falciparum* sowie die Bindungsfähigkeit einzelner PfEMP1-Domänen an die Rezeptoren CD36, CSA und ICAM-1 untersucht. Dabei wurden erstmals zeitnahe (on-line) Untersuchungen dieser Vorgänge durchgeführt und ein direkter Nachweis der Bindung erbracht, was mit den bisherigen Standardmethoden nicht möglich ist. Die dabei erhaltenen und in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse werden nun in diesem Kapitel diskutiert.

Zunächst wird auf die Testmessungen bzgl. der PLL-Schicht eingegangen. Die hergestellten PLL-Schichten mussten auf ihre Bindungsfähigkeit geprüft werden. Dabei wurde erwartet, dass eine Bindung von Erythrozyten Frequenzabfälle von mehreren tausend Hertz liefert. Des Weiteren wurde geprüft, ob verschiedene Puffer oder Medien einen Einfluss auf die Ausbildung der Signale haben. Dabei zeigte sich, dass die Erwartungen größtenteils erfüllt werden konnten. Zumindest mit EDTA/Tris und dem zusatzfreien RPMI konnten Frequenzabfälle von 2000 bis 3000Hz erzielt werden. Das mit Zusätzen versetzte RPMI-Medium lieferte hingegen im Schnitt Frequenzabfälle von 500 bis 1000Hz. Die Erklärung für diesen gravierenden Unterschied ist, dass sich bei dem Einschwingvorgang des Quarzes bis zur Einleitung der Blutprobe bereits die in der Lösung vorliegenden Proteine auf dem Sensor anlagerten, was die Sensitivität des Quarzes herabsetzte. Die Variabilität der Ergebnisse ist auf die manuell durchgeführte Beschichtung der Quarze zurückzuführen, die die Ausbildung verschiedener Schichteigenschaften (Schichtdicke, Schermodul, etc.) zur Folge hatte. Eine Automatisierung des Verfahrens war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die geplanten Messungen konnten dennoch mit dieser Methode erfolgen, die genannte Variabilität muss jedoch berücksichtigt werden.

Die Entwicklung eines Zytoadhäsionsassays für *Plasmodium falciparum* mit Schwingquarzen stellte eine große Herausforderung dar, da bei den bisher etablierten Methoden zur Untersuchung von Zytoadhäsionsvorgängen große adhärente Zellen untersucht wurden [126]. Diese besitzen zum einen eine größere Masse als die in dieser Arbeit untersuchten Zellen und adhären großflächig, d.h. die Adhäsionsmoleküle sind in großen Mengen auf der Membran vorhanden und können mit einer großen Fläche interagieren. Bei den hier untersuchten

infizierten Erythrozyten wird das Adhäsionsmolekül PfEMP1 allerdings nur punktförmig in den „knobs“ nach außen präsentiert und großflächige Bindungen kommen nicht zustande.

Im Falle der Untersuchung der Adhäsion von infizierten Erythrozyten an CD36 werden, wie bereits in den Kapiteln 1.3 und 2.1.2 beschrieben wurde, zumeist CD36-exprimierende Zellen oder aufgereinigtes CD36 verwendet [42, 72, 75, 92, 102]. In der vorliegenden Arbeit wurden keine aufgereinigten oder rekombinant hergestellten Proteine verwendet, da diese meist mit verschiedenen Tags versehen sind, welche einen Einfluss auf die Immobilisierung auf den Sensor oder auf die Bindung der parasitierten Zellen haben könnten. Auch sind mögliche Konformationsänderungen des Proteins nicht auszuschließen, da es sich bei CD36 um ein Transmembranprotein handelt, welches seine charakteristische Struktur mit 2 Loops über die hydrophobe Region (vgl. Abbildung 15), die mit der Zellmembran interagiert, ausbildet. Da bekannt ist, dass die Konformation des Proteins ausschlaggebend für die Bindung infizierter Zellen ist [52], wurde dieser Rezeptor in einer möglichst natürlichen Umgebung auf dem Sensor immobilisiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass eine stabile Schicht zustande kam, welche die Eindringtiefe des Sensors nicht übersteigt und somit eine Detektion der Bindung von iRBCs ermöglicht. Eine Immobilisierung von intakten CD36-exprimierenden Zellen war nicht möglich, da hierbei die Eindringtiefe des Quarzes nicht ausreichend wäre, um eine Bindung von iRBCs an jene Zellen zu erkennen. Daher wurden Membranen von CD36-tragenden Zellen über elektrostatische Wechselwirkungen an das polykationische Poly-L-Lysin gebunden. Dazu wurden die häufig eingesetzten C32-Zellen verwendet. Der Vorteil dieser Zellen im Vergleich zu anderen Zelllinien wie U937 (myelomonozytisch) ist jener, dass eine Stimulation zur Expression des Proteins nicht benötigt wird [42]. Zunächst wurde allerdings geprüft, wie stark das Protein in der Membran dieser Zellen vertreten war. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 25 b und c dargestellt, dass CD36 homogen und großflächig über die Zellmembranen der C32-Zellen verteilt war. Die Membranen dieser Zellen wurden über eine Homogenisierung mit einer anschließenden fraktionellen Zentrifugation erhalten. Über weitere Homogenisierungsversuche mit Ultraschall, PBS-Tween bzw. Triton X-100 ergab sich, dass bei einer fünf- bis zehnminütigen Behandlung der Membranen mit Ultraschall oder PBS-Tween eine optimale Homogenisierung der Membranen erreicht werden konnte. Eine anschließende Untersuchung der Membranen bzgl. der Funktionsfähigkeit des CD36 zeigte, dass das Protein nach der Prozedur des Homogenisierens noch von einem spezifischen Antikörper detektiert werden konnte (Tafel 1 und Abbildung 28). Allerdings waren bei den mit PBS-Tween behandelten

Membranen die erhaltenen Fluoreszenzsignale etwas stärker. Vermutlich hatte die Behandlung mit Ultraschall einen negativen Einfluss auf das Protein, weswegen für weitere Versuche eine Behandlung der Membranen mit PBS-Tween für fünf Minuten etabliert wurde. Da das CD36 noch nachweisbar war, sollte eine Bindung der entsprechenden iRBCs möglich sein, was über eine externe Versuchsreihe bestätigt wurde (Tafel 2). Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Parasitenstämmen 3D7 und FCR3-CD36. Auffällig war allerdings bei den mit 3D7 infizierten Zellen das Auftreten länglicher Strukturen von etwa 1µm Länge, über welche die iRBCs sowohl miteinander als auch mit den Membranen der C32-Zellen verbunden waren. Möglicherweise handelte es sich dabei um artifizielle Erscheinungen, die bei der Fixierung entstanden, oder um aus einer Klebesubstanz gebildete Verbindungsstränge, die ebenfalls in Abbildung 7 dargestellt sind. Dort sind diese allerdings maximal 10nm lang. Daher ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei den in diesen Versuchen entdeckten Strukturen um dieselben handelte.

Eine unspezifische Bindung der iRBCs über die PLL-Basissschicht wurde in Frau Stefani Kleiners Arbeit [152] über verschiedene externe Blockierungsversuche bereits ausgeschlossen. Dabei konnte gezeigt werden, dass das verwendete 2%-ige BSA in PBS die unspezifischen Bindungsstellen ausreichend blockierte und eine Bindung der Zellen unterband (Tafel 2j).

Die Detektion der Bindung von iRBCs an CD36 wurde in der vorliegenden Arbeit mit zwei verschiedenen QCM-Messabläufen untersucht. Dabei handelte es sich um Kurzzeitmessungen mit höherer Zelldichte über nur wenige Stunden und um ein Kurzzeitmesssystem, bei dem die Fluidik einen geschlossenen Kreislauf bildete. Werden die verschiedenen Systeme miteinander verglichen, so zeigt sich, dass in beiden Fällen starke Signale erhalten wurden. Bei Verwendung des Systems mit der geschlossenen Fluidik ergaben sich die stärksten Signale, obwohl dort die Zellen mehr als zehnmals so schnell über den Sensor gepumpt wurden. Da in diesen Versuchen complete-Medium verwendet wurde, welches alle Zusätze beinhaltet, die auch in der Kultur vorlagen, ist es wahrscheinlich, dass die verwendeten Zellen in einem vitaleren Zustand vorlagen, welcher für die Zytoadhäsion förderlich war.

Mittels eines Langzeitaufbaus unter Verwendung eines mikrofluidischen Moduls wurden zusätzlich Zeitreihen unter dem Mikroskop durchgeführt, bei denen das Verhalten einzelner infizierter Zellen dokumentiert wurde. Der Aufbau entsprach dabei in etwa dem in Kapitel 1.3 erläuterten und in Abbildung 16 dargestellten „flow-based“ Assay [104]. Dabei wurde gezeigt, dass manche Zellen bereits sehr früh statisch an einer Membranstelle anhafteten, während andere zunächst ein initiales Rollen entlang der Membran zeigten und zu einem

späteren Zeitpunkt fest banden. Ähnliches wurde auch bei Untersuchungen des Zytoadhäsionsmechanismus von *P. falciparum* an CD36 bzw. ICAM-1 von Blutgefäßen menschlichen Hautgewebes beobachtet [154]. Dabei stellte sich heraus, dass etwa zwei Drittel der infizierten Zellen zunächst an den Blutgefäßen entlang rollten bevor sie letztlich arretierten. Die restlichen Zellen hingegen banden sofort an eine Stelle und verblieben dort. Da es bei diesem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuch allerdings nicht möglich war, den sensorischen Apparat, der die Messelektronik beinhaltet, unter dem Mikroskop anzubringen, existieren zu der Zeitreihe mikroskopischer Aufnahmen keine korrespondierenden Messsignale.

In der parallel zu der vorliegenden Arbeit durchgeführten medizinischen Doktorarbeit von Frau Stefani Kleiner [152], bei der ebenfalls die Zytoadhäsion an CD36 untersucht wurde, ist herausgekommen, dass neben der Bindung an CD36 eine Bindung an einen weiteren, bisher nicht bekannten Rezeptor stattfand. Ein entsprechender Inhibierungsversuch unter Verwendung eines gegen CD36 gerichteten Antikörpers zeigte keine vollständige Unterbindung der Zelladhäsion. Eine Interaktion der infizierten Zellen mit dem eingesetzten IgG-Antikörper ist nicht anzunehmen, da bisher lediglich Interaktionen mit IgM-Antikörpern bekannt sind. Dieser Sachverhalt muss über weitere Messreihen verifiziert werden, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich war.

Bei den von der Autorin verwendeten Messmethoden zur Untersuchung der Zytoadhäsion an CD36 konnte festgestellt werden, dass die mit den infizierten Zellen erhaltenen Signale signifikant höher waren als bei den entsprechenden Kontrollen mit nicht infizierten Zellen (Abbildung 36a), was auch durch die entsprechenden Mikroskopaufnahmen der Quarze bestätigt wurde (Abbildung 36b). Daher wird in dieser Arbeit operationell von spezifischer Bindung gesprochen, da diese bei gleichen vorherrschenden Bedingungen ausschließlich mit infizierten und nicht oder wesentlich schwächer mit uninfizierten Erythrozyten zustande kam. Diese Beobachtung wurde bei den CD36-bindenden Parasitenstämmen 3D7 (s. [152]) und FCR3-CD36 gleichermaßen gemacht, wobei auffiel, dass die mit FCR3-CD36 erhaltenen Signale etwas, jedoch nicht signifikant stärker waren als bei 3D7 ($p = 0,13$). Dies kann damit erklärt werden, dass es sich bei 3D7 um einen Parasitenstamm handelt, der bevorzugt an CD36, jedoch auch in großem Maß an weitere Rezeptoren bindet [58]. Bei den Parasiten des FCR3-CD36-Stammes hingegen erfolgten wiederholt Selektionen auf die Bindung an die C32-Zellen, wodurch diese Parasiten eine höhere Affinität für die dort vorkommenden Rezeptoren aufwiesen. Interessanterweise zeigten die ebenfalls zur Kontrolle vermessenen

Zellen des genetisch veränderten NF54 Stammes mit unterbundener Expression des CD36-bindenden PfEMP1 (NF54^{CD36-}) signifikant stärkere Signale als die uninfizierten Zellen. Selbiges konnte auch bei den ermittelten Zelldichten beobachtet werden. Dieses Resultat bestätigt somit die bereits oben ausgeführte und in [152] detailliert dargestellte These, dass die mittels Schwingquarz-Messungen detektierten Adhäsionen nicht ausschließlich an CD36, sondern an einen weiteren, auf den Melanomzellen vorkommenden Rezeptor erfolgten.

Wird jedoch davon ausgegangen, dass die ermittelten Adhäsionen an CD36 erfolgten, so widerspricht dies der Theorie dahingehend, dass bei diesem Parasitenstamm das CD36-bindende PfEMP1-Protein nicht mehr exprimiert wurde. Daher sollte eine Bindung dieser Zellen an CD36 nicht stattfinden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein bei knock-out-Parasiten, die keine „knobs“ mehr ausbilden konnten, beobachtetes, ähnliches Phänomen liefern. In dieser Versuchsreihe wurde ein Protein in der Membran identifiziert, das zwar Trypsin-sensitiv allerdings auch löslich in Triton X-100 war. Dies weicht von dem Charakter von PfEMP1 dahingehend ab, da dieses Protein, sobald es in die Membran eingebaut wird, nicht mehr in Triton X-100 gelöst werden kann [35, 38]. Das bedeutet möglicherweise, dass dort und bei den hier verwendeten NF54^{CD36-}-Zellen die beobachtete Bindung nicht von PfEMP1, sondern von einem anderen adhäsiven Protein vermittelt wurde. Dies ist sehr gut möglich, da man heutzutage weiß (wie in Tabelle 2 dargestellt), dass CD36 nicht allein durch PfEMP1, sondern auch durch Pflhesin, CLAG (cytoadherence-linked asexual gene protein) und Band3 sowie möglicherweise auch durch Sequestrin gebunden wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass nicht alle CD36-bindenden CIDR1 α -Domänen ausgeschaltet waren und somit noch Potential zur CD36-Bindung über PfEMP1 vorlag.

Dieses unerwartete Verhalten unterlag zudem einer zeitlichen Dynamik, wie auch in dargestellt ist. Dort ist zu entnehmen, dass diese Zellen des NF54^{CD36-}-Stammes im Vergleich zu den selektierten FCR3-CD36-Zellen zu Beginn der Versuchsreihe kaum an den Sensor und die darauf immobilisierten C32-Membranen banden. Dies zeigte sich sowohl in den Frequenzänderungen der Schwingquarze als auch in den entsprechenden Mikroskopaufnahmen. Dieses Verhalten kehrte sich im Lauf der Zeit allmählich um, sodass bei den letzten Messungen, die nur wenige Wochen nach den ersten Messungen durchgeführt wurden, die zur Bindung an CD36 unfähigen Zellen stärker an die C32-Membranen banden als die selektierten infizierten Zellen. Der Unterschied zwischen den Parasitenstämmen war hinsichtlich des Frequenzabfalls und der ermittelten Zelldichte jedoch nicht signifikant ($p = 0,23$ bzw. $p = 0,13$). Eine Erklärung für die Zunahme der Affinität für die Bindung an die C32-Membranen über den Zeitraum von wenigen Wochen konnte noch nicht gefunden

werden, da die in den Messungen verwendeten Zellen nicht wieder in Kultur genommen wurden, und somit keine mögliche Selektion stattfand. Ob es im Laufe der Zeit zum Umschalten auf eine andere, affinere PfEMP1-Variante kam, oder ob andere Proteine die Bindung vermittelten, wird von Frau Corinna Enderes (Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen) über eine PCR-Analyse untersucht. Weiterhin ist zu bedenken, dass diese Parasiten bereits seit mehreren Jahren bzw. Jahrzehnten in Kultur gehalten werden. Verglichen mit Patientenisolaten unterliegen diese Zellen daher keinem ausgeprägten Selektionsdruck, der eine Bindung an das Endothel für die Parasiten notwendig machen würde.

Die in Abbildung 36a erhaltenen Fehlerbalken sind dadurch zu erklären, dass die mittels Schwingquarzen erhaltenen Signale abhängig von den unterschiedlichen Eigenschaften der Basisschicht teilweise stark schwankten. Mit der bereits diskutierten manuellen Beschichtungsmethodik konnte eine besser reproduzierbare und gleichgestaltete Beschichtung der Quarze bislang nicht realisiert werden, das Problem ist jedoch in Bearbeitung. Da diese Schwankungen bei allen Proben gleichermaßen auftraten, kann aus den hierbei erzielten Ergebnissen dennoch entnommen werden, dass eine Detektion der spezifischen Bindung von 3D7- bzw. FCR3-CD36-infizierten Zellen an die verwendeten C32-Membranen möglich war.

In den folgenden Abschnitten werden nun die Ergebnisse diskutiert, die hinsichtlich der Zytoadhäsion von CSA-bindenden infizierten Zellen erhalten wurden. Wie bereits in dem Kapitel 2.2.3.4 beschrieben, wurden zur Immobilisierung von CSA Beschichtungssysteme entwickelt, die zunächst getrennt voneinander betrachtet werden. Bei der ersten Methode wurde eine biotinylierte Variante des Rezeptors über NeutrAvidin auf dem Sensor immobilisiert. Die Homogenität der Beschichtung wurde mittels eines IFT überprüft und es wurde gezeigt, dass dort die Oberfläche des Sensors homogen und großflächig mit dem Rezeptor beschichtet war (s. Abbildung 29).

In externen Versuchen wurde zunächst getestet, ob die zu untersuchenden, mit FCR3-CSA infizierten Zellen an den biotinylierten Rezeptor banden. Dabei zeigte sich, dass sowohl die nicht infizierten Zellen, als auch die infizierten Zellen auf dem Sensor hafteten. Um zu prüfen, ob eine Unterbindung solcher unspezifischer Bindungsphänomene mit einer 2%-igen BSA-Lösung erreicht werden konnte, wurden Schwingquarz-Messungen durchgeführt. Durch den Einsatz der Blockierungslösung kam schließlich keine Bindung mehr zustande. Im Gegenteil ergab sich ein leichter Frequenzanstieg (Abbildung 37). Solche Anstiege können zum einen durch Viskositätseffekte, die beim Übergang von dem Medium zur Zellsuspension auftreten,

als auch durch eine mögliche Quellung der Schicht verursacht werden. Eine dadurch bedingte erhöhte Viskosität ist mit einem sog. „missing-mass-Effekt“ verbunden [155]. Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen ist, dass das CSA aufgrund der Biotinylierung flach und nicht als lange aufrechte Ketten auf dem Sensor vorlag. Daher könnte der Rezeptor durch das zusätzlich aufgebraute BSA teilweise überdeckt worden sein, wodurch das von den infizierten Zellen nach außen präsentierte PfEMP1 nicht mehr in Kontakt mit dem bCSA gelangen konnte. Bei der Verwendung unblockierter Quarze konnten hingegen Signale erhalten werden, die allerdings recht schwach ausgebildet waren. Zudem wurde dort, ähnlich dem extern durchgeführten Vorversuch, gezeigt, dass nicht infizierte Zellen ebenfalls an die beschichteten Sensoren anhafteten. Das dabei erhaltene Signal war im Schnitt etwa ein Drittel so stark wie jenes der infizierten Zellen (vgl. Abbildung 40), was allerdings nicht mit den Mikroskopaufnahmen der entsprechenden Quarze korrelierte. Wie bei dem entsprechenden extern durchgeführten Vorversuch war die Zahl gebundener Kontrollzellen nicht signifikant verschieden von jenen Zellen, die mit Parasiten des FCR3-CSA-Stammes infiziert waren ($p = 0,63$).

Die mit diesem Schichtsystem erhaltenen Ergebnisse wurden daher zumindest teilweise durch unspezifische Wechselwirkungen erzielt, wie an den Messungen mit uninfizierten Zellen erkannt werden kann. Die Tendenz einer stärkeren Bindung durch die infizierten Zellen war dennoch vorhanden. Für die Gewinnung möglicher deutlicherer Signale wurde daher das in der Standardmethode gängige Schichtsystem einer mit CSA beschichteten Polystyrol-Platte auf den Quarz übertragen. Diese Variante stellte eine gute Alternative zur Vermessung von Kontrollsubstanzen dar, da diese im Gegensatz zur Beschichtung mit NAV nicht biotinyliert werden mussten. Eine Untersuchung der Homogenität der Schicht (Abbildung 30) ergab allerdings, dass das über Polystyrol gekoppelte CSA in unregelmäßigen Clustern auf der Sensoroberfläche vorlag. Die dabei entstandene Schicht war damit rauer als die des biotinylierten CSA, wodurch sich möglicherweise die Zugänglichkeit des Rezeptors für die infizierten Zellen verbesserte. Wie bei den bereits beschriebenen Beschichtungssystemen wurde hier ebenfalls extern geprüft, ob an diese raue und ungleichmäßige Beschichtung infizierte Zellen gebunden werden konnten. Dabei zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei dem zuvor verwendeten biotinylierten CSA, d.h. die nicht infizierten Kontrollzellen wurden in großer Anzahl gebunden (Abbildung 33c). Bei den Messungen in der Sensorplattform wurde daher untersucht, ob diese unspezifischen Interaktionen durch eine vorherige Blockierung mit 2% BSA in PBS unterbunden werden konnten. Bei nicht infizierten Zellen erfolgte dabei eine Reduktion des Sensorsignals annähernd auf ein Siebtel und bei infizierten Zellen auf die

Hälfte (Abbildung 38). Nach Anfärben der entsprechenden Quarze konnte dies jedoch nicht bestätigt werden, da dort auf den blockierten Sensoren mit etwa 20.500 bzw. 59.000 Zellen (bei nicht infizierten bzw. infizierten Erythrozyten) mehr Zellen nachgewiesen werden konnten als auf unblockierten Quarzen (0 bzw. 46.200 Zellen). In Bezug auf die infizierten Zellen könnte dies durch die weit fortgeschrittene Entwicklung der Parasiten erklärt werden, da auf den unblockierten Quarzen am Ende der Messung großteils nur noch Hämozoinreste vorlagen. Bei der Probe auf den blockierten Quarzen wurden hingegen im Blutaussstrich noch intakte Zellen nachgewiesen. Im Schnitt war bei der mikroskopischen Untersuchung der gebundenen Zellen auf den Sensoren jedoch keine signifikante Reduktion erkennbar ($p = 0,97$ bei nicht infizierten Zellen, $p = 1$ bei infizierten Zellen).

Da unspezifische Bindungsereignisse in der Schwingquarz-Messanlage über BSA zumindest vermindert werden konnten, wurden bei weiteren Messungen blockierte Quarze verwendet, da hier mit infizierten Zellen eine stärkere Bindung erhalten wurde als bei der Kontrolle.

Selbiges wurde auch mit Kurzzeitmessungen bei höherer Zelldichte bestätigt, wobei über die verkürzte Messzeit stärkere Signale erhalten wurden. Auch dort konnte die Probe infizierter Zellen von der entsprechenden Kontrolle eindeutig unterschieden werden, da die Kontrollen keine oder nur sehr geringe Frequenzabfälle verursachten, wogegen die infizierten Zellen Signale von mehreren hundert Hertz ergaben (vgl. auch Abbildung 39). Allerdings fiel bei diesem System auf, dass auf den Sensoren erneut mit durchschnittlich etwa 25.700 Zellen einige nicht infizierte Zellen vorlagen, was das Signal des empfindlichen Sensors jedoch nicht beeinflusste. Eine solche lockere, nicht frequenzwirksame Bindung dürfte vermutlich über elektrostatische Wechselwirkungen an freien Polystyrolstellen zustande gekommen sein. Die hierbei erhaltenen Quarzaufnahmen entsprachen somit jenen des externen Vorversuches.

Um bei beiden Schichtsystemen dennoch mögliche unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Im Falle der Basisschicht NeutrAvidin wurde getestet, ob an das reine Protein Zellen gebunden werden können. Wie in Abbildung 40 dargestellt ist, wurden durchaus Signale und Zelldichten erhalten, die sich nicht signifikant von jenen unterschieden, die bei entsprechenden Messungen auf bCSA-belegten Sensoren erhalten wurden (s. Tabelle 6). Da jedoch **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** in Abbildung 29 bereits gezeigt wurde, dass der biotinylierte Rezeptor großflächig auf dem Sensor vorlag und keine bis sehr wenige restliche Bindungsstellen des NeutrAvidin vorhanden waren, kann eine unspezifische Interaktion über die Basisschicht ausgeschlossen werden. Bei Verwendung von biotinyliertem BSA kamen ebenfalls Signale zustande, die keine signifikanten Unterschiede zu jenen bei Verwendung des eigentlich

spezifischen Rezeptors aufwiesen (s. Tabelle 6). Dies wurde auch erneut bei der statistischen Bewertung der Belegung der Sensoroberfläche mit Zellen bestätigt. Daraus kann geschlossen werden, dass die parasitierten Zellen entweder unspezifisch mit dem Biotin der verschiedenen Analyten interagierten, oder dass das biotinylierte CSA von diesen Zellen nicht mehr gebunden werden konnte. Zwar wurde der Zucker an der Aldehydgruppe biotinyliert, da diese jedoch benachbart zu der für die Bindung essentielle Schwefel-Gruppe liegt (vgl. Abbildung 14), könnte es sein, dass sich diese nach der Bindung an das NeutrAvidin räumlich in einer ungünstigen Lage befand und somit den Zellen nicht mehr optimal präsentiert werden konnte. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen wurde in einer Studie von Avril et al. 2006 gezeigt, dass biotinyliertes CSA von den PfEMP1-Domänen DBL2 und DBL6 des Parasitenstammes 3D7 gebunden wurde [156]. Somit könnte eine weitere Erklärung für das Ausbleiben spezifischer Signale sein, dass das CSA-bindende PfEMP1 des FCR3-CSA-Stammes, welches von dem Gen *var1* kodiert wird, im Gegensatz zu dem *var2*-kodierten PfEMP1 des 3D7-Stammes die biotinylierte Variante des CSA nicht binden konnte. Dies würde mit bisher bestehenden Vermutungen übereinstimmen, wonach angenommen wird, dass eine CSA-spezifische Bindung hauptsächlich von *var2*CSA-kodierten PfEMP1-Molekülen vermittelt wird [62, 78].

Im Falle der Basisschicht mit Polystyrol wurde diese zunächst mit Glucose, an welches die Zellen nicht binden sollten, auf dieselbe Art und Weise wie mit CSA beschichtet. Die dort erhaltenen Signale unterschieden sich nicht signifikant von dem Mittel der mit CSA erhaltenen Messsignale (s. Tabelle 5). Daher wurde überprüft, ob bei einer Beschichtung mit CSA eine Bindung unterbunden werden konnte, indem die Quarze mit einem gegen das CSA gerichteten Antikörper inkubiert wurden. Dabei sollten die spezifischen Bindungsstellen abgedeckt sein. Eine leichte, jedoch nicht signifikante Verminderung des Signals konnte bei infizierten Zellen erreicht werden, jedoch nicht bei der Kontrolle (s. Tabelle 6). Daraus konnte abgeleitet werden, dass die bei Verwendung der Basisschicht aus Polystyrol festgestellten Bindungen auf unspezifischen Interaktionen mit derselben zustande kamen. Dies wurde bei weiteren Kontrollmessungen bestätigt, die ergaben, dass sich die Signale bei einer Schicht mit CSA ebenfalls nicht signifikant von jenen einer reinen Polystyrolschicht unterschieden (s. Tabelle 6). Diese Analysen zeigten somit, dass die mit diesem Schichtsystem erhaltenen Signale und Zelldichten, ebenso wie bei der zuvor verwendeten Schicht aus NeutrAvidin und bCSA, auf unspezifischen Wechselwirkungen beruhten.

Da diese Schicht jedoch auf einem Standardprotokoll für die Untersuchung der Zytoadhäsion in der Malariaforschung basierte, wurde diese im Anschluss an diese QCM-Messungen

überprüft, wie in Tabelle 8 und Abbildung 43 dargestellt ist. Dabei wurde getestet, ob durch Blockierungsschritte mit BSA bzw. mit Adhäsionsmedium, welches 10% Serum enthielt, unspezifische Bindungen vermieden werden konnten. Unter Verwendung der Parasitenkulturen mit einer vorliegenden Parasitämie von etwa 4% konnte festgestellt werden, dass bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Selektierung nur wenige Zellen gebunden hatten. Wurden allerdings die verschiedenen Blockierungsversuche von Polystyrol mit Adhäsionsmedium oder 2% BSA in PBS betrachtet, so ergab sich, dass dort im Gegensatz zu bisherigen Studien [157] unabhängig von der Blockierungslösung einige gebundene Zellen dokumentiert werden konnten, die dennoch in geringerer Anzahl vorkamen als bei den wells mit CSA. Dabei handelte es sich allerdings nicht ausschließlich um infizierte sondern auch um kontaminierende uninfizierte Zellen. Letztere lagen stets in großem Umfang vor. Wurden die Plastik-wells vor der Zugabe der Zellen nicht blockiert, konnten ebenfalls adhärenierte Zellen festgestellt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei dieser in der Malariaforschung verwendeten Standardmethode häufig unspezifische Bindungsereignisse an unblockiertes oder ungenügend blockiertes Polystyrol erfasst werden. Da die Anzahl der nachgewiesenen, gebundenen Zellen zudem von der Intensität der manuell durchgeführten Waschschrte abhängt, fällt diese je nach Operator unterschiedlich aus. Weiterhin war auffällig, dass in einigen der untersuchten wells neben nicht infizierten Zellen und späten Blutstadien auch teilweise Ringstadien nachgewiesen werden konnten. Dieses ungewöhnliche Phänomen wurde für FCR3-CSA bei Zytoadhäsionsassays auf Gehirn-Endothelzellen von Totenkopf-Affen (*Saimiri sp.*) bzw. in Plazenten infizierter schwangerer Frauen beobachtet [64, 84]. Weiterhin wurde in einer Studie von Silamut et al. bei post-mortem-Untersuchungen von an zerebraler Malaria verstorbenen Patienten festgestellt, dass im Gehirn verhältnismäßig mehr angehaftete junge Blutstadien vorkamen als im freien Blutstrom. Daher wurde dort vermutet, dass sich das Phänomen der Sequestrierung infizierter Zellen in verschiedenen Organen unterschiedlich manifestiert [158]. Dies kann dadurch bestätigt werden, dass ein entsprechendes Verhalten der Ringstadien bzgl. der Bindung an den Hauptrezeptor CD36 und ICAM-1 bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte [64]. Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch nicht verstanden, eine Bindung über PfEMP1 kann allerdings ausgeschlossen werden, da die frühen Ringstadien dieses Protein noch nicht in ihrer Membran verankert haben.

Bei den bis dahin hinsichtlich der CSA-Bindung verwendeten Beschichtungen konnte somit nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Bindungsereignissen um unspezifische Interaktionen mit den Basisschichten handelte. Daher wurden mit der dritten

Immobilisierungsmethode von CSA via Poly-L-Lysin Messungen mit einer geschlossenen Fluidik unter Verwendung des RPMI-complete-Mediums durchgeführt. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin erfolgte dabei extern, die Belegung mit CSA jedoch in der Sensorplattform. Dabei verursachte die Bindung des CSA an die polykationische Basisschicht zunächst Frequenzabfälle aufgrund der gebundenen Masse (Abbildung 31) und bedeckte nahezu 100% der Quarzoberfläche (s. auch Abbildung 32). Die Verteilung des Rezeptors war bei diesem System wieder homogen und großflächig. Bei den später durchgeführten Messungen mit infizierten Zellen stellte sich jedoch ein von den Testmessungen abweichendes Schwingquarzverhalten dar, da dort bei der Bindung von CSA kein Abfall, sondern ein Anstieg der Resonanzfrequenz zustande kam. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist erneut der bereits erwähnte „missing-mass-Effekt“, der auftritt wenn die immobilisierte Quarzschicht ursprünglich stark viskoelastisch ist und durch die Bindung eines Liganden (z.B. in Art einer Vernetzung) rigider wird. Ursache der diskrepanten Ergebnisse ist dabei letztlich die aufgrund manueller Beschichtung unvermeidbare Variabilität der Eigenschaften der Basisschicht PLL. Dieser Effekt kam in diesem Falle dadurch zustande, dass die in diesen Versuchen hergestellten PLL-Schichten aus bisher unbekanntem Gründen möglicherweise dicker und somit weniger rigid waren als bei den Messungen zuvor. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Basisschicht durch das gebundene CSA Konformationsänderungen erfuhr, was somit die Viskoelastizität der Schicht veränderte und das Frequenzsignal des Sensors entsprechend beeinflusste [155, 159].

Eine Detektion der Bindung infizierter Zellen konnte dennoch erfolgen (vgl. Abbildung 42). Unspezifische Signale konnten dabei ausgeschlossen werden, da die Basisschicht nicht infizierte Zellen in demselben Maße binden würde wie infizierte Zellen. Dies war bei diesem System allerdings nicht der Fall. Hierbei wurde reproduzierbar nachgewiesen, dass infizierte Zellen stets einen Frequenzabfall, die entsprechenden Kontrollzellen jedoch einen Frequenzanstieg verursachten. Dies zeigte sich ebenfalls reproduzierbar in der Belegung der Quarze, da die Zelldichte bei infizierten Zellen mit 154.000 Zellen/Quarz signifikant höher war als bei nicht infizierten Zellen (19.700 Zellen/Quarz). Somit können für dieses Schichtsystem unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden, was wiederum bedeutet, dass die mit infizierten Zellen erhaltenen SchwingquarzsSignale auf spezifischen Interaktionen zwischen den Zellen und dem Rezeptor CSA basierten.

Unabhängig von dem Messablauf und von dem jeweils untersuchten Rezeptor konnten in einigen Fällen große Zellaggregate, bestehend aus vielen infizierten Zellen und wenigen nicht-infizierten Zellen beobachtet werden. Eine ausschließliche Rosettenbildung kam dabei

nicht zustande, da es sich bei den verwendeten Zellen um über Magnetzellseparation aufgereinigte infizierte Zellen handelte. Daher werden diese Ansammlungen von Zellen als Autoagglutinate bzw. aufgrund der Beteiligung einzelner nicht infizierter Zellen als große Rosetten bezeichnet [30]. Da bei den CSA-bindenden Zellen allerdings ungewöhnlich große Zellverbände ausgebildet wurden, könnte es sich hierbei auch um Makroaggregate handeln, welche bisher bei NCAM-bindenden Parasiten beobachtet wurden. Dabei wird angenommen, dass die Verknüpfungen zwischen den Zellen durch veränderte Ligandkonformationen oder weitere exprimierte parasitäre Proteine ausgebildet werden [51]. Derartige Zellverbände wurden bisher noch nicht in vivo nachgewiesen. Bekannt ist jedoch, dass Isolate aus Patienten mit einer ausgebildeten ersten Malaria verstärkt zur Ausbildung solcher Zellansammlungen fähig sind [160].

Weiterhin konnte die Bindung der Zellen an die Rezeptoren der C32-Membranen und an CSA eindeutig festgestellt werden. Die dabei entwickelten Schichtsysteme PLL/C32-Membranen für die CD36- und PLL/CSA für die CSA-Immobilisierung lieferten spezifische Signale, da die mit infizierten Zellen erhaltenen Frequenzabfälle stärker ausfielen als bei den entsprechenden Kontrollen mit nicht infizierten Zellen (vgl. Abbildung 42b). Bei dem Schichtsystem mit PLL/C32-Membranen traten bei den Kontrollen zwar Frequenzabfälle auf, die allerdings signifikant geringer waren als jene, die mit infizierten Zellen erhalten wurden. Da weiterhin die Quarzbelegung mit Zellen nach den Messungen bei den Kontrollen mit einer Zelldichte von etwa 6.500 Zellen/Quarz signifikant geringer ausfiel als bei parasitierten Zellen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den dort resultierten Frequenzabfällen um reine Viskositätseffekte handelte. Bei den entsprechenden Untersuchungen mit PLL/CSA-beschichteten Quarzen fiel der Unterschied deutlicher aus, da dort bei den Kontrollen Frequenzanstiege erhalten wurden. Allen Messungen war zudem gemein, dass bei den Proben mit infizierten Zellen nach einer gewissen Zeit eine Sättigung auftrat, was sich darin äußerte, dass nach einem zunächst stattfindenden steilen Frequenzabfall das Signal in einer geringeren Intensität driftete. Diese Driften kamen dadurch zustande, dass sowohl ungebundene Zellen aus der Messkammer gewaschen, dennoch stets neue Zellen zugeführt wurden. Da es sich bei den hier verwendeten Zellsuspensionen nicht um Lösungen mit statischer Dichte und Viskosität handelte und sich über die Zeit auch Zellen im Probengefäß absetzten, nahm der Sensor die veränderten Dichte- und Viskositätszustände der Lösungen wahr. Diese Driften blieben bei den Versuchen mit geschlossener Fluidik aus, da dort das gesamte Probenvolumen mit höheren Geschwindigkeiten wiederholt über den Sensor geleitet wurde. Durch die höheren Flussraten blieben die Zellsuspensionen homogener

vermischt, wodurch starke Dichte- und Viskositätsunterschiede vermindert wurden. Die ebenfalls bei diesen Ergebnissen erhaltenen Fehlerbalken sind auf dieselben Ursachen zurückzuführen wie bei den Messungen zur Bindung von Erythrozyten auf PLL. Aufgrund der manuell hergestellten PLL-Schichten lagen stets Unterschiede in den Schichteigenschaften vor, was sich erneut in der Stärke des ausgebildeten Signals äußerte. Da diese Unterschiede allerdings bei den Kontrollen ebenso stark auftraten wie bei den adäquaten Proben mit infizierten Zellen, kann dennoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Signalen um spezifische Detektionen der Adhäsion infizierter Zellen an die entsprechenden Schichten handelt.

Worin jedoch ein Unterschied zwischen den Rezeptoren festgestellt werden konnte, war die relative Stärke der Bindung infizierter Zellen an diese Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass bei Versuchen mit CD36 bzw. mit C32-Membranen signifikant stärkere Änderungen der Quarzsignale erhalten werden konnten als mit CSA ($p=0,00$). Dies mag darin begründet sein, dass es sich bei CD36 um den Hauptrezeptor für die Sequestrierung handelt, der im Gegensatz zu CSA von nahezu allen Feldisolaten gebunden wird [3, 161]. Auch ist es möglich, dass die infizierten Zellen eine starke Bindung aufgrund der unnatürlichen Form des CSA aus der Rindertrachea nicht aufbauen können. Es ist bekannt, dass es strukturelle Unterschiede zwischen dem CSA des Rindes und dem CSA aus der menschlichen Plazenta gibt [95]. Möglicherweise könnten bei Verwendung von rekombinant hergestelltem Thrombomodulin [91], dessen Seitenkette natürlicherweise CSA ist, oder von aus der Plazenta aufgereinigtem CSA stärkere Signale erhalten werden. Weiterhin ist zu bedenken, dass die verwendeten Laborstämme nicht in den Maßen einem Selektionsdruck ausgesetzt sind wie Parasiten aus Patientenisolaten. Es ist bekannt, dass Isolate aus der Plazenta ein stärkeres Bindungsverhalten hinsichtlich CSA aufweisen als Laborstämme [95].

Um die Versuche zur Zytoadhäsion auf CSA abzuschließen und mögliche Effekte durch morphologische Veränderungen, die während der Zellkultur auftreten könnten, auszuschließen, wurden weitere Kontrollversuche mit allen in dieser Arbeit entwickelten Schichtsystemen durchgeführt. Dazu wurde das stets als Kontrolle verwendete Erythrozytenkonzentrat aus dem Kühlschrank mit Erythrozytenkonzentrat, welches in derselben Weise kultiviert wurde wie die Parasitenkulturen, verglichen. Weiterhin wurden verschiedene Puffer bzw. Medien bzgl. deren Fähigkeiten zur Unterbindung unspezifischer Bindungsereignisse getestet. Im Hinblick auf das Verhalten der unterschiedlich gehaltenen Zellen zeigte sich, dass diese trotz häufig stark voneinander abweichender Signalstärken bei

den verschiedenen Schicht- und Lösungskombinationen häufig ähnliche Tendenzen hinsichtlich einer Bindung oder Nichtbindung zeigten. Es wurden dennoch Abweichungen festgestellt, aus denen allerdings nicht gefolgert werden kann, dass eine Zellvariante stärker zu Ausbildungen unspezifischer Signale neigte als die jeweils andere. Hinsichtlich der verschiedenen Kombinationen aus Schichtsystem und Lösung ergab sich, dass bei Verwendung des RPMI-complete-Mediums, welches Serumzusätze enthielt, der Großteil unspezifischer Signale unterbunden werden konnte. Wie auch mit den zuvor durchgeführten Schwingquarzmessungen dargestellt wurde, wurden auf Schichten bestehend aus Poly-L-Lysin und CSA die geringsten unspezifischen Signale erhalten. Ebenso wurde bestätigt, dass bei den in der Malariaforschung bisher angewandten Schichtsystemen aus NeutrAvidin mit bCSA und Polystyrol mit CSA häufig unspezifische Interaktionen zustande kamen.

Zusätzlich zur Untersuchung der Adhäsion infizierter Zellen an die Rezeptoren CD36 und CSA wurde durch die Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sabine Predehl des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg getestet, ob eine Detektion der Bindung einzelner PfEMP1-Domänen an die Rezeptoren CD36 und ICAM-1 mittels Schwingquarzen möglich ist. In ersten Vorversuchen wurden dazu die Domänen DBL1 α (Nummer 20), DBL2 β C2 (Nummer 24) und CIDR1 α (Nummer 21) verwendet. Dabei zeigte sich, dass im Falle von CD36 dieser Rezeptor eindeutig von der CIDR1 α -Domäne und nicht von den DBL-Domänen gebunden wurde (s. Abbildung 45a). Dies stimmte mit den bisherigen Kenntnissen überein, wonach CD36 zumindest beim Parasitenstamm 3D7 von mindestens 62% der kodierten PfEMP1s über die CIDR1 α -Domäne gebunden wird [43]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass ICAM-1 eindeutig von der in diesen Vorversuchen eingesetzten DBL2 β C2-Domäne gebunden wurde. Die anderen Domänen CIDR1 α und DBL1 α zeigten dagegen keine Bindung (s. Abbildung 45b). Auch dies stimmte mit der Literatur überein, in der berichtet wird, dass ICAM-1 ausschließlich von DBL2 β -Domänen gebunden wird, die zusammen mit der Interdomäne C2 vorliegen [6, 34, 43]. Da sich hiermit beweisen ließ, dass mit der in diesem Bereich neuartigen Schwingquarzsensoren bestehende Kenntnisse bestätigt werden konnten, wurden die Untersuchungen hinsichtlich der ICAM-1-Bindung ausgeweitet. Dazu wurden verschiedene DBL β -Domänen untersucht, die entweder mit oder ohne eine assoziierte C2-Domäne vorlagen. Weiterhin wurden verschiedene DBL1 α -Domänen und zusätzlich eine DBL1 ϵ -Domäne auf deren Bindungsfähigkeit auf ICAM-1 untersucht. Dabei konnte erstaunlicherweise festgestellt werden, dass neben der bereits untersuchten DBL2 β -Domäne lediglich eine DBL4 β C2- und eine weitere DBL2 β C2-Domäne zur Bindung an ICAM-1 fähig

waren (vgl. Abbildung 46). Dabei erwies sich die in Assoziation mit einer C2-Domäne vorliegende DBL2 β -Domäne als stärkster Binder, d.h. mit dieser Domäne wurden die stärksten Frequenzabfälle von durchschnittlich etwa 200Hz erhalten. Der dabei auftretende Fehlerbalken kommt dadurch zustande, dass mit dieser Domäne konzentrationsabhängige Versuche von 25 μ g/ml bis zu 1mg/ml durchgeführt wurden. Dabei waren die bei geringeren Konzentrationen erhaltenen Frequenzabfälle weniger stark ausgeprägt als bei höheren Konzentrationen. In allen Fällen konnte jedoch eine Bindung nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der mit einer Konzentration von 1mg/ml erzielten Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die bei dieser Domäne erhaltenen Frequenzabfälle signifikant stärker waren als bei den anderen bindenden Domänen. Diese Erkenntnis bestätigte erneut die bisherigen Annahmen, dass ICAM-1 von einer solchen Domäne gebunden wird. Die dort vorliegende C2-Domäne ermöglichte dabei die Bindung an den Rezeptor, da bei der entsprechenden Domäne ohne C2-Domäne keine Bindungsereignisse verzeichnet werden konnten. Neu war bei diesen Untersuchungen allerdings, dass daneben eine DBL4 β C2-Domäne ebenfalls an ICAM-1 binden konnte, das entsprechende Pendant ohne C2-Domäne war ebenfalls nicht zur Bindung fähig. Die damit erhaltenen Signale waren allerdings signifikant geringer als bei der entsprechenden DBL2 β C2-Domäne, entsprachen jedoch in etwa den Affinitäten wie sie bei der bereits in den Vorversuchen verwendeten DBL2 β -Domäne beobachtet wurden. Ein Einfluss des Gewichts der Domänen kann dabei ausgeschlossen werden, da der Unterschied von 30kDa zu 24kDa nicht sehr groß ist. Ein weiteres unerwartetes Ergebnis ergab sich bei der mit der Nummer 14 gekennzeichneten DBL1 α -Domäne, da diese unerwartet ebenfalls leichte Frequenzabfälle verursachte. Da sich das hierbei erhaltene Signal nicht signifikant von denen der mit der Nummer 24 gekennzeichneten DBL2 β - und der DBL4 β C2-Domäne unterschied, kann angenommen werden, dass es sich hierbei um ein spezifisches Bindungssignal handelte. Da die Anzahl der durchgeführten Messungen mit n=2 allerdings sehr gering war, könnte es sich dennoch um ein Artefakt handeln, welches über weitere ausgedehnte Messreihen überprüft werden kann. Die zusätzlich untersuchte DBL1 ϵ -Domäne zeigte dagegen keine Bindung an ICAM-1.

Abschließend kann also festgestellt werden, dass eine Detektion der Bindung von Rezeptoren durch PfEMP1 auch auf der Proteinebene möglich ist, wobei festgestellt werden konnte, dass die Bindungsfähigkeit der verwendeten DBL β -Domänen erst durch das Vorhandensein einer C2-Domäne ermöglicht wurde, und dass, abweichend von den bisherigen Kenntnissen, nicht ausschließlich DBL2 β -Domänen zur Bindung an ICAM-1 fähig sind.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Zielvorgabe der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines auf der Methodik der Schwingquarzsensoren basierenden Zytoadhäsionsassays für Erythrozyten, die mit späten Blutstadien des einzelligen Parasiten *Plasmodium falciparum* infiziert sind. Damit sollten die Adhäsionsvorgänge infizierter Zellen an die Rezeptoren CD36, den sog. Hauptrezeptor, sowie an Chondroitin-Sulfat A (CSA), welches für die Ausbildung der plazentalen Malaria wichtig ist, untersucht werden. Zudem wurden verschiedene PfEMP1-Domänen hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit auf CD36 und ICAM-1 getestet.

Zu diesem Zweck mussten in einem ersten Schritt geeignete Beschichtungssysteme für die Sensoren entwickelt werden, um die verschiedenen Rezeptoren optimal immobilisieren zu können. Im Falle von CD36 wurden dazu Membranen von CD36-exprimierenden Zellen (C32-Zellen) verwendet, um den infizierten Zellen das Transmembranprotein in einem möglichst natürlichen Zustand anbieten zu können. Hierbei konnten sehr zuverlässig spezifische Bindesignale erhalten werden, welche sich deutlich von den Kontrollen mit nicht infizierten Zellen absetzten. Allerdings ist noch ungeklärt, ob diese Bindungen über CD36 oder einen weiteren Rezeptor stattfanden. Über eine ebenfalls durchgeführte mikroskopisch aufgenommene Zeitreihe war es möglich, das Bindungsverhalten (initiales Rollen bzw. sofortige Adhäsion) der Zellen bildhaft zu dokumentieren, eine gleichzeitige Aufnahme des Sensorsignals konnte allerdings bei diesem Versuch aufgrund des zu großen Messgeräts nicht realisiert werden. Da es jedoch in absehbarer Zeit möglich sein wird miniaturisierte Messanlagen herzustellen und zu verwenden, sollte es möglich sein parallel zu der Schwingquarzmessung Zeitreihen mit dem Mikroskop durchzuführen. Dabei könnte auch unter Verwendung geeigneter und zellschonender Fluoreszenzfarbstoffe die Entwicklung der infizierten Zellen dokumentiert werden. Des Weiteren könnte festgestellt werden, ob es sich bei den rollenden Stadien um frühere Stadien handelt als bei den sofort adhärierenden Zellen. Bei Kontrollmessungen mit genetisch veränderten Parasiten, deren CD36-bindenden PfEMP1-Proteine ausgeschaltet waren, wurden unerwartete Ergebnisse erhalten, da diese zunehmend stärker an die beschichteten Sensoren banden. Ob die Bindung dabei von PfEMP1-Proteinen, deren Fähigkeit CD36 zu binden noch vorhanden war, oder von anderen Proteinen parasitären Ursprungs vermittelt wurde, ist noch unklar.

Hinsichtlich der Untersuchung der Zytoadhäsion auf CSA konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bei Verwendung der bisher in der Malariaforschung

etablierten Methoden zur Immobilisierung von CSA stets unspezifische Interaktionen mit den Basisschichten und keine oder nur schwache Bindungsereignisse mit dem spezifischen Rezeptor zustande kamen. Daher wurde über die Bindung des CSA an Poly-L-Lysin eine neue Beschichtung entwickelt, mit der zuverlässig ausschließlich spezifische Interaktionen aufgezeichnet werden konnten.

Ähnliche Erfolge konnten auch bei Bindungsstudien von einzelnen PfEMP1-Domänen an CD36 und ICAM-1 verzeichnet werden. Dabei konnten bisherige Kenntnisse bestätigt und im Falle der Adhäsion an ICAM-1 neue Kenntnisse hinzugewonnen werden. So konnte gezeigt werden, dass nicht ausschließlich DBL2 β -Domänen zur Bindung an den Rezeptor fähig sind. Diese Fähigkeit konnte auch bei einer DBL4 β - und in geringem Maße bei einer DBL1 α -Domäne nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei den DBL β -Domänen die Bindungsfähigkeit stets mit einer assoziiert vorliegenden C2-Domäne verbunden war. Weiterhin war es erstmals möglich unterschiedliche Affinitäten der verschiedenen Domänen für den Rezeptor festzustellen, da sich diese sehr deutlich in den erhaltenen Frequenzänderungen abzeichneten. Bisher konnte lediglich festgestellt werden, ob eine Bindung stattfindet oder nicht, ein direkter Vergleich der Bindungsstärken war mit den konventionellen Methoden bis dato nicht möglich.

Eine umfassende Beurteilung der Ergebnisse zeigt daher, dass die in dieser Arbeit angewandte Schwingquarzensensorik ein neues Tool für die Untersuchung der bei *Plasmodium falciparum* auftretenden Sequestrierungsvorgänge darstellt. Die Detektion der einzelnen Bindungsereignisse erfolgte on-line, was einen großen Vorteil gegenüber konventionellen Methoden darstellt, da eine Veränderung im Verhalten der Parasiten direkt registriert und aufgezeichnet werden kann. Daher ermöglicht die Auswertung der Messsignale eine quantitative Aussage über Veränderungen der Zelleigenschaften. Auch konnten Aussagen über die Bindungsaffinität der PfEMP1-Domänen und der Blutstadien bei den verschiedenen Rezeptoren gemacht werden. Mit bisherigen Methoden erfolgte eine Bestimmung bzw. ein Vergleich der Bindungsstärken über die Erfassung gebundener Zellen.

Dennoch ist, ebenso wie mit den konventionellen Methoden, die Vergleichbarkeit zwischen den in vitro erhaltenen Ergebnissen und der Situation in vivo schwierig. Denn im Lauf der Evolution hat sich in Bezug auf die Malaria ein gewisser Selektionsvorteil für die Blutgruppe 0 herausgestellt, welche standardmäßig für die Kultivierung verwendet wird. Eine Tendenz zur Entwicklung besonders schwerer Fälle die z.B. zu Koma führen, wurde allerdings bei Patienten, die die Blutgruppe A aufwiesen, festgestellt [12, 23]. Daher wäre es sinnvoll

Adhäsionsstudien in Zukunft auch mit Patientenisolaten durchzuführen. Da dies allerdings nur schwer zu realisieren sein wird, könnten auch Versuche mit Parasiten durchgeführt werden, welche in Erythrozyten der Blutgruppe A kultiviert wurden.

Die vorliegende Arbeit stellt nun eine Basis dar, auf der aufbauend weitere Untersuchungen durchgeführt werden können. So wäre es möglich zu testen, wie weit die parasitierten Zellen verdünnt werden können, bzw. welches die mindeste Parasitämie wäre um noch Bindungssignale zu erhalten. Dies wäre für die Entwicklung eines diagnostischen Gerätes interessant, mit dem durch die Untersuchung einer Patientenprobe festgestellt werden kann, ob das Risiko der Ausbildung einer ernststen Malaria bei der jeweiligen Person besteht. Mit diesem System können ebenfalls Medikamente getestet werden, mit denen eine Sequestrierung infizierter Zellen entweder verhindert oder wieder aufgelöst werden kann. Doch neben den verschiedenen klinischen Aspekten stellt die Schwingquarzsensoren in diesem Bereich der Malariaforschung auch ein neuartiges Tool dar, um Grundlagenforschung mit verschiedenen PfEMP1-Domänen zu betreiben. So könnten auf eine schnelle und zuverlässige Weise weitere für die Ausbildung der Zytoadhäsion verantwortliche PfEMP1-Domänen oder auch neue parasitäre Liganden oder Rezeptoren identifiziert werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Frankland, S., et al., *Serum lipoproteins promote efficient presentation of the malaria virulence protein PfEMP1 at the erythrocyte surface*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(9): p. 1584-94.
- [2] Pasvol, G., *Cell-cell interaction in the pathogenesis of severe falciparum malaria*. Clin Med, 2001. **1**(6): p. 495-500.
- [3] Beeson, J.G. and G.V. Brown, *Pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(2): p. 258-71.
- [4] Moxon, C.A., R.S. Heyderman, and S.C. Wassmer, *Dysregulation of coagulation in cerebral malaria*. Mol Biochem Parasitol, 2009. **166**(2): p. 99-108.
- [5] Breman, J.G., *The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **64**(1-2 Suppl): p. 1-11.
- [6] Kirchgatter, K. and H.A. Del Portillo, *Clinical and molecular aspects of severe malaria*. An Acad Bras Cienc, 2005. **77**(3): p. 455-75.
- [7] Snow, R.W., et al., *The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 214-7.
- [8] Medana, I.M. and G.D. Turner, *Human cerebral malaria and the blood-brain barrier*. Int J Parasitol, 2006. **36**(5): p. 555-68.
- [9] Miller, L.H., M.F. Good, and G. Milon, *Malaria pathogenesis*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1878-83.
- [10] *Focus: malaria*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(4): p. 276-7.
- [11] Cunha, C.B. and B.A. Cunha, *Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler*. J Vector Borne Dis, 2008. **45**(3): p. 194-9.
- [12] Cserti, C.M. and W.H. Dzik, *The ABO blood group system and Plasmodium falciparum malaria*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2250-8.
- [13] Tagarelli, A., et al., *The historic and genetic effects of malaria in a Mediterranean country*. Int J Anthropol, 1998. **13**(3-4): p. 243-248.
- [14] Hulden, L. and K. Heliövaara, *Endemic malaria: an 'indoor' disease in northern Europe. Historical data analysed*. Malar J, 2005. **4**(1): p. 19.
- [15] Lucius, R., Loos-Frank, B., *Biologie von Parasiten*. 2 ed. 2008: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 552.
- [16] Reiter, P., *Global warming and malaria: knowing the horse before hitching the cart*. Malar J, 2008. **7 Suppl 1**: p. S3.

- [17] Stark, K., et al., [*Climate changes and emerging diseases. What new infectious diseases and health problem can be expected?*]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2009. **52**(7): p. 699-714.
- [18] Hassl, A.R., [*The significance of malaria in the Western Roman Empire: A text passage in the Digesta*]. Wien Klin Wochenschr, 2008. **120**(19-20 Suppl 4): p. 11-4.
- [19] Howard, M.R., *Walcheren 1809: a medical catastrophe*. BMJ, 1999. **319**(7225): p. 1642-5.
- [20] Hulden, L. and K. Heliövaara, *Natural relapses in vivax malaria induced by Anopheles mosquitoes*. Malar J, 2008. **7**: p. 64.
- [21] Rogers, D.J. and S.E. Randolph, *The global spread of malaria in a future, warmer world*. Science, 2000. **289**(5485): p. 1763-6.
- [22] Dalitz, M.K., *Autochthone Malaria im mitteldeutschen Raum*, in *Medizinische Fakultät*. 2005, Martin-Luther-Universität: Halle-Wittenberg. p. 74.
- [23] Uneke, C.J., *Plasmodium falciparum malaria and ABO blood group: is there any relationship?* Parasitol Res, 2007. **100**(4): p. 759-65.
- [24] Mehlhorn, H., Piekarski, G., *Grundriß der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere*. 6 ed. 2002: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin. 516.
- [25] Wenk, P., Renz, A., *Parasitologie: Biologie der Humanparasiten*. Sonderausgabe ed. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 348.
- [26] Matuschewski, K., *Hitting malaria before it hurts: attenuated Plasmodium liver stages*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(23): p. 3007-11.
- [27] Bannister, L.H., et al., *A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. Parasitol Today, 2000. **16**(10): p. 427-33.
- [28] Maier, A.G., et al., *Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(5): p. 341-54.
- [29] Schmidt-Nielsen, K., *Physiologie der Tiere*. 1 ed. 1999: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.
- [30] Heddini, A., *Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces*. Int J Parasitol, 2002. **32**(13): p. 1587-98.
- [31] Horrocks, P., et al., *PfEMP1 expression is reduced on the surface of knobless Plasmodium falciparum infected erythrocytes*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 11): p. 2507-18.
- [32] Aikawa, M., et al., *Membrane knobs of unfixated Plasmodium falciparum infected erythrocytes: new findings as revealed by atomic force microscopy and surface potential spectroscopy*. Exp Parasitol, 1996. **84**(3): p. 339-43.

- [33] Gruenberg, J., D.R. Allred, and I.W. Sherman, *Scanning electron microscope-analysis of the protrusions (knobs) present on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Cell Biol, 1983. **97**(3): p. 795-802.
- [34] Nogueira, P.A., G. Wunderlich, and L.H. Pereira da Silva, *Variant antigens of Plasmodium falciparum encoded by the var multigenic family are multifunctional macromolecules*. Res Microbiol, 2001. **152**(2): p. 141-7.
- [35] Biggs, B.A., et al., *Knob-independent cytoadherence of Plasmodium falciparum to the leukocyte differentiation antigen CD36*. J Exp Med, 1990. **171**(6): p. 1883-92.
- [36] Waller, K.L., et al., *Mapping the domains of the cytoadherence ligand Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) that bind to the knob-associated histidine-rich protein (KAHRP)*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **119**(1): p. 125-9.
- [37] Knuepfer, E., et al., *Trafficking determinants for PfEMP3 export and assembly under the Plasmodium falciparum-infected red blood cell membrane*. Mol Microbiol, 2005. **58**(4): p. 1039-53.
- [38] Spycher, C., et al., *The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Mol Microbiol, 2008. **68**(5): p. 1300-14.
- [39] Templeton, T.J. and K.W. Deitsch, *Targeting malaria parasite proteins to the erythrocyte*. Trends Parasitol, 2005. **21**(9): p. 399-402.
- [40] Aikawa, M., *Morphological changes in erythrocytes induced by malarial parasites*. Biol Cell, 1988. **64**(2): p. 173-81.
- [41] Curtidor, H., et al., *Structural modifications to a high-activity binding peptide located within the PfEMP1 NTS domain induce protection against P. falciparum malaria in Aotus monkeys*. Biol Chem, 2007. **388**(1): p. 25-36.
- [42] Chulay, J.D. and C.F. Ockenhouse, *Host receptors for malaria-infected erythrocytes*. Am J Trop Med Hyg, 1990. **43**(2 Pt 2): p. 6-14.
- [43] Flick, K. and Q. Chen, *var genes, PfEMP1 and the human host*. Mol Biochem Parasitol, 2004. **134**(1): p. 3-9.
- [44] Kyriacou, H.M., et al., *In vitro inhibition of Plasmodium falciparum rosette formation by Curdlan sulfate*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): p. 1321-6.
- [45] Barragan, A., et al., *Blood group A antigen is a coreceptor in Plasmodium falciparum rosetting*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2971-5.
- [46] Muthusamy, A., et al., *Chondroitin sulfate proteoglycan but not hyaluronic acid is the receptor for the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in human*

placenta, and infected red blood cell adherence up-regulates the receptor expression. *Am J Pathol*, 2007. **170**(6): p. 1989-2000.

[47] Chilongola, J., et al., *CD36 deficiency protects against malarial anaemia in children by reducing Plasmodium falciparum-infected red blood cell adherence to vascular endothelium*. *Trop Med Int Health*, 2009. **14**(7): p. 810-6.

[48] Viebig, N.K., et al., *Direct activation of human endothelial cells by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *Infect Immun*, 2005. **73**(6): p. 3271-7.

[49] Urban, B.C. and D.J. Roberts, *Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(4): p. 458-65.

[50] Chai, W., et al., *Inhibition of adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by structurally defined hyaluronic acid dodecasaccharides*. *Infect Immun*, 2001. **69**(1): p. 420-5.

[51] Pouvelle, B., et al., *Neural cell adhesion molecule, a new cytoadhesion receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes capable of aggregation*. *Infect Immun*, 2007. **75**(7): p. 3516-22.

[52] Gruarin, P., et al., *Cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is mediated by a redox-dependent conformational fraction of CD36*. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6510-7.

[53] Smith, J.D., et al., *Decoding the language of var genes and Plasmodium falciparum sequestration*. *Trends Parasitol*, 2001. **17**(11): p. 538-45.

[54] Sherman, I.W., *Advances in Parasitology: Reflections on a Century of Malaria Biochemistry* 1ed. 2008, London: Academic Pr Inc. 400.

[55] Handunnetti, S.M., et al., *Involvement of CD36 on erythrocytes as a rosetting receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *Blood*, 1992. **80**(8): p. 2097-104.

[56] Chen, Q., et al., *Identification of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite P. falciparum*. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 15-23.

[57] Rowe, J.A., et al., *P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1*. *Nature*, 1997. **388**(6639): p. 292-5.

[58] Andrews, K.T., et al., *Adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CHO-745 cells and inhibition of binding by protein A in the presence of human serum*. *Int J Parasitol*, 2005. **35**(10): p. 1127-34.

- [59] Rasti, N., M. Wahlgren, and Q. Chen, *Molecular aspects of malaria pathogenesis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004. **41**(1): p. 9-26.
- [60] Lavstsen, T., et al., *Sub-grouping of Plasmodium falciparum 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions*. Malar J, 2003. **2**: p. 27.
- [61] Sanni, L.A., et al., *Cellular responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1: use of relatively conserved synthetic peptide pools to determine CD4 T cell responses in malaria-exposed individuals in Benin, West Africa*. Malar J, 2002. **1**: p. 7.
- [62] Rowe, J.A. and S.A. Kyes, *The role of Plasmodium falciparum var genes in malaria in pregnancy*. Mol Microbiol, 2004. **53**(4): p. 1011-9.
- [63] Scherf, A., J.J. Lopez-Rubio, and L. Riviere, *Antigenic variation in Plasmodium falciparum*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 445-70.
- [64] Pouvelle, B., et al., *Cytoadhesion of Plasmodium falciparum ring-stage-infected erythrocytes*. Nat Med, 2000. **6**(11): p. 1264-8.
- [65] Rug, M., et al., *The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of P falciparum-infected human erythrocytes*. Blood, 2006. **108**(1): p. 370-8.
- [66] Pasloske, B.L. and R.J. Howard, *Malaria, the red cell, and the endothelium*. Annu Rev Med, 1994. **45**: p. 283-95.
- [67] Lekana Douki, J.B., et al., *Sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1478-83.
- [68] Wassmer, S.C., et al., *Inhibition of endothelial activation: a new way to treat cerebral malaria?* PLoS Med, 2005. **2**(9): p. e245.
- [69] Sun, G., et al., *Inhibition of platelet adherence to brain microvasculature protects against severe Plasmodium berghei malaria*. Infect Immun, 2003. **71**(11): p. 6553-61.
- [70] Schofield, L. and G.E. Grau, *Immunological processes in malaria pathogenesis*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(9): p. 722-35.
- [71] Baruch, D.I., et al., *Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3766-75.
- [72] Pouvelle, B., et al., *Biological and biochemical characteristics of cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate*. Infect Immun, 1998. **66**(10): p. 4950-6.

- [73] Ockenhouse, C.F., et al., *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. *Cell*, 1992. **68**(1): p. 63-9.
- [74] Berendt, A.R., et al., *The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell*, 1992. **68**(1): p. 71-81.
- [75] Sharling, L., et al., *Antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize trypsin resistant epitopes on the surface of Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes selected for adhesion to chondroitin sulphate A. *Malar J*, 2004. **3**: p. 31.
- [76] Resende, M., et al., *Chondroitin sulphate A (CSA)*-binding of single recombinant Duffy-binding-like domains is not restricted to *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 expressed by CSA-binding parasites. *Int J Parasitol*, 2009. **39**(11): p. 1195-204.
- [77] Amulic, B., et al., *An upstream open reading frame controls translation of var2csa, a gene implicated in placental malaria*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(1): p. e1000256.
- [78] Salanti, A., et al., *Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering Plasmodium falciparum involved in pregnancy-associated malaria*. *Mol Microbiol*, 2003. **49**(1): p. 179-91.
- [79] Andersen, P., et al., *Structural insight into epitopes in the pregnancy-associated malaria protein VAR2CSA*. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(2): p. e42.
- [80] Higgins, M.K., *The structure of a chondroitin sulfate-binding domain important in placental malaria*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(32): p. 21842-6.
- [81] Rogerson, S.J., et al., *Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med*, 1995. **182**(1): p. 15-20.
- [82] Yosaatmadja, F., et al., *Characterization of VAR2CSA-deficient Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes selected for adhesion to the BeWo placental cell line. *Malar J*, 2008. **7**: p. 51.
- [83] Beeson, J.G., et al., *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *J Infect Dis*, 1999. **180**(2): p. 464-72.
- [84] Schleiermacher, D., et al., *Hidden Plasmodium falciparum* parasites in human infections: different genotype distribution in the peripheral circulation and in the placenta. *Infect Genet Evol*, 2002. **2**(2): p. 97-105.
- [85] Storch, V., Welsch, U., *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. 7 ed. 1994: Gustav Fischer Verlag. 593.

- [86] Albiti, A.H., I. Adam, and A.S. Ghouth, *Placental malaria, anaemia and low birthweight in Yemen*. Trans R Soc Trop Med Hyg. **104**(3): p. 191-4.
- [87] Costa, F.T., et al., *Cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and the infected placenta: a two-way pathway*. Braz J Med Biol Res, 2006. **39**(12): p. 1525-36.
- [88] WHO, *Malaria in pregnancy - Guidelines for measuring key monitoring and evaluation indicators*. 2007.
- [89] Bardaji, A., et al., *Clinical malaria in African pregnant women*. Malar J, 2008. **7**: p. 27.
- [90] Andrews, K.T., et al., *Inhibition of chondroitin-4-sulfate-specific adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by sulfated polysaccharides*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4288-94.
- [91] Nunes, M.C., et al., *Investigation of host factors possibly enhancing the emergence of the chondroitin sulfate A-binding phenotype in Plasmodium falciparum*. Microbes Infect, 2008. **10**(8): p. 928-32.
- [92] Beeson, J.G., et al., *Inhibition of binding of malaria-infected erythrocytes by a tetradecasaccharide fraction from chondroitin sulfate A*. Infect Immun, 1998. **66**(7): p. 3397-402.
- [93] Beeson, J.G., et al., *Structural basis for binding of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 to chondroitin sulfate and placental tissue and the influence of protein polymorphisms on binding specificity*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22426-36.
- [94] Gowda, D.C. and C.F. Ockenhouse, *Adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin 4-sulfate*. Biosci Rep, 1999. **19**(4): p. 261-71.
- [95] Achur, R.N., et al., *Binding affinity of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from infected placentas and laboratory selected strains to chondroitin 4-sulfate*. Mol Biochem Parasitol, 2008. **159**(1): p. 79-84.
- [96] Nielsen, M.A., et al., *Plasmodium falciparum: VAR2CSA expressed during pregnancy-associated malaria is partially resistant to proteolytic cleavage by trypsin*. Exp Parasitol, 2007. **117**(1): p. 1-8.
- [97] Gamain, B., et al., *Identification of a 67-amino-acid region of the Plasmodium falciparum variant surface antigen that binds chondroitin sulphate A and elicits antibodies reactive with the surface of placental isolates*. Mol Microbiol, 2004. **53**(2): p. 445-55.
- [98] Tandon, N.N., et al., *Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36)*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7570-5.

- [99] Collot-Teixeira, S., et al., *CD36 and macrophages in atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(3): p. 468-77.
- [100] McCormick, C.J., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2521-9.
- [101] Lavstsen, T., et al., *Expression of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 in experimentally infected humans*. Malar J, 2005. **4**(1): p. 21.
- [102] Ljungström, I., Perlmann H., Schlichtherle M., Scherf A., Wahlgren M., *Methods in malaria research*. 2004: Manassas, Virginia.
- [103] Day, K.P., et al., *CD36-dependent adhesion and knob expression of the transmission stages of Plasmodium falciparum is stage specific*. Mol Biochem Parasitol, 1998. **93**(2): p. 167-77.
- [104] Cooke, B.M. and R.L. Coppel, *Cytoadhesion and falciparum malaria: going with the flow*. Parasitol Today, 1995. **11**(8): p. 282-7.
- [105] Nash, G.B., et al., *Rheological analysis of the adhesive interactions of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum*. Blood, 1992. **79**(3): p. 798-807.
- [106] Raventos-Suarez, C., et al., *Membrane knobs are required for the microcirculatory obstruction induced by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(11): p. 3829-33.
- [107] Beeson, J.G., et al., *Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria*. Nat Med, 2000. **6**(1): p. 86-90.
- [108] Janshoff, A., Galla, H.J., Steinem, C., *Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik - eine Alternative zu optischen Biosensoren?* Angew. Chem., 2000. **112**(22): p. 4164-4195.
- [109] Haas, U., *Physik für Pharmazeuten und Mediziner: Ein Lehrbuch für alle Studierenden mit Physik als Nebenfach*. 6 ed. 2002: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- [110] Gehring, F.K., *Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten - Entwicklung eines Blutanalysegerätes*. 2005: Cuvillier Verlag Göttingen. 200.
- [111] Scheufele, B., *Sensorik und Aktorik mit piezoelektrischen Schwingquarzen - Nachweis von blutgruppenspezifischen Antikörpern in humanem Vollblut*. 2009: Cuvillier Verlag Göttingen.
- [112] Müller, L., *Schwingquarze als Hämostase-Sensoren - Eine neue Methode zur hämostaseologischen Diagnostik in Vollblut*. 2009: Cuvillier Verlag Göttingen. 178.

- [113] Uttenthaler, E.J., *Hochempfindliche akustische Sensorelemente für die Flüssigkeits- und Biosensorik*. 2002, Universität der Bundeswehr München.
- [114] Uttenthaler, E., et al., *Ultrasensitive quartz crystal microbalance sensors for detection of M13-Phages in liquids*. Biosens Bioelectron, 2001. **16**(9-12): p. 735-43.
- [115] Cooper, M.A. and V.T. Singleton, *A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions*. J Mol Recognit, 2007. **20**(3): p. 154-84.
- [116] Ward, M.D. and D.A. Buttry, *In Situ Interfacial Mass Detection with Piezoelectric Transducers*. Science, 1990. **249**(4972): p. 1000-1007.
- [117] Wang, H., et al., *A protein A-based orientation-controlled immobilization strategy for antibodies using nanometer-sized gold particles and plasma-polymerized film*. Anal Biochem, 2004. **324**(2): p. 219-26.
- [118] Baltus, R.E., K.S. Carmon, and L.A. Luck, *Quartz crystal microbalance (QCM) with immobilized protein receptors: comparison of response to ligand binding for direct protein immobilization and protein attachment via disulfide linker*. Langmuir, 2007. **23**(7): p. 3880-5.
- [119] Kurosawa, S., *Adsorption of anti-C-Reactive Protein Monoclonal Antibody and Its F(ab')₂ fragment on Plasma-Polymerized Styrene, Allylamine and Acrylic Acid Coated with Quartz Crystal Microbalance*. J. Photopolym. Sci. Technol., 2002. **15**(2): p. 323-330.
- [120] Navratilova, I., P. Skladal, and V. Viklicky, *Development of piezoelectric immunosensors for measurement of albuminuria*. Talanta, 2001. **55**(4): p. 831-9.
- [121] Wang, C., et al., *A piezoelectric immunoassay based on self-assembled monolayers of cystamine and polystyrene sulfonate for determination of Schistosoma japonicum antibodies*. Anal Bioanal Chem, 2002. **373**(8): p. 803-9.
- [122] Wang, H., et al., *Rapid, simple, and sensitive immunoagglutination assay with SiO₂ particles and quartz crystal microbalance for quantifying Schistosoma japonicum antibodies*. Clin Chem, 2006. **52**(11): p. 2065-71.
- [123] Marxer, C.G., et al., *Simultaneous measurement of the maximum oscillation amplitude and the transient decay time constant of the QCM reveals stiffness changes of the adlayer*. Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(3): p. 570-7.
- [124] Fujisaki, H. and S. Hattori, *Keratinocyte apoptosis on type I collagen gel caused by lack of laminin 5/10/11 deposition and Akt signaling*. Exp Cell Res, 2002. **280**(2): p. 255-69.
- [125] Marx, K.A., *Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface*. Biomacromolecules, 2003. **4**(5): p. 1099-120.

- [126] Fredriksson, C., et al., *In vitro real-time characterization of cell attachment and spreading*. J Mater Sci Mater Med, 1998. **9**(12): p. 785-8.
- [127] Kreth, J., et al., *Quantitative analyses of Streptococcus mutans biofilms with quartz crystal microbalance, microjet impingement and confocal microscopy*. Biofilms, 2004. **1**(4): p. 277-284.
- [128] Heitmann, V. and J. Wegener, *Monitoring cell adhesion by piezoresonators: impact of increasing oscillation amplitudes*. Anal Chem, 2007. **79**(9): p. 3392-400.
- [129] Rodahl, M., et al., *Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion*. Faraday Discuss, 1997(107): p. 229-46.
- [130] Drechsel, H., *Entwurf und Implementierung einer Software für einen QCM-Blutgruppensensor*, in *Fachbereich Informatik*. 2004, Fachhochschule: Trier.
- [131] Claußen, J., *Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren*, in *Fachbereich Physik*. 2006, Technischen Universität Kaiserslautern: Kaiserslautern. p. 180.
- [132] Döring, J.S., *Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarz-Beschichtungen für die Blutgruppenanalyse mit Biosensor*, in *Medizinische Fakultät*. 2008, Eberhard Karls Universität: Tübingen. p. 79.
- [133] Cluss, S., *Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von Schwingquarzen zur Messung einer blutgruppenspezifischen Ankopplung von Erythrozyten*, in *Medizinische Fakultät*. 2007, Eberhard Karls Universität: Tübingen. p. 168.
- [134] Schoch, M., *Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren*, in *Medizinische Fakultät*. 2008, Eberhard Karls Universität: Tübingen. p. 112.
- [135] Krapf, R., *Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen*, in *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. 2001, Eberhard Karls Universität: Tübingen. p. 118.
- [136] Schmidt, S., *Dissertation in Vorbereitung*, in *Medizinische Fakultät*, Eberhard Karls Universität: Tübingen.
- [137] Koch, J., *Dissertation in Vorbereitung*, in *Medizinische Fakultät*, Eberhard Karls Universität: Tübingen.
- [138] Muller, L., et al., *Investigation of prothrombin time in human whole-blood samples with a quartz crystal biosensor*. Anal Chem, 2010. **82**(2): p. 658-63.

- [139] Bustos Cruz, R.E., *Development of a novel real-time method to study the erythrocytic life cycle of Plasmodium falciparum using Quartz Crystal Microbalances*. 2010: Cuvillier Verlag Göttingen. 158.
- [140] McKenzie, F.E., et al., *Strain theory of malaria: the first 50 years*. Adv Parasitol, 2008. **66**: p. 1-46.
- [141] Frank, M., et al., *Variable switching rates of malaria virulence genes are associated with chromosomal position*. Mol Microbiol, 2007. **64**(6): p. 1486-98.
- [142] Trager, W., *Cultivation of malaria parasites*. Br Med Bull, 1982. **38**(2): p. 129-31.
- [143] Vazquez-Macias, A., et al., *A distinct 5' flanking var gene region regulates Plasmodium falciparum variant erythrocyte surface antigen expression in placental malaria*. Mol Microbiol, 2002. **45**(1): p. 155-67.
- [144] Schmidt, J.A., et al., *Plasmodium falciparum malaria. An amelanotic melanoma cell line bears receptors for the knob ligand on infected erythrocytes*. J Clin Invest, 1982. **70**(2): p. 379-86.
- [145] Rogers, N.J., G.A. Targett, and B.S. Hall, *Plasmodium falciparum gametocyte adhesion to C32 cells via CD36 is inhibited by antibodies to modified band 3*. Infect Immun, 1996. **64**(10): p. 4261-8.
- [146] Wright, P.S., et al., *Disruption of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadherence to human melanoma cells with inhibitors of glycoprotein processing*. Biochem Pharmacol, 1991. **41**(12): p. 1855-61.
- [147] Predehl, S., *Funktionsanalysen der PfEMP1 Proteinfamilie von Plasmodium falciparum (Welch, 1897)*, in *Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften; Department Biologie*. 2010, Universität Hamburg: Hamburg. p. 127.
- [148] Gehring, F.K., *Apparatus comprising a measurement chamber and a resonator, which can be integrated in the measurement chamber via quick-action closure, for the liquid sensor system*. 2008: Deutschland.
- [149] Schuster, F.L., *Cultivation of plasmodium spp*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(3): p. 355-64.
- [150] Ribaut, C., et al., *Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human Plasmodium species*. Malar J, 2008. **7**: p. 45.
- [151] Buffet, P.A., et al., *Plasmodium falciparum domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12743-8.

- [152] Kleiner, S., *Dissertation in Vorbereitung*, in *Medizinische Fakultät*, Eberhard Karls Universität: Tübingen.
- [153] Steinitz, M., *Quantitation of the blocking effect of tween 20 and bovine serum albumin in ELISA microwells*. *Anal Biochem*, 2000. **282**(2): p. 232-8.
- [154] Ho, M., et al., *Visualization of Plasmodium falciparum-endothelium interactions in human microvasculature: mimicry of leukocyte recruitment*. *J Exp Med*, 2000. **192**(8): p. 1205-11.
- [155] Voinova, M.V., M. Jonson, and B. Kasemo, *Missing mass effect in biosensor's QCM applications*. *Biosens Bioelectron*, 2002. **17**(10): p. 835-41.
- [156] Avril, M., et al., *Characterization of anti-var2CSA-PfEMP1 cytoadhesion inhibitory mouse monoclonal antibodies*. *Microbes Infect*, 2006. **8**(14-15): p. 2863-71.
- [157] Fried, M., et al., *Plasmodium falciparum: chondroitin sulfate A is the major receptor for adhesion of parasitized erythrocytes in the placenta*. *Exp Parasitol*, 2006. **113**(1): p. 36-42.
- [158] Silamut, K., et al., *A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(2): p. 395-410.
- [159] Skládal, P., *Piezoelectric Quartz Crystal Sensors Applied for Bioanalytical Assays and Characterization of Affinity Interactions*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003. **14**(4): p. 491-502.
- [160] Heddini, A., et al., *Fresh isolates from children with severe Plasmodium falciparum malaria bind to multiple receptors*. *Infect Immun*, 2001. **69**(9): p. 5849-56.
- [161] Greenwalt, D.E., et al., *Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine*. *Blood*, 1992. **80**(5): p. 1105-15.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. H. Northoff vom Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) danke ich für die Betreuung sowie die Begutachtung der Dissertation. Weiterhin bedanke ich mich für die intensiven Diskussionen und die Unterstützung während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. O. Betz gilt mein besonderer Dank für die kurzfristige Übernahme der Betreuung und Begutachtung der Dissertation, sowie für die freundliche Aufnahme in der Abteilung Evolutionsbiologie der Invertebraten des Lehrstuhls für vergleichende Zoologie.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn PD Dr. A. Renz für die zusätzliche biologische Betreuung meiner Arbeit und die große Unterstützung, die ich erfahren durfte.

Dem Arbeitsgruppenleiter der Biosensorik-Gruppe Tübingen, Herrn Dr. F. K. Gehring, danke ich für die Bereitstellung des interessanten und anspruchsvollen Themas, die gute Betreuung und die fruchtbaren Diskussionen während meiner Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Mordmüller des Instituts für Tropenmedizin für die Möglichkeit der Durchführung der Parasiten-Zellkulturen am Institut.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Biosensorik-Gruppe für die interdisziplinäre Unterstützung und die freundliche Arbeitsatmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe bedanken. Insbesondere den Herren Dr. Hartmut Drechsel, Dr. Joachim Heimberger, Dr. Lothar Müller, Dr. Bernd Scheufele und Dr. Michael Wandel danke ich für die große Unterstützung und Freundschaft, die mir während der gesamten Zeit entgegengebracht wurde. Neben allen in der Gruppe beschäftigten medizinischen Doktoranden gilt mein besonderer Dank der von mir betreuten Doktorandinnen Stefani Kleiner und Julia Wirth für die sowohl unterhaltsame als auch äußerst produktive Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Malaria-Kultur.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Tropenmedizin bedanken. Besonders Frau Dr. Jana Held, Herrn Dr. Rolf Fendel, Frau Dr. Andrea Kreidenweiss, Frau Evelyn Böttger, Frau Corinna Enderes, Frau Nicole Sessler, Frau Serena Tschan, Frau Tanja Paquet-Durand, Frau Ulrike Müller-Pienau und Herrn Anthony Ajua danke ich für die freundliche Aufnahme und die freundschaftliche Atmosphäre am Institut und im Labor, für die geduldige Einweisung und die große Unterstützung in der Kultivierung der Parasiten-Kulturen.

Zudem danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Schäfer, Zieker und ehemals Fehrenbach für die freundliche Aufnahme in den Gemeinschaftslabors. Besonders danke ich Herrn Dr. Markus Löffler, Herrn Asghar Abbasi, Frau Miriam Ayturan, Frau Sarah Bühler und Herrn Roland Klaffschenkel für die mentale und freundschaftliche Unterstützung.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Blutbank und Blutspende des Zentrums für Klinische Transfusionsmedizin (ZKT) Tübingen für die Bereitstellung der häufig benötigten Blutkomponenten und die freundliche Zusammenarbeit.

Frau Sabine Predehl (Abteilung für Molekulare Parasitologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, Hamburg) danke ich für die enge und produktive Zusammenarbeit bei der Durchführung von Versuchen, von denen niemand glaubte, dass sie gelingen würden.

Meinen Freunden Silvia Pluta und Thomas Willig danke ich sehr für den Rückhalt, die aufmunternden und aufbauenden Gespräche und ihre ehrliche Freundschaft.

Meinen Eltern gilt mein besonderer Dank für die große Unterstützung und ihre Geduld während der letzten Jahre und ihre Hilfe in besonders schweren Tagen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniela Kömpf
Geburtsdatum: 14.12.1981
Geburtsort: Böblingen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1988 – 1992 Grundschole Calw-Stammheim
1992 – 1998 Realschole Althengstett
1998 – 2001 Kaufmännische Schule Calw – Wirtschaftsgymnasium

Studium

10/2001 – 07/2006 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Hohenheim
11/2005 – 07/2006 Diplomarbeit am Institut für Zoologie (Fachgebiet Parasitologie) der Universität Hohenheim.
Titel: Experimentelle und ultrastrukturelle Untersuchung zur frühen Entwicklungsphase von *Sarcocystis singaporensis*.

Promotion

06/2007 - 02/2011 Wissenschaftliche Arbeiten in der Biosensorik-Gruppe (AG Gehring) des Instituts für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) des Universitätsklinikums Tübingen, unter Leitung von Prof. Dr. H. Northoff. Promotion in der Fakultät für Biologie am Lehrstuhl für vergleichende Zoologie (Abteilung Evolutionsbiologie der Invertebraten) unter Anleitung von Prof. Dr. O. Betz.
Titel: Entwicklung eines Schwingquarz-basierten Assays zur Detektion der PfEMP1-vermittelten Zytoadhäsion von *Plasmodium falciparum*

