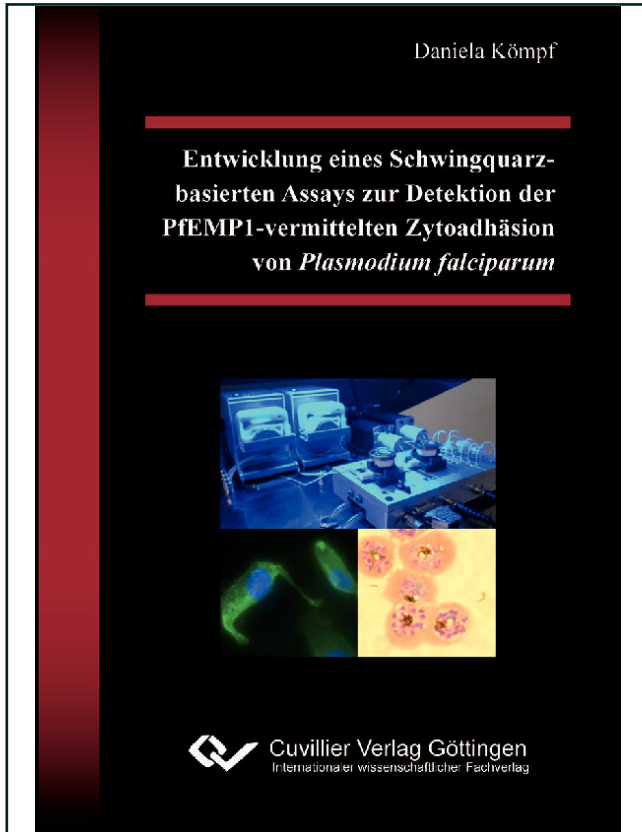




Daniela Kömpf (Autor)

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



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/379>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

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 Plasmodium sp.	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 Plasmodium falciparum 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