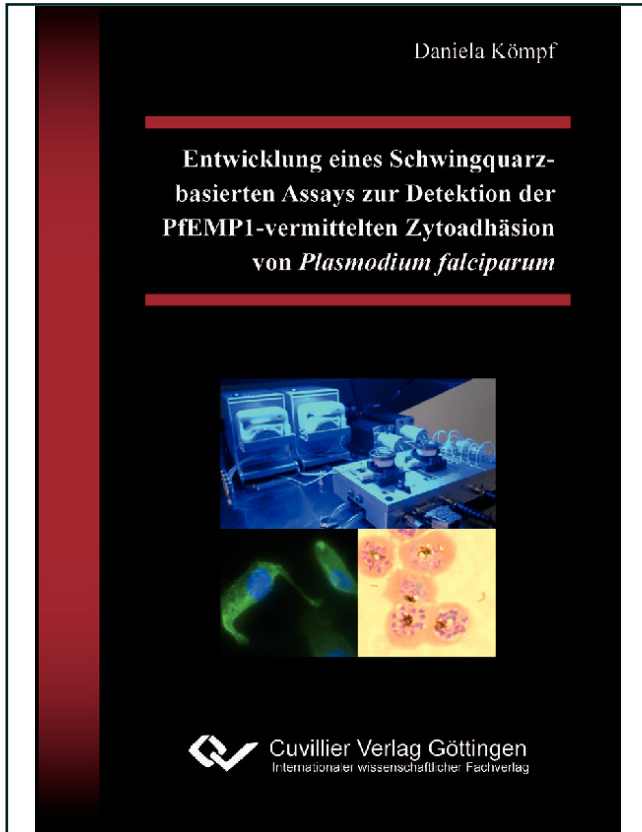




Daniela Kömpf (Autor)

## 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](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## **1. Einleitung**

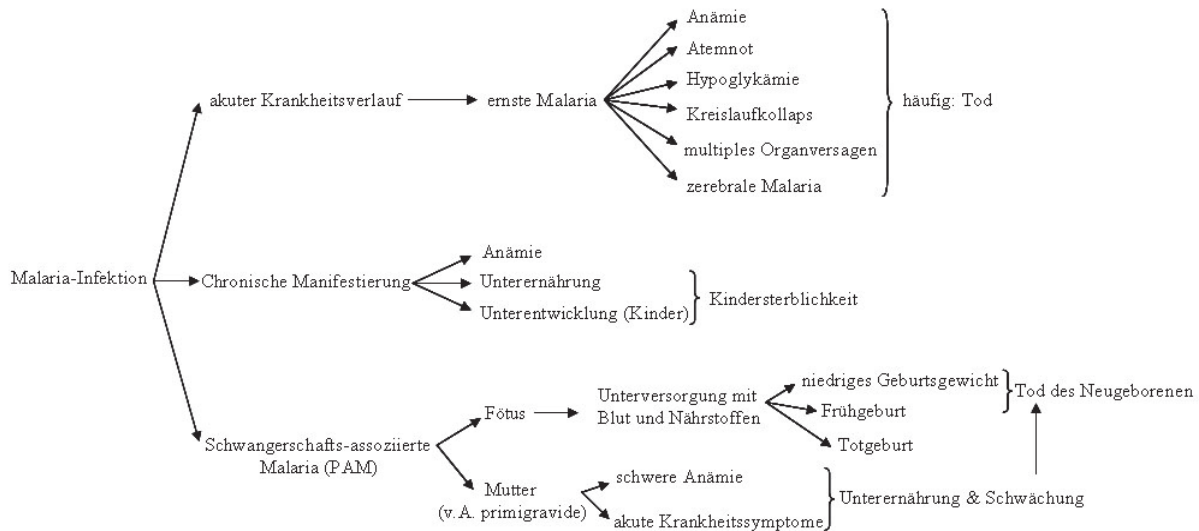
Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der beim Malaria-Erreger *Plasmodium (Laveriana) falciparum* (Welch 1897) auftretenden Zytoadhäsion an das Endothel mittels Schwingquarzsensoren. In den folgenden Kapiteln werden die dieser Arbeit zugrunde liegenden theoretischen Grundlagen erläutert. 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.

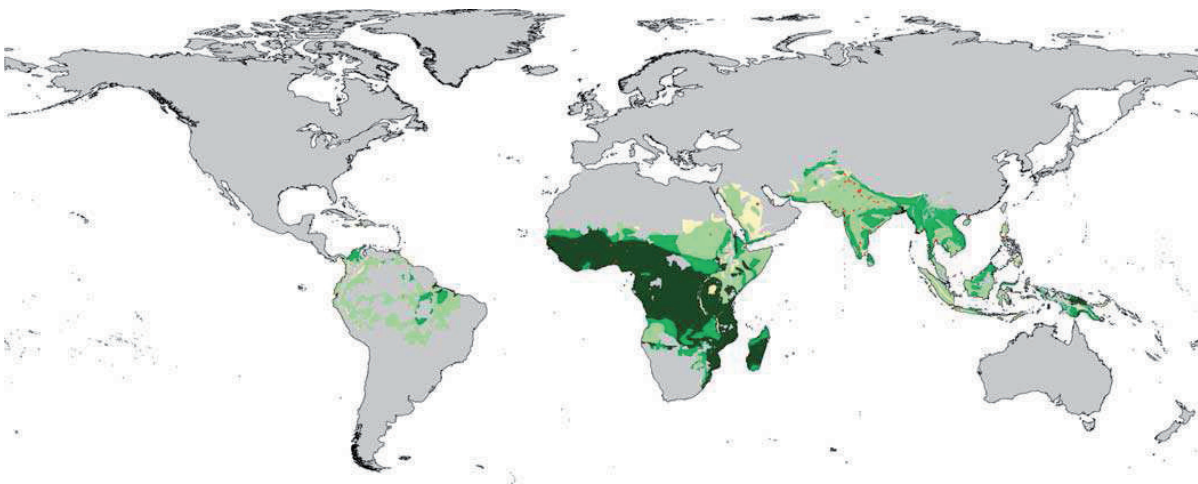
#### **1.1.1 Malaria – wichtige Fakten**

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 anzusiedeln (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  $-51^{\circ}\text{C}$  (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

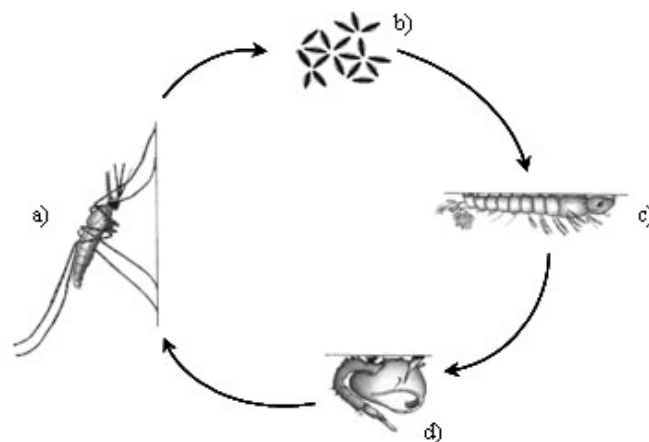
**Tabelle 1:** Charakteristika der verschiedenen *Plasmodium*-Arten, kombiniert nach [11, 14, 15]

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.