

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung VII, Tropenmedizin  
(Schwerpunkt: Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin,  
Humanparasitologie)

**Optimierung einer multiplex, quantitativen real-time  
PCR zur Detektion von hrp2- und hrp3-Gendeletionen  
bei *Plasmodium falciparum***

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Wyndorps, Lea**

**2022**

Dekan:

Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. G. Kremsner

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. K. Grundmann-Hauser

Tag der Disputation:

23.09.2021

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Formelverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	VII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Diagnostik .....	3
1.1.1 Mikroskopie .....	3
1.1.2 Schnelltests .....	5
1.1.2.1 HRP2 und HRP3 .....	7
1.1.2.2 Falsch-negative Schnelltests.....	8
1.1.3 Molekulare Techniken.....	8
1.1.3.1 PCR .....	9
1.1.3.2 Real-time PCR .....	9
1.2 Detektion von hrp2- und hrp3-Deletionen.....	11
1.3 Ziel der Arbeit.....	14
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1 Material .....	15
2.1.1 Parasitenkultur.....	15
2.1.2 DNA-Extraktion .....	16
2.1.3 PCR.....	16
2.1.4 qPCR.....	17
2.1.5 Standardkurve und Detektionslimit .....	18
2.2 Methoden .....	19
2.2.1 Zellkultur .....	19
2.2.1.1 Auftauen der Laborstämme.....	20
2.2.1.2 Synchronisation der Parasitenstadien.....	20
2.2.1.3 Einfrieren der Parasiten .....	22
2.2.2 DNA-Extraktion .....	22
2.2.2.1 DNA-Extraktion der Positiv- und Negativkontrollen.....	22
2.2.2.2 DNA-Extraktion von Filterpapier-Feldproben.....	24
2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	25
2.2.3.1 Singleplex-qPCR.....	25

---

2.2.3.2	Optimierung einer 4plex-qPCR .....	31
2.2.3.3	Farbkompensation .....	39
2.2.3.4	Messung von klinischen Proben.....	40
2.2.4	Standardverdünnung .....	41
2.2.4.1	Standardkurve und Detektionslimit der qPCR.....	45
2.2.4.2	Detektionslimit der k. PCR .....	47
2.2.5	Auswertung der LightCycler-Daten.....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1	Etablierung der 4plex-qPCR_v2 .....	52
3.1.1	Singleplex-qPCR .....	54
3.1.1.1	Kreuzreaktivität der neuen hrp-Assays .....	55
3.1.1.2	Kreuzreaktivität der einzelnen Komponenten.....	56
3.1.2	Optimierung der 4plex-qPCR_v2 .....	60
3.1.2.1	Optimierung der Fluoreszenzintensitäten.....	61
3.1.2.2	Optimierung der Fluoreszenzkurve .....	73
3.1.2.3	Anpassung an Unterschiede zwischen den Sonden- Bestellungen.....	77
3.1.3	Parameter der 4plex-qPCR_v2.....	78
3.2	Analyse klinischer Isolate .....	80
3.3	Vergleich der Sensitivität der 4plex-qPCR mit k. PCR .....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
4.1	Optimierungsschritte .....	94
4.2	Klinische Isolate .....	95
4.3	Standardkurve.....	96
4.4	Fazit .....	97
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>109</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>110</b>
10.1	NanoDrop Messung der einzelnen Isolate .....	111
10.2	Gensequenzen.....	112
10.3	Darstellung der Fehlpaarungen der Primer und Sonden.....	116

---

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	zirka
CERMEL	Centre de Recherche Médicales de Lambaréné, Gabun
C <sub>q</sub>	quantification cycle
cytb	Cytochrom b
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting/ Durchflusszytometrie
Fwd.	Forward
g	Schwerebeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
Grundkonz.	Grundkonzentration
HPF	High-power field/ Haupt Gesichtsfeld
HRP1	Histidin reiches Protein 1
HRP2	Histidin reiches Protein 2
HRP3	Histidin reiches Protein 3
k. <i>PCR</i>	Konventionelle <i>PCR</i>
Konz.	Konzentration
LDH	Laktatdehydrogenase
LNA	locked-nucleic acids
mA	Milliampère
max.	maximal
MGB	minor groove binder
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min.	Minuten

mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTA	Medizinisch-technische Assistentin
NAD <sup>+</sup>	oxidierte Form des Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
P.	Plasmodium
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pLDH	plasmodiale Laktatdehydrogenase
qPCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RBC	red blood cells/ Erythrozyten
RDT	rapid diagnostic test/ Schnelltest
Rev.	Reverse
RFU	relative Fluoreszenz-Units
RNA	Ribonukleinsäure
Sek.	Sekunden
SOP	Standard Operating Procedure
Tab.	Tabelle
TBS	Thick blood smear/ dicker Tropfen
Tm	Schmelztemperatur
uninf.	uninfiziert
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volumen
v2	2. Generation
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
zw.	zwischen
β-tub	β-tubulin

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Fotos der unterschiedlichen asexuellen Entwicklungsstadien von <i>P. falciparum</i> .....	5
Abb. 1-2:	Beispiel-Diagramm einer absoluten Quantifikationsanalyse.....	11
Abb. 1-3:	Malaria-Threat Map: Studien zu <i>hrp2</i> -Deletionen in <i>P. falciparum</i> Stämmen .....	12
Abb. 1-4:	Malaria-Threat Map: Studien zu <i>hrp2</i> - und <i>hrp3</i> -Codeletionen in <i>P. falciparum</i> Stämmen .....	12
Abb. 2-1:	singleplex-qPCR zur Testung der Kreuzreaktivität einzelner Komponenten. ....	31
Abb. 2-2:	Optimierungsschritte zur Erstellung eines 4plex-qPCR_v2-Protokolls. ....	35
Abb. 3-1:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Feldproben. ....	81
Abb. 3-2:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Greendot-Studien-Proben. ....	82
Abb. 3-3:	Vergleich der Ergebnisse der Feldproben aus FTA Elute Cards und Vollblutproben. ....	83
Abb. 11-1:	Gensequenz des <i>hrp2</i> Gens in 5'3' Richtung .....	112
Abb. 11-2:	Gensequenz des <i>hrp3</i> Gens in 5'3' Richtung .....	113
Abb. 11-3:	Gensequenz des $\beta$ -tubulin Gens in 5'3' Richtung .....	114
Abb. 11-4:	Gensequenz des cytochtom <i>b</i> Gens in 5'3' Richtung.....	115
Abb. 11-5:	Fehlpaarungen der neuen qPCR-Forward-Primer für <i>hrp2</i> und <i>hrp3</i> .....	116
Abb. 11-6:	Fehlpaarungen der alten qPCR-Forward-Primer für <i>hrp2</i> und <i>hrp3</i> . ....	116
Abb. 11-7:	Fehlpaarungen der neuen qPCR-Reverse-Primer für <i>hrp2</i> und <i>hrp3</i> .....	116
Abb. 11-8:	Fehlpaarungen der alten qPCR-Reverse-Primer für <i>hrp2</i> und <i>hrp3</i> . ....	116
Abb. 11-9:	Fehlpaarungen der neuen Sonden für <i>hrp2</i> und <i>hrp3</i> .....	116
Abb. 11-10:	Fehlpaarungen der alten Sonden für <i>hrp2</i> und <i>hrp3</i> .....	117
Abb. 11-11:	Fehlpaarungen der Forward-Primer für <i>hrp2</i> und <i>hrp3</i> der normalen PCR.....	117
Abb. 11-12:	Fehlpaarungen der Reverse-Primer für <i>hrp2</i> und <i>hrp3</i> der normalen PCR.....	117

## Formelverzeichnis

Formel 1-1:	WHO-Formel zur Errechnung der Parasitenanzahl pro Mikroliter .....	4
Formel 1-2:	Lambaréné-Formel zur Errechnung der Parasitenanzahl pro Mikoliter .....	4
Formel 2-1:	Berechnung der Effizienz anhand der Steigung der Standardkurve.....	50

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Herkunft der Plasmodien-Laborstämme.....	15
Tab. 2-2:	Hersteller der Reagenzien für die Zellkultur.....	15
Tab. 2-3:	Hersteller des Laborequipments für die Zellkultur.....	16
Tab. 2-4:	Hersteller des Laborequipments für die DNA-Extraktion. ....	16
Tab. 2-5:	Hersteller der Reagenzien für die konventionelle PCR. ....	16
Tab. 2-6:	Software zur Analyse der konventionellen PCR. ....	17
Tab. 2-7:	Hersteller des Laborequipments für die konventionelle PCR. ....	17
Tab. 2-8:	Hersteller der Reagenzien für die qPCR. ....	17
Tab. 2-9:	Hersteller des Laborequipments für die qPCR.....	18
Tab. 2-10:	Software zur Vorbereitung und Durchführung der qPCR. ....	18
Tab. 2-11:	Hersteller der Reagenzien für die Erstellung der Standardkurve. ....	18
Tab. 2-12:	Hersteller des Laborequipments für die Erstellung der Standardkurve. ....	18
Tab. 2-13:	Genstatus von <i>P. falciparum</i> -Laborstämmen .....	19
Tab. 2-14:	Zusammensetzung des Medium Complete.....	19
Tab. 2-15:	Parasitämien der für die DNA-Extraktion eingefrorenen Laborstämme.....	22
Tab. 2-16:	Ergebnisse der NanoDrop-Messungen der gepoolten DNA-Extrakte .....	23
Tab. 2-17:	Sequenzen und Eigenschaften der <i>hrp2_v2</i> - und <i>hrp3_v2</i> -Primer.....	26
Tab. 2-18:	Sequenzen und Eigenschaften der <i>hrp2</i> - und <i>hrp3</i> -Primer .....	27

Tab. 2-19:	Sequenzen und Eigenschaften der hrp2_v2- und hrp3_v2-Sonden.....	27
Tab. 2-20:	Sequenzen und Eigenschaften der hrp2- und hrp3-Sonden .....	27
Tab. 2-21:	Reaktionsansätze für Vergleich des neuen und alten Assays in singleplex-qPCR .....	28
Tab. 2-22:	PCR-Bedingungen für die singleplex-qPCR.....	29
Tab. 2-23:	Reaktionsansätze für Kreuzreaktivitäts-Test des neuen hrp-Assays in singleplex-qPCR.....	29
Tab. 2-24:	Erstellung der singleplex-Kreuzreaktions-Assays zur Beurteilung einzelner Komponenten..	30
Tab. 2-25:	Sequenzen und Eigenschaften der Primer für cytb und $\beta$ -tub.....	32
Tab. 2-26:	Sequenzen und Eigenschaften der Sonden für cytb und $\beta$ -tub. ....	32
Tab. 2-27:	Zuordnung der Fluoreszenzfarbstoffe und Wellenlängen der Erregung.....	33
Tab. 2-28:	Reaktionsansätze für die 4plex-qPCR_v1.....	34
Tab. 2-29:	PCR-Bedingungen bei der 4plex-qPCR_v1.....	34
Tab. 2-30:	PCR-Bedingungen im ersten Optimierungsschritt zur Erstellung des Prot. A .....	36
Tab. 2-31:	Reaktionsansätze im ersten Optimierungsschritts zur Erstellung des Prot. A .....	36
Tab. 2-32:	PCR-Bedingungen im zweiten Optimierungsschritts zur Erstellung des Prot. B.....	37
Tab. 2-33:	Reaktionsansätze im zweiten Optimierungsschritts zur Erstellung des Prot. B .....	38
Tab. 2-34:	Kombination unterschiedlicher hrp2- und hrp3-Sondenkonz.....	38
Tab. 2-35:	Erstellung der Reaktionsansätze für die Farbkompensation. ....	40
Tab. 2-36:	PCR-Bedingungen für die Farbkompensation. ....	40
Tab. 2-37:	Pf3D7 <sup>Rodi</sup> -Verdünnungsreihe .....	41
Tab. 2-38:	Parasitämien der Zellkulturen vor Erstellung der neuen Verdünnungsreihen. ....	43
Tab. 2-39:	Verdünnungsreihe mit Zugabe von Medium Complete für die neu erstellten Standards. ....	43
Tab. 2-40:	Verdünnungsreihe mit Zugabe von Vollblut für die neu erstellten Standards. ....	44
Tab. 2-41:	PCR-Bedingungen der 4plex-qPCR_v2. ....	46
Tab. 2-42:	Reaktionsansätze der 4plex-qPCR_v2 Protokoll A und B. ....	47
Tab. 2-43:	Reaktionsansatz für die konventionelle hrp2- und hrp3-PCR.....	48
Tab. 2-44:	PCR-Bedingungen für die konventionelle hrp2- und hrp3-PCR. ....	48
Tab. 2-45:	Sequenzen und Eigenschaften der hrp2- und hrp3-Primer für die konventionelle PCR. ....	49
Tab. 2-46:	Zusammensetzung der Mischung zur Befüllung der Taschen des Agarosegels. ....	49
Tab. 3-1:	qPCR-Primer- und Sondensequenzen des hrp2-Gen. ....	53
Tab. 3-2:	qPCR-Primer- und Sondensequenzen des hrp3-Gen. ....	53
Tab. 3-3:	Anzahl der Mismatches zwischen den qPCR-Primern und Sonden für hrp2 und hrp3. ....	54
Tab. 3-4:	Vergleich des neuen und alten Assays in singleplex-qPCR.....	55
Tab. 3-5:	Kreuzreaktivität der neuen hrp-Assays in singleplex-qPCR.....	56
Tab. 3-6:	hrp2-Primer-Spezifität: singleplex-qPCR.....	57
Tab. 3-7:	hrp3-Primer-Spezifität: singleplex-qPCR.....	58
Tab. 3-8:	hrp2-Sonden-Spezifität: singleplex-qPCR.....	59
Tab. 3-9:	hrp3-Sonden-Spezifität: singleplex-qPCR.....	60
Tab. 3-10:	Variation der Hybridisierungstemp.: 4plex-qPCR_v2.....	61
Tab. 3-11:	Variation der hrp3-Sondenkonz.: 4plex-qPCR_v2 .....	63
Tab. 3-12:	Variation der hrp2-Primerkonz.: 4plex-qPCR_v2 .....	64
Tab. 3-13:	Variation der cytb-Primerkonz.: 4plex-qPCR_v2 .....	66
Tab. 3-14:	Variation der cytb-Sondenkonz.: 4plex-qPCR_v2.....	67
Tab. 3-15:	Variation der $\beta$ -tub-Primerkonz. bei cytb-Sondenkonz. 150 nM: 4plex-qPCR_v2.....	69
Tab. 3-16:	Variation der $\beta$ -tub-Primerkonz. Bei cytb-Sondenkonz. 50nM: 4plex-qPCR_v2.....	70
Tab. 3-17:	Variation der $\beta$ -tub-Sondenkonz. auf max 200 nM: 4plex-qPCR_v2.....	71
Tab. 3-18:	Variation der $\beta$ -tub-Sondenkonz. auf max. 300 nM: 4plex-qPCR_v2.....	72
Tab. 3-19:	Variation der Elongationszeit: 4plex-qPCR_v2.....	74
Tab. 3-20:	Variation der hrp2- und hrp3-Sondenkonz.: 4plex-qPCR_v2.....	76
Tab. 3-21:	Vergleich der Fluoreszenzkurve/-Intensitäten zw. Bestellung 1-3 der Sonden bei 50 nM ....	78
Tab. 3-22:	PCR-Bedingungen der 4plex-qPCR_v2. ....	79
Tab. 3-23:	Reaktionsansatz der 4plex-qPCR_v2 Protokoll A .....	79

Tab. 3-24:	Reaktionsansatz der 4plex-qPCR_v2 Protokoll B. ....	80
Tab. 3-25:	Vergleich der Ergebnisse der Feldproben der 4plex-qPCR_v1 und _v2. ....	82
Tab. 3-26:	4plex-qPCR_v2 Prot. A Messung der Verdünnungsreihe des Pf3D7 <sup>Rodi</sup> -Standards ....	85
Tab. 3-27:	4plex-qPCR_v2 Prot. A Messung der Verdünnungsreihe des Pf3D7 <sup>2</sup> -Standards.....	86
Tab. 3-28:	4plex-qPCR_v2 Prot. A Messung der Verdünnungsreihe des PfHB3-Standards.....	87
Tab. 3-29:	4plex-qPCR_v2 Prot. A Messung der Verdünnungsreihe des PfDd2-Standards.....	88
Tab. 3-30:	4plex-qPCR_v2 Prot. B Messung der Verdünnungsreihe des Pf3D7 <sup>2</sup> -Standards.....	89
Tab. 3-31:	4plex-qPCR_v2 Prot. B Messung der Verdünnungsreihe des PfHB3-Standards.....	90
Tab. 3-32:	4plex-qPCR_v2 Prot. B Messung der Verdünnungsreihe des PfDd2-Standards.....	91
Tab. 3-33:	Detektionslimits der Standards nach Analyse- und Amplifikationsmethode.....	92
Tab. 11-1:	Gesamte NanoDrop-Messung .....	111

# 1 Einleitung

Malaria ist eine der global bedeutendsten Infektionskrankheiten. Für das Jahr 2019 wurde geschätzt, dass es weltweit 229 Millionen Malaria-Fälle und 406.000 Todesfälle gab. Das höchste Risiko tragen dabei Kinder und Schwangere, vorwiegend in den ländlichen Regionen von Subsahara-Afrika und Indien. Über 50 % der Malariadiagnosen konzentrieren sich auf fünf afrikanische Länder: Nigeria, Demokratische Republik Kongo, Uganda, Mozambik und Niger (World Health Organization, 2020b).

Die Malaria-Erkrankung wird durch Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht, die durch den Stich einer weiblichen Anophelesmücke übertragen werden. Insgesamt sind fünf unterschiedliche, humanpathogene Spezies bekannt: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi*.

Der Entwicklungszyklus der Plasmodien durchläuft einen obligaten Wirtswechsel. Durch den Stich einer infizierten Anophelesmücke gelangen die asexuellen Stadien, die Sporozoiten, in die menschliche Blutbahn und über diese zur Leber. Dort dringen sie in die Hepatozyten ein und entwickeln sich zu relativ großen (30 - 70 µm) sexuellen Schizonten, aus denen je nach Plasmodienart nach grob 14 Tagen zwischen 2.000 und 30.000 Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt werden. Ebenfalls abhängig von der Spezies können Gewebesporozoiten in den Hepatozyten verbleiben, sog. Hypnozoiten, und zu einem Rückfall der Erkrankung führen. Dies ist vor allem für *P. vivax* und *P. ovale* beschrieben, nicht aber für *P. falciparum*. Die aus den Schizonten freigesetzten Merozoiten infizieren die Erythrozyten im Blut und reifen im Inneren der Zellen über das Ringstadium zum Trophozoiten und dann zum Schizonten. Durch mitotische Teilung gehen aus den Schizonten sechs bis 36 Tochterzellen hervor, die durch „Platzen“ der roten Blutkörperchen als Merozoiten freigesetzt werden und erneut in Erythrozyten eindringen, wodurch sich der erythrozytäre Kreislauf schließt.

Die Reifung vom Merozoit zum Schizont dauert, abhängig von der Art, zwischen 24 und 72 Stunden – für *P. falciparum* sind 48 Stunden beschrieben. (Butcher and Mitchell, 2018; Oakley et al., 2011). Ein typisch periodischer Fieberverlauf ist

dabei häufig zu beobachten. Vor allem bei Kindern und Infektionen mit dem *P. falciparum* sind allerdings häufig auch unregelmäßige Verläufe charakteristisch (Basu and Sahi, 2017). Ein geringer Anteil der Merozoiten folgt nicht der asexuellen Teilung, sondern ist für die sexuelle Entwicklung – in männliche Mikrogametozyten bzw. weibliche Makrogametozyten – bestimmt. Werden die Gametozyten durch einen erneuten Stich wieder von einer Anophelesmücke aufgenommen, entwickeln sie sich zu den eigentlichen Geschlechtszellen und verschmelzen zur Zygote. Aus der Zygote geht durch Reduktionsteilung die Oozyste und der bewegliche Ookinet hervor, aus dem tausende Sporozoiten entstehen, die über die Speicheldrüsen der Mücke beim Stich wieder auf den Menschen übertragen werden können (Kayser et al., 2014, pp.584–596).

Während der Leberphase (ca. 10 - 14 Tage, artabhängig) sind keine Symptome bemerkbar und die Infektion ist durch diagnostische Tests nicht nachweisbar. Symptome und das Krankheitsbild einer Malaria entstehen erst während des Blutstadiums der Parasiten. Das klinische Erscheinungsbild ist unspezifisch, grippeähnlich und durch Kopfscherzen, Fieber, Schüttelfrost und Übelkeit charakterisiert. Die Schwere der Erkrankung ist primär abhängig von der Spezies der Plasmodien, Höhe der Parasitenlast und vorheriger Infektionen (erworbene Teilimmunität). Die schwersten Verläufe treten bei einer Infektion mit *P. falciparum* auf, das in Afrika südlich der Sahara für 99,7 Prozent der Malaria-Fälle verantwortlich ist (World Health Organization, 2019c). Kennzeichnend sind häufig unklare Fieberintervalle, hohe Parasitämien und die Möglichkeit schwerer Komplikationen durch zerebrale Malaria, Anämie oder Organversagen (Kayser et al., 2014, pp. 584–596).

## 1.1 Diagnostik

Eine schnelle Diagnose und ein entsprechend rascher und korrekter Behandlungsbeginn gelten als die effektivste Methode zur Prävention einer schweren Malaria. Gleichzeitig empfiehlt die WHO vor jeder beabsichtigten Malariatherapie eine vorausgehende Diagnosesicherung, um einen übermäßigen Verbrauch an Malariamedikamenten zu verhindern und die Entwicklung von Resistenzen nicht zu beschleunigen. Durch die Differenz von verabreichten Malariamedikamenten nach durchgeführter Diagnose und der Gesamtanzahl verwendeter Malriamedikamenten geht die WHO davon aus, dass weiterhin ein großer Anteil der Therapeutika ohne vorherige Diagnosesicherung bei Patient\*innen angewandt wird (World Health Organization, 2020b).

### 1.1.1 Mikroskopie

Grundlage der mikroskopischen Diagnose der Malaria ist in der Regel der „dicke Tropfen“ (thick blood smear/TBS). Dabei wird ein Blutropfen von etwa 10 Mikrolitern auf einen Objektträger gegeben, trocknen gelassen und ohne vorherige Fixierung in einer Giemsa-Lösung gefärbt. Die wässrige Lösung des Giemsas führt zur Lyse der Erythrozyten, sodass ggf. vorhandene Parasiten angereichert werden und doch gut mikroskopisch erkannt werden können. Pro Blickfeld können über mehrere Schichten relativ große Mengen Blut auf Parasiten geprüft werden (quantitativ). Für *P. falciparum* sind die durch die Färbung violett angefärbten Ringstadien charakteristisch. Trophoziten und Schizonten sind nicht im Blutausschlag von Malariapatient\*innen zu finden, da diese an Endothelzellen binden, somit nicht im peripheren Blut zirkulieren und nicht im dicken Tropfen zu finden sind (Sherman et al., 2003).

Zur Bestimmung der Parasitämie, d.h. der Anzahl der Parasiten pro Volumen ( $\mu$ l oder ml) Blut, sind zwei etablierte Methoden bekannt. Im Rahmen der WHO-Methode wird der Dicke Tropfen nach Giemsafärbung bei 100-facher Vergrößerung mit Immersionsöl angeschaut und in jedem Blickfeld die Anzahl an Parasiten sowie die Anzahl der Leukozyten gezählt, bis eine Gesamtanzahl von 1.000 Leu-

kozyten gezählt wurden. Die gemessene oder angenommene Menge an Leukozyten im Blut (in diesem Fall 8.000 / $\mu$ l) wird dabei als Referenz herangezogen (vgl. Formel 1-1).

$$\frac{\text{Anzahl gezählter Parasiten} \cdot 8.000}{\text{Anzahl gezählter Leukozyten}} = \text{Parasiten}/\mu\text{l}$$

*Formel 1-1: WHO-Formel zur Errechnung der Parasitenanzahl pro Mikroliter (Weltgesundheitsorganisation, 2010)*

Bei der „Lambaréné-Methode“ werden sowohl die Anzahl der Parasiten als auch die Anzahl an gelesenen Haupt Gesichtsfeldern (high-power field/HPF) gezählt (mindestens 100). Für die abschließende Berechnung muss nun noch der Mikroskopfaktor, also die Gesamtvergrößerung des Mikroskops, bekannt sein. Entsprechend der Formel 1-2 kann dann auf die Anzahl der Parasiten/ $\mu$ l Blut hochgerechnet werden (Joanny et al., 2014).

$$\frac{\text{Anzahl gezählter Parasiten}}{\text{Anzahl gezählter HPFs}} \cdot \text{Mikroskopfaktor} = \text{Parasiten}/\mu\text{l}$$

*Formel 1-2: Lambaréné-Formel zur Errechnung der Parasitenanzahl pro Mikoliter (Joanny et al., 2014).*

Die Erkennung der einzelnen Ringe sowie die Unterscheidung zu Artefakten erfordern viel Übung. Die Expertise der jeweiligen Mikroskopist\*innen hat daher starken Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität dieser Methode (Kahama-Maró et al., 2011).

Neben dem dicken Blutausrich kann ggf. zur besseren Differenzierung der einzelnen Plasmodienarten, bzw. bei Mischinfektionen ein dünner Blutausrich gemacht werden (vgl. Abb. 1-1). Dieser wird mit Methanol vor der Färbung in der Giemsa-Lösung fixiert, sodass die Erythrozyten erhalten bleiben (Weltgesundheitsorganisation, 2010).

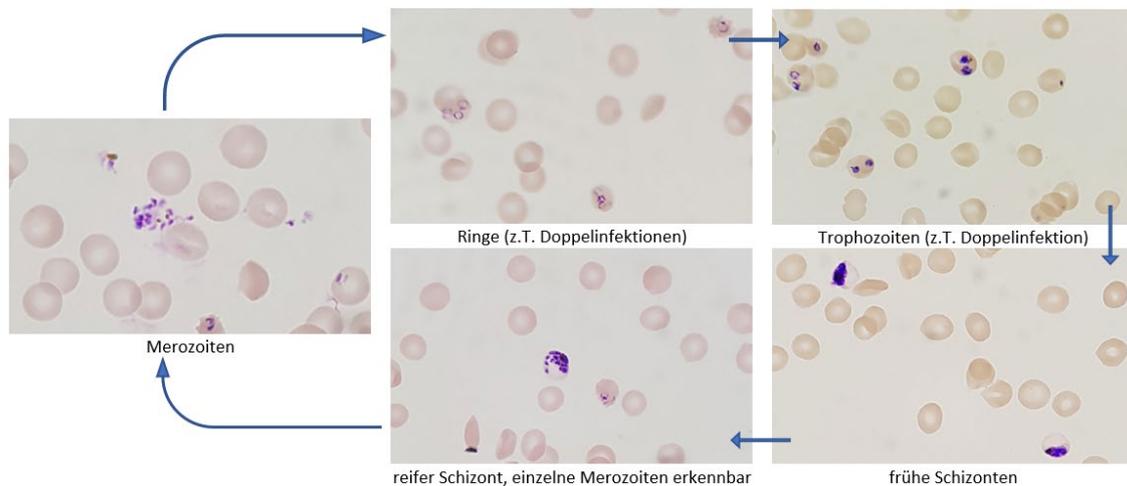


Abb. 1-1: Fotos der unterschiedlichen asexuellen Entwicklungsstadien von *P. falciparum* im Blutaussstrich bei 100-facher Vergrößerung unter Immersionsöl (eigene Fotografien).

Bis jetzt gilt die Mikroskopie bzw. der „Dicke Tropfen“ noch immer als der Goldstandard der Malariadiagnostik. Die Technik weist ein Detektionslimit von ca. 100 Parasiten/ $\mu\text{l}$  auf (World Health Organization, 1988), ist kostengünstig sowie äußerst spezifisch – vorausgesetzt die Mikroskopist\*innen sind sehr erfahren.

### 1.1.2 Schnelltests

Malaria-Schnelltests, sogenannte *RDTs* (*rapid diagnostic tests*), beruhen auf dem Prinzip der Immunchromatographie. Zur Durchführung des Tests werden ein Blutropfen aus der Fingerbeere und ein Lysepuffer an einem Ende einer Test-Kassette aufgetragen. Die zu detektierenden Antigene, die bei einer vorliegenden Infektion im Blut zirkulieren, binden dort an einen mit einem Farbstoff markierten, rekombinanten Antikörper. Als Komplex laufen sie an einem Nitrocellulose-Streifen, durch Kapillarkräfte bewegt, entlang, bis sie auf den ersten Teststreifen treffen. An diesem befinden sich immobilisierte, rekombinante Antikörper gegen das entsprechende Antigen. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird dort gebunden und es erscheint eine farbige, sichtbare Bande. Weiter aufwärts des Nitrocellulose-Streifens befindet sich eine Positiv-Kontrollbande, an der sich gebundene Antikörper gegen die mit Farbstoff markierten Antikörper befinden und diese binden. Sie dient der Kontrolle, ob ausreichend Antikörper vorhanden sind

und ob die Proteine die gesamte Länge des Nitrocellulose-Streifens entlanggelaufen sind. Bei einem auswertbaren Testergebnis sollte daher die Kontrollbande grundsätzlich positiv erscheinen und lediglich die Testbande Aufschluss über das Vorhandensein des Antigens geben (World Health Organization, 2006).

Für diese indirekte Detektion von Plasmodien-Infektionen im Blut eignen sich mehrere plasmodiale Proteine als Biomarker: plasmodiale Laktatdehydrogenase (pLDH), Histidin-reiches Protein 2 (HRP2) und die plasmodiale Aldolase (Krampa et al., 2017).

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym des anaeroben Stoffwechsels. Es katalysiert die Umwandlung des durch Glucoseabbau anfallenden Pyruvats in Laktat und dient gleichzeitig der Regeneration des  $\text{NAD}^+$ . Die stärkste Expression des Enzyms bei Plasmodien wird im frühen Ringstadium erreicht, in welchem die höchste Stoffwechselaktivität stattfindet (Bozdech et al., 2003). pLDH weist Spezies-spezifische Sequenzunterschiede auf, die durch die Entwicklung entsprechend spezifischer monoklonaler Antikörper eine Unterscheidung der Plasmodienarten durch entsprechend entwickelte *RDTs* ermöglichen. Allerdings haben sich pLDH-basierte *RDTs* als nicht sehr stabil erwiesen und pLDH kommt im Vergleich zu HRP2 in geringerer Konzentration im Blut vor. Diese Tests sind weniger sensitiv als HRP2-basierte *RDTs* (Chiodini et al., 2007).

*RDTs* spielen vor allem in den ländlichen Regionen Afrikas, den Hauptendemiegebieten der Malaria, eine große Rolle. Gute Mikroskope und entsprechende Expertise sind dort nicht überall und immer gegeben. Durch die Einführung der *RDTs* wurde der Zugang zu einer Diagnose entscheidend verbessert. Wenngleich HRP2-basierte *RDTs* durch die lange Halbwertszeit von HRP2 im Blut keine Aussage über den Erfolg einer therapeutischen Intervention erbringen können (Mayxay et al., 2001), bieten sie im Vergleich zur Mikroskopie jedoch den erheblichen Vorteil, keine Elektrizität und aufwendig ausgebildetes Personal zu benötigen. In Subsahara-Afrika werden mittlerweile 75 % der Malariadiagnosen mittels *RDTs* bestimmt (World Health Organization, 2018b). Parasitenlasten von über 200 Parasiten/ $\mu\text{l}$  sollten dabei zuverlässig durch die *RDTs* erkannt werden (World Health Organization, 2019b).

### 1.1.2.1 HRP2 und HRP3

Das Genom von *P. falciparum* weist drei Histidin-reiche Proteine auf: HRP1 induziert die Bildung von Ausstülpungen der Membran infizierter Erythrozyten, wodurch die Zytoadhärenz an das Endothelium vermittelt wird. Es ist spezifisch für *P. falciparum*, wird allerdings nur in *knob-positiven* Stämmen exprimiert (Leech et al., 1984). HRP2 und HRP3 sind lösliche Proteine, die von den Parasiten in und aus den Erythrozyten heraus transportiert werden. Zusätzlich gelangen sie durch „Platzen“ der Erythrozyten im Schizontenstadium in großen Mengen ins Blut (Howard et al., 1986) und können ebenfalls im Speichel und im Urin detektiert werden (Castro-Sesquen et al., 2016; Fung et al., 2012; Rodriguez-del Valle et al., 1991; Samal et al., 2017). HRP2 und HRP3 sind sehr stabil und sind selbst nach Eradikation der Plasmodien im Blut noch bis zu vier Wochen im Blut nachweisbar (Shiff et al., 1993; Uguen et al., 1995). HRP3 kommt dabei jedoch in wesentlich geringerer Konzentration vor als HRP2 (Sharma, 1988). HRP2 und HRP3 werden in allen erythrozytären Stadien von *P. falciparum* synthetisiert, v.a. aber im Ringstadium (Baker et al., 2011). Dadurch, dass sich die Proteine in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich sind, kann es zu Kreuzreaktionen von entsprechenden monoklonen Antikörpern kommen, die jedoch nur schwer zu quantifizieren sind.

Auf DNA Ebene gibt es, abgesehen von der grundsätzlich vorhandenen Histidinreichen Region in Exon 2, zwischen *hrp1* und *hrp2* keine großen Übereinstimmungen. Hingegen zeigen die Sequenzen von *hrp2* und *hrp3* große Ähnlichkeiten, inklusive in der namensgebenden Histidin-reichen Region von Exon 2, die durch Alanin- und Histidin-Wiederholungen charakterisiert ist. *Hrp2* und *hrp3* kommen nur bei *P. falciparum* vor und nicht bei den anderen humanpathogenen Plasmodienarten. Beide Gene liegen jeweils als einfache Kopie im Genom vor und zeigen eine Exon1–Intron–Exon2-Struktur. *Hrp2* ist 1064 bp lang und liegt in der Subtelomer-Region von Chromosom 8, *hrp3*, mit einer Länge von 977 bp, ist in der Subtelomer-Region von Chromosom 13 lokalisiert (Harris et al., 2002; Seeger et al., 2002; Wellems and Howard, 1986). Die genaue Funktion der beiden Proteine ist nicht bekannt. Mehrere Studien weisen jedoch auf eine Interaktion mit Häm hin, mit welchem sie Komplexe zu bilden scheinen und womöglich

an der Entgiftung des Häms durch die Bildung des Hämozoins beteiligt sind (Choi et al., 1999; Ziegler et al., 1999). Das Häm fällt nach Spaltung des Hämoglobins und Abbau des Globins für den Stoffwechsel des Parasiten an. Es wird anschließend im Inneren der Plasmodien in Vakuolen gespeichert (Kolakovich et al., 1997). Abgesehen davon besteht eine Korrelation zwischen der Konzentration an HRP2 im Blut und dem Auftreten von zerebraler Malaria (Aikawa et al., 1990). Man vermutet, dass HRP2 zu einer erhöhten Zytokinausschüttung führt, wodurch die Permeabilität des Endotheliums auf zerebraler Ebene erhöht wird und die schwerwiegenden zerebralen Symptome hervorgerufen werden (Pal et al., 2016).

#### **1.1.2.2 Falsch-negative Schnelltests**

In einigen Studien werden falsch-negative Schnelltest-Ergebnisse beschrieben. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Die WHO weist auf Ursachen wie Schnelltests geringer Qualität, schlechte Vergleichsdiagnostik und unangemessenen Lagerungs- oder Transportbedingungen hin. Seit 2008 werden die Produkte der verschiedenen Hersteller daher einer Warentestung unterzogen und die Ergebnisse anschließend in einem Dokument auf der Seite der WHO veröffentlicht (Kahama-Maró et al., 2011; World Health Organization, 2018a). Anhand dieser Daten können, entsprechend der Rahmenbedingungen in den bestimmten Regionen, die Schnelltests mit den besten Ergebnissen bei den jeweils vorherrschenden relevanten Faktoren ermittelt werden (World Health Organization, 2018a).

Neben diesen Gründen für das Vorliegen falsch-negativer Schnelltest-Ergebnisse, kann das Scheitern der Schnelltests außerdem durch eine Deletion des *hrp2*-Gens und/oder *hrp3*-Gens und damit dem Fehlen des nachzuweisenden HRP2-Proteins bzw. HRP3-Proteins zustande kommen.

#### **1.1.3 Molekulare Techniken**

Die bisher sensitivsten Methoden zur Erkennung von Infektionen werden durch molekulare Nachweistechiken erreicht, die das Vorhandensein *P. falciparum*-spezifischer Gene in Blut-, Urin- oder Stuhlproben von Patient\*innen nachweisen. Grundlage ist dabei immer die spezifische Vervielfältigung bestimmter Gene.

### 1.1.3.1 PCR

In den meisten Veröffentlichungen wird der Nachweis einer Plasmodien-Infektion mittels *PCR* beschrieben. Als Targets eignen sich Gene, welche in einer erhöhten Kopienzahl im Genom der Plasmodien vorliegen. Am häufigsten wird in der Literatur die Detektion der 18S-ribosomalen rDNA beschrieben (Adams et al., 2015; Singh et al., 1999; Snounou et al., 1993; Swan et al., 2005). Dieses Gen liegt in 5 - 8 Kopien vor (Amaral et al., 2019). Neuere Versuche nutzten als Target die nicht ribosomalen *Pvr47*- und *Pfr364*-Gene, welche in 14 - 41 Kopien im *P. falciparum*-Genom vorliegen (Amaral et al., 2019) oder zwei Gene der Subtelomer- und Telomer-Region „*TARE-2*“ mit zirka 250 Kopien pro Genom und „*varATS*“ mit 59 Kopien pro Genom. Hierbei wurden Detektionslimits von bis zu unter 0,1 Parasiten/μl beschrieben (Hofmann et al., 2015).

Neben den Genen für die Ribosomen werden zur Detektion auch mitochondriale Gene verwendet - zum Beispiel das Gen *cytochrom b*. Bei *P. falciparum* geht man hierbei von 20 Kopien pro Plasmodium aus. Auch hier wurden Detektionslimits von unter 0,1 Parasiten/μl beschrieben (Farrugia et al., 2011; World Health Organization, 2019a).

### 1.1.3.2 Real-time PCR

Bei der Quantifizierung von Nukleinsäuren zeigt die *real-time PCR* (*qPCR*) gegenüber der konventionellen *PCR* (k. *PCR*) eine klare Überlegenheit. Hierbei wird die Vervielfältigung der DNA mittels sequenzspezifischer Sonden (z.B. *hydrolysis probes*) während der Amplifikation – also in *real-time* – über die Messung des Fluoreszenzsignals detektiert. Der Vergleich mit einem Standard kann nicht zuletzt auch Rückschluss auf die Konzentration der ursprünglich eingesetzten DNA geben.

Dafür sind die Sonden zusätzlicher Bestandteil für die Durchführung der *qPCR*. Sie bestehen aus einer Oligonukleotid-Sequenz komplementär zu einem Abschnitt des zu amplifizierenden Gens. *Hydrolysis probes* (früher *Taqman probes* genannt) haben zwei Fluoreszenzfarbstoffe: *quencher* am 5'-Ende des Oligonukleotids und *reporter* am 3'-Ende. Die Sonde bindet, ähnlich wie die Primer, im

Hybridisierungs-Schritt der *PCR* an die DNA und erzeugt dadurch einen Abschnitt doppelsträngig vorliegender DNA. Gegebenenfalls kann das 3'-Ende der Sonde mit einer *Minor-groove-binder (MGB)*-Sequenz modifiziert werden, um die Bindungsspezifität zu erhöhen. Es lagert sich in die kleine Furche der Doppelhelix an und verbessert die Bindung der Sonde an die DNA. Daraus resultiert eine erhöhte Schmelztemperatur und Spezifität der Bindung (Kutyavin et al., 2000). Während die Sonde gebunden an der DNA vorliegt, befinden sich *quencher* und *reporter* in räumlicher Nähe und das Signal des *reporters* wird durch den angeregten *quencher* unterdrückt. Sobald die Polymerase den DNA-Strang entlangläuft, bricht es die Oligonukleotid-Sequenz der Sonde auf, wodurch *quencher* und *reporter* voneinander abdiffundieren und mit speziellen Filtern das Signal des *reporters* detektiert werden kann.

Je mehr DNA vorhanden ist, desto mehr Bindungen werden zwischen *quencher* und *reporter* aufgebrochen und die Intensität des Fluoreszenzsignals nimmt zu. Wird dieses Fluoreszenzsignal nach jedem Zyklus während des Ablaufs einer *qPCR* in einem Diagramm wie in Abb. 1-2 aufgezeichnet, sollte sich eine sigmoide Kurve ergeben. Der Wendepunkt dieser Kurve, bzw. der Hochpunkt der ersten Ableitung der Kurve, kennzeichnet dabei den Punkt ( $C_q$  = quantification cycle), ab welchem Zyklus das Fluoreszenzsignal der Sonde intensiver ist als die Hintergrund-Fluoreszenz und somit die Probe als positiv gewertet werden kann. Das wird bei einer Anzahl von ca.  $10^{11}$  -  $10^{12}$  DNA-Molekülen erreicht (Roche Diagnostics GmbH, 2008, p. 167). Bei einer hohen Ausgangskonzentration eines Gens ergibt sich somit ein  $C_q$ -Wert von nur wenigen Zyklen.

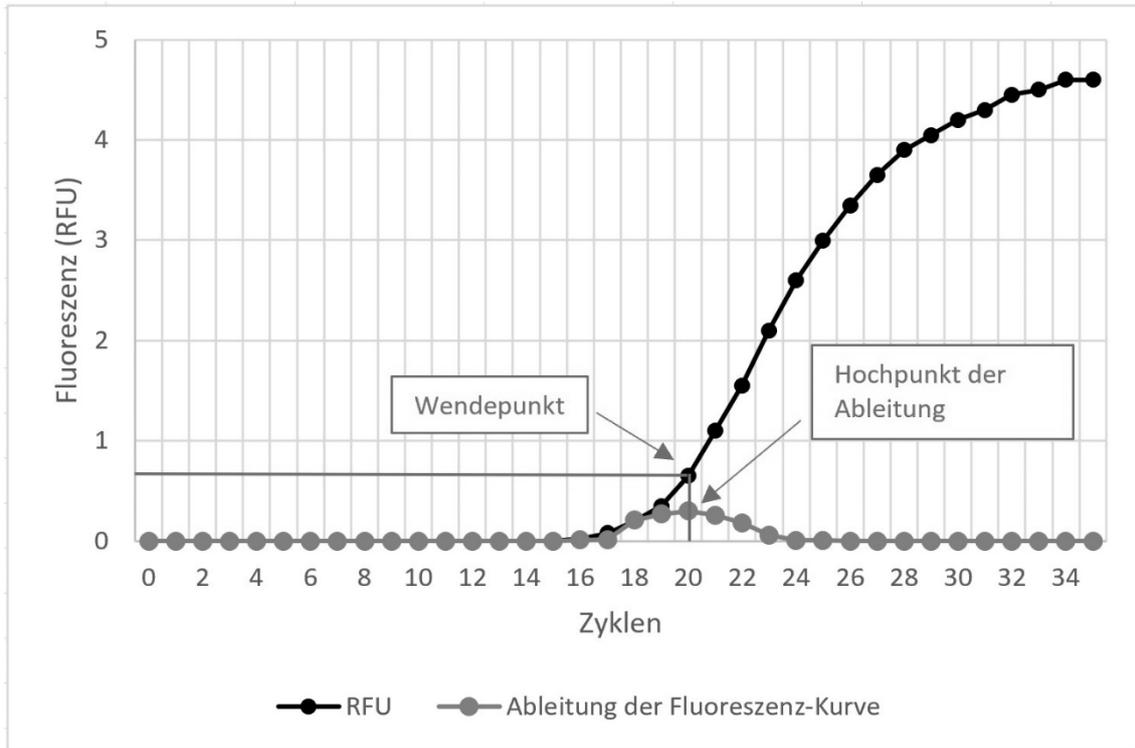


Abb. 1-2: Beispiel-Diagramm einer absoluten Quantifikationsanalyse mit Wendepunkt der sigmoidalen Kurve, bzw. Hochpunkt der ersten Ableitung (eigene Grafik in Anlehnung an Roche Diagnostics GmbH, 2008, p. 167).

## 1.2 Detektion von *hrp2*- und *hrp3*-Deletionen

In der Amazonasregion Perus wurde 2010 erstmals das Auftreten falsch-negativer Schnelltest-Ergebnisse für Malaria aufgrund einer Deletion des *hrp2*-Gens und auch des *hrp3*-Gens von *P. falciparum* beschrieben. Durch das Fehlen von HRP2 im Blut fällt das RDT-Ergebnis trotz einer *P. falciparum*-Infektion negativ aus (Gamboa et al., 2010). Berichte aus anderen Ländern, unter anderem aus der Demokratischen Republik Kongo, Eritrea, Ghana, Kenya, Rwanda und Indien folgten. Die berichteten Prävalenzen weichen dabei zum Teil weit voneinander ab (Amoah et al., 2016; Berhane et al., 2018; Beshir et al., 2017; Kozycki et al., 2017; Kumar et al., 2013; Parr et al., 2017; Pati et al., 2018).

Eine von der WHO veröffentlichte, interaktive Karte zeigt eine Zusammenfassung aller Studien, die zur Erfassung von *hrp2*- und *hrp3*-Gendeletionen bislang durchgeführt wurden und ermöglicht die Anzeige von *hrp2*-Deletion (vgl. Abb. 1-3) und Doppeldeletion von *hrp2* und *hrp3* (vgl. Abb. 1-4).



Abb. 1-3: Malaria-Threat Map: Studien zu *hrp2*-Deletionen in *P. falciparum* Stämmen (World Health Organization, Stand: 02.08.2020).

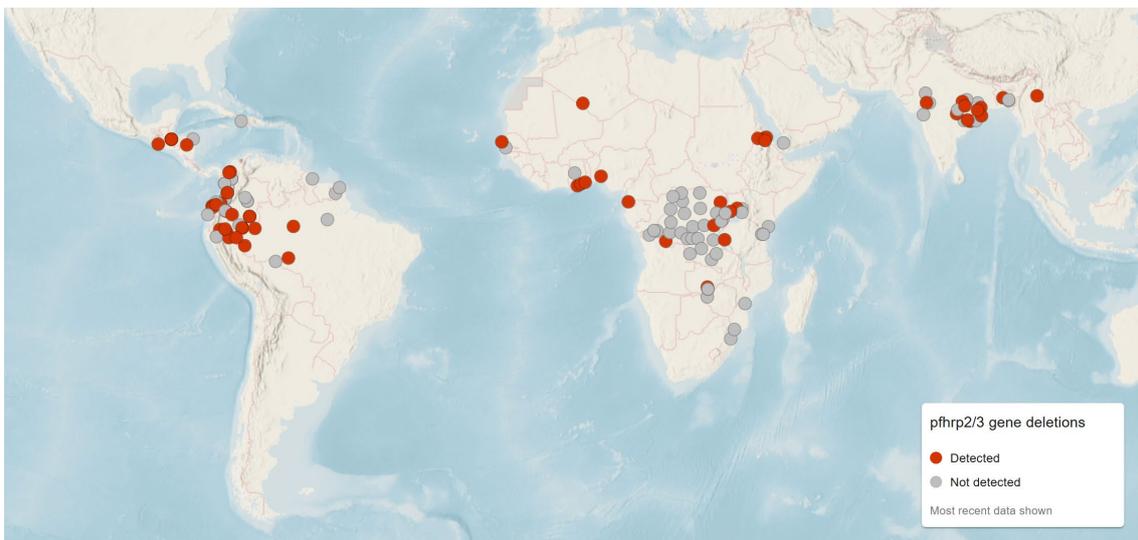


Abb. 1-4: Malaria-Threat Map: Studien zu *hrp2*- und *hrp3*-Codeletionen in *P. falciparum* Stämmen (World Health Organization, Stand: 02.08.2020).

Weitere Forschungsergebnisse zeigten, dass nicht nur Deletionen eine relevante Rolle für falsch-negative Schnelltests spielen, sondern auch die große Variabilität in der Alanin-Histidin-Region die Detektion beeinflusst (Kumar et al., 2012; Li et al., 2015; Willie et al., 2018). Hierbei unterliegt *hrp2* einer höheren Variabilität als *hrp3* (Kumar et al., 2012).

Neben falsch-negativen Testergebnissen wurden aber auch positive Testergebnisse HRP2-basierter Schnelltests beschrieben, die trotz einer *hrp2*-Deletion zu-

stande kamen, vermutlich aufgrund einer Kreuzreaktivität der Schnelltest-Antikörper mit HRP3 (Amoah et al., 2016; Beshir et al., 2017). Eine kompensatorische Erhöhung des HRP3-Levels im Blut bei Abwesenheit von HRP2 konnte allerdings nicht festgestellt werden (Baker et al., 2011).

Für die globale Malaria-Eliminierung ist es von großer Bedeutung, die Prävalenzen der *hrp2/hrp3*-deletierten Plasmodium-Stämme zu kennen. Die HRP2-basierten *RDTs* sind weit verbreitet und es fehlt ein adäquater Ersatz. Durch Infektionen *hrp2/hrp3*-deletierter Plasmodien, die durch die Schnelltests nicht entdeckt werden, entfällt oder verspätet sich die Kontrolle der Infektion und die Verhinderung der Verbreitung mittels Chemotherapie – es kann zum Selektionsvorteil dieser Stämme kommen und die Parasiten könnten nicht zuletzt auch in Malaria-freie Gebiete wieder eingeschleppt werden. Die WHO wertet daher die Deletionen als eine Bedrohung für die Malaria-Eliminierungsziele und ruft zur Bestimmung der Prävalenzen durch epidemiologische Studien auf. Sie empfiehlt dabei nicht nur das Vorhandensein von *hrp2*, sondern ebenfalls das Vorhandensein von *hrp3* zu untersuchen (World Health Organization, 2020a).

Die Prävalenzen *hrp2/hrp3*-Gen-deletierter Plasmodien-Infektionen festzustellen und von anderen Ursachen wie zu niedrigen Parasitenlasten zu unterscheiden, erfordert eine Diagnostikmethode, die auch bei niedrigen Parasitämien noch sensitive und spezifische Ergebnisse verspricht. Dabei ist der Nachweis des Nicht-Vorhandenseins grundsätzlich ein schwieriges Konzept. Die *PCR* zur Amplifikation des *hrp2/hrp3*-Locus bietet die verlässlichste Methode. Zwar sind auch hier falsch-negative Ergebnisse durch Parasitenlasten, die unterhalb der Nachweisgrenze liegen, möglich – dieser Anteil ist jedoch wesentlich geringer als durch die *RDTs*.

Für die epidemiologische Prävalenzbestimmung sollte der Nachweis bei diesen Studien daher mit der hochsensitiven *qPCR*-Technologie erfolgen, wie es in den meisten Studien der letzten Jahre auch erfolgte (Berhane et al., 2018; Beshir et al., 2017; Kozycki et al., 2017; Owusu et al., 2018; Pati et al., 2018).

### 1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung einer *multiplex*, quantitativen *real-time PCR* zur Detektion von *P. falciparum* mit *hrp2*- und *hrp3*-Deletionen. Die *qPCR* kontrolliert parallel das Vorhandensein einer *P. falciparum*-Infektion und beinhaltet zudem eine Qualitätskontrolle. Ein erstes Protokoll wurde bereits in der Arbeitsgruppe erstellt (Rodi, 2018, nicht veröffentlicht; Trauner, 2019) und die *qPCR*-Assays zur Detektion von *hrp2* und *hrp3* sollen nun in ihrer Spezifität verbessert werden. Das optimierte Protokoll soll dann an klinischen Proben aus Lambaréné, Gabun (CERMEL), zur Anwendung kommen und erste Informationen bezüglich vorhandener Deletionen in der dortigen Parasitenpopulation liefern. Letztlich soll ein Vergleich der Sensitivität vorhandener Protokolle zu diesem verbesserten Protokoll durchgeführt werden.

## 2 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden erforderten neben der Durchführung der quantitativen *real-time PCR* (*qPCR*) zuvor das Kultivieren der als Kontrollen dienenden Parasiten-Zelllinien, die DNA-Extraktion dieser Parasiten sowie der klinischen Proben und das Durchführen der konventionellen *PCR* als Vergleichsmethode.

### 2.1 Material

Es werden nur die Materialien erwähnt, die zur Wiederholbarkeit der Versuche von Bedeutung sind.

#### 2.1.1 Parasitenkultur

Tab. 2-1: Herkunft der Plasmodien-Laborstämme

<i>P. falciparum</i> -Stamm	Hersteller
Pf3D7	Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (ATCC; USA)
PfDd2	
PfHB3	

Tab. 2-2: Hersteller der Reagenzien für die Zellkultur.

Produktbezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
Medium (RPMI 1640)	R0883	Merck KgaA, Darmstadt (Germany)
Albumax II	11021-037	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
HEPES solution (1 M, 100 ml)	H0887	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
L-Glutamin (200 mM)	25030-024	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Gentamycin (50 mg/ml)	15750-045	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Erythrozyten Konzentrat (Blutgruppe 0, positiv)		Blutspendezentrale Tübingen
Giemsa	109204	Merck, Darmstadt (Deutschland)

Tab. 2-3: Hersteller des Laborequipments für die Zellkultur.

Bezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
LD Säulen	130-342-901	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
QuadroMACS® Separator	130-090-976	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)

## 2.1.2 DNA-Extraktion

Tab. 2-4: Hersteller des Laborequipments für die DNA-Extraktion.

Produktbezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
NanoDrop	ND-1000	NanoDrop Technologies, Montchanin (USA)
QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit	51106	Qiagen, Hilden (Deutschland)

## 2.1.3 PCR

Tab. 2-5: Hersteller der Reagenzien für die konventionelle PCR.

Produktbezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
Primer <i>hrp2</i> ; <i>hrp3</i>		Eurofins Genomics, Ebersberg (Deutschland)
Taq DNA Polymerase, 5 units/µl	1005476	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
<i>dNTPs</i>	M30154100	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm (Deutschland)
Q-Solution	160019701	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
10x Buffer	154054741	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
Nuclease-Free Water	129114	QIAGEN, Hilden (Deutschland)
SeaKem® LE Agarose	50004	Lonza, Basel (Schweiz)

Tab. 2-6: Software zur Analyse der konventionellen PCR.

Produktbezeichnung	Hersteller
QIAxcel Screen Gel <sup>®</sup> software	QIAGEN, Hilden

Tab. 2-7: Hersteller des Laborequipments für die konventionelle PCR.

Produktbezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
96-Well PCR Platte	710884	Biozym, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
SealMat für 96 Well Platte	710889	Biozym, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Thermal Cycler	PTC-200	MJ Research, Watertown (USA)
Sub-Cell <sup>®</sup> GT Cell	1704401	Bio-Rad, Hercules (USA)
QIAxcel	9002123	QIAGEN, Hilden (Deutschland)

## 2.1.4 qPCR

Tab. 2-8: Hersteller der Reagenzien für die qPCR.

Produktbezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
Primer <i>hrp2/hrp2_v2</i> , <i>hrp3/hrp3_v2</i> , <i>cytb</i> , <i>β-tub</i>		Eurofins Genomics, Ebersberg
Sonden <i>hrp2/hrp2_v2</i> , <i>hrp3/hrp3_v2</i> , <i>β-tub</i>		
Sonde <i>cytb</i>		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
SensiFAST <sup>™</sup> Probe No-ROX Kit	BIO-86005	Bioline, London (Großbritannien)
TaqMan <sup>™</sup> Multiplex Master Mix	4484264	Thermo Fisher Scientific Baltics UAB (Litauen)

Tab. 2-9: Hersteller des Laborequipments für die qPCR.

Produktbezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
DNA/RNA UV-cleaner box UVT-S-AR		Biosan, Riga (Latvia)
QIAgility™		Qiagen, Hilden (Germany)
LightCycler® 480 II		Roche, Pleasanton (USA)
480 Multiwell Palette	04729749001	Roche Diagnostics
LightCycler® 480 Sealing Foil	04729757001	Roche, Pleasanton (USA)

Tab. 2-10: Software zur Vorbereitung und Durchführung der qPCR.

Produktbezeichnung	Hersteller
LightCycler® 480 Software 1.5.1	Roche, Pleasanton (USA)
QIAgility Pure Precision 4.17.1	QIAGEN, Hilden

## 2.1.5 Standardkurve und Detektionslimit

Tab. 2-11: Hersteller der Reagenzien für die Erstellung der Standardkurve.

Produktbezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
Hoechst 33342	H1399	Thermo Fisher Scientific

Tab. 2-12: Hersteller des Laborequipments für die Erstellung der Standardkurve.

Produktbezeichnung	Produkt-Nr.	Hersteller
QIASymphony		QIAGEN, Hilden
QIASymphony DSP DNA Midi Kit	93725596	QIAGEN, Hilden
BD FACSCanto™ II Flow Cytometer		BD Biosciences

## 2.2 Methoden

Die Beschreibung der Methoden beschränkt sich auf eine auf Verständlichkeit konzentrierte Zusammenfassung. Für die exakte Durchführung sind jeweils einzelne Protokolle und SOPs vorhanden, auf die sich innerhalb dieser Arbeit in einigen Fällen bezogen wird.

### 2.2.1 Zellkultur

Drei unterschiedliche Laborstämme von *P. falciparum* mit bekanntem Genstatus der *hrp2*- und *hrp3*-Gene wurden in *In-vitro*-Kultur gehalten (vgl. Tab. 2-13).

Tab. 2-13: Genstatus von *P. falciparum*-Laborstämmen bezüglich der Gene *hrp2*, *hrp3*,  $\beta$ -tubulin und cytochrom *b*.

	<i>hrp2</i>	<i>hrp3</i>	$\beta$ -tubulin	cytochrom <i>b</i>
PfDd2	X	✓	✓	✓
PfHB3	✓	X	✓	✓
Pf3D7	✓	✓	✓	✓

Die optimalen Bedingungen für die Plasmodien wurden durch Kultivieren der Parasiten in *Medium Complete* (vgl. Tab. 2-14) und unter Zugabe von Erythrozytenkonzentrat (Blutgruppe 0+) bis zu einem Hämatokritwert von 2,5 % geschaffen. Die Kulturflaschen wurden bei 37 °C in einem Inkubator bei 5 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid inkubiert.

Tab. 2-14: Zusammensetzung des *Medium Complete*.

Inhaltsstoffe und deren Grundkonz.	Volumen in ml
Medium (RPMI 1640)	500
Albumax II Lösung	50
HEPES solution (1 M)	12
L-Glutamin (200 mM)	6
Gentamycin (50 mg/ml)	0,5

Täglich, mit Ausnahme an den Wochenenden, wurden dünne Blutausrichthe der Kultur gemacht und das Medium ausgetauscht. Der auf einem Objektträger ausgetrichene Blutropfen wurde 10 Sekunden in 100 % Methanol fixiert und nach anschließender Trocknung ca. 20 Minuten in einer 5 %-igen Giemsa-Lösung gefärbt (in Phosphatpuffer). Die anschließend durch Auszählung am Mikroskop bestimmte Parasitämie sollte für optimales Wachstum der Parasiten 1 % nicht wesentlich übersteigen. Je nach bestimmter Parasitämie wurde die Kultur anschließend verdünnt.

#### **2.2.1.1 Auftauen der Laborstämme**

Die drei unterschiedlichen Laborstämme wurden aus einem Kryoröhrchen (- 150 °C) aufgetaut und dann in Kultur gegeben. Dazu wurde zunächst 12%-iges Natriumchlorid (steril) und nach 5-minütiger Inkubation 1,6 %-iges Natriumchlorid (steril) der Kultur tröpfchenweise schwenkend hinzugegeben und anschließend durch Abnahme des Überstandes nach Zentrifugation wieder entfernt. Nach Waschung mit *Medium Complete* und Verwurf des abzentrifugierten Überstandes wurde das Pellet in eine Kulturfalsche übertragen, das Blutvolumen durch Erythrozytenkonzentrat ggf. auf 500 µl aufgefüllt und 19,5 ml *Medium Complete* hinzugefügt.

#### **2.2.1.2 Synchronisation der Parasitenstadien**

Für die DNA-Extraktion wurden die Plasmodien bei einer relativ hohen Parasitämie vor allem im Ringstadium benötigt, da das Hämozoin, das der Schizont speichert, die DNA-Gewinnung inhibieren kann.

Zur Synchronisierung einer Kultur wurden zwei Strategien angewandt.

Die erste Variante bietet den Vorteil, die Kultur in zwei Fraktionen aufzuteilen. Hämozoin ist ein paramagnetisches Polymer, welches sich nach Verstoffwechslung des Hämoglobins in den Trophozoiten und Schizonten anreichert. In Ringstadien und Merozoiten ist es noch nicht zu finden. Aufgrund des magnetischen Effekts des Hämozoin bleibt die Fraktion der Schizonten und Trophozoiten an einem Magneten hängen, währenddessen die Fraktion der nicht-infizierten Erythrozyten und der mit Ringstadien infizierten Erythrozyten aufgrund des lediglich

vorhandenen diamagnetischen Hämoglobins an dem Magneten vorbei läuft (Paul et al., 1981).

Die Parasitenkultur wurde auf eine an einem Magneten befestigte Säule mit Filter pipettiert (vgl. LD columns, Tab. 2-3). Vor und nach Durchlauf der Kultur wurde die Säule mit *Medium Complete* gespült. Die mit Schizonten infizierten Erythrozyten bleiben innerhalb des Filters hängen, während die Fraktion der Merozoiten- und Ringstadien als Durchlauf unter der Säule aufgefangen werden konnten. Nach Entfernen der Säule von dem Magneten wurde eine zweite Spülung mit *Medium Complete* durchgeführt. Mit dem Durchlauf dieser Spülung wurde die Fraktion der Schizonten gewonnen. Beide Kulturen wurden in einem Falcon bei 1800  $\times g$  für fünf Minuten zentrifugiert und das Pellet unter Zugabe von *Medium Complete* und ggf. Erythrozytenkonzentrat in separate Kulturflaschen gegeben, in denen sich dann die jeweils gegensätzlich synchronen Kulturen befanden.

Die zweite Variante zur Synchronisation einer Kultur basiert auf Sorbitol. Während der unterschiedlichen Blutstadien der Parasiten variiert die Permeabilität der Zellmembran für Anionen und Zucker. Die Zugabe des Sorbitols führt zu einer hypotonischen Lyse der mit Schizonten infizierten Erythrozyten (Lambros and Vanderberg, 1979).

Das Pellet der Kultur wurde dazu tröpfchenweise mit 5 %-iger, steril filtrierter Sorbitollösung versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation und Verwurf des Überstands wurde zweimal mit 10 ml *Medium Complete* gewaschen und anschließend das Pellet wieder in eine Kulturflasche unter Zugabe von 19,5 ml *Medium Complete* übertragen. Durch diese Methode werden ältere Stadien wie Trophozoiten und Schizonten zum Lysieren gebracht und vor allem Ringstadien verbleiben in der Kultur.

Nachdem ein größtenteils synchroner Lebenszyklus bei einer Parasitämie von ca. 2 - 5 % mit Ringstadien erreicht wurde, wurde das Pellet bei einem Volumen von ca. 1 ml eingefroren.

Die Parasitämien zum Zeitpunkt des Einfrierens wurden bestimmt und sind Tab. 2-15 zu entnehmen. Für den Pf3D7-Stamm wurde der Vorgang zweimal durchgeführt.

Tab. 2-15: Parasitämien der für die DNA-Extraktion eingefrorenen Laborstämme Pf3D7, PfHB3 und PfDd2.

Laborstamm	Volumen [ml]	Parasitämie [%]
Pf3D7①	1	4,5
Pf3D7②	1	2,8
PfHB3	1	2,95
PfDd2	1	2,86

### 2.2.1.3 Einfrieren der Parasiten

Eine kleine Menge Parasitenkultur wurde vor der DNA-Extraktion als Reserve abgezweigt. Das Pellet der Kultur wurde unter Zugabe von Glycerolyte in Verhältnis 5:3 in einem Kryoröhrchen bei - 150 °C eingefroren.

## 2.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktionen der Kontrollen sowie der klinischen Proben wurden jeweils entsprechend der Protokolle des „*QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*“ (QIAGEN, 2016) durchgeführt.

### 2.2.2.1 DNA-Extraktion der Positiv- und Negativkontrollen

Die eingefrorenen Parasitenkulturen der Stämme Pf3D7①, PfHB3 und PfDd2 (vgl. Tab. 2-15) wurden aufgetaut und durch Zugabe von 2 ml Vollblut auf ein Gesamtvolumen von knapp über 3 ml gebracht. Anschließend wurden 16 Aliquots von je 200 µl erstellt. Die Zugabe von Vollblut sollte die Bedingungen im menschlichen Blut simulieren. Die eingefrorene Parasitenkultur Pf3D7② (vgl. Tab. 2-15) wurde ohne Zugabe von Vollblut genutzt und entsprechend auf lediglich fünf Eppendorf-Tubes je 200 µl verteilt.

Anschließend wurde die DNA-Extraktion entsprechend des Protokolls aus dem „*QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*“ (QIAGEN, 2016, pp. 26–28) „*DNA Purification from Blood or Body Fluids*“ durchgeführt.

Jedes Aliquot wurde mit 20 µl Protease versehen, um die Zellen zu lysieren und Proteine sowie DNA zu denaturieren. Unter Zugabe von 200 µl des *AL buffer* wurden die Zellen während einer 10-minütigen Inkubation bei 56 °C lysiert und

anschließend mit 200 µl 100%-igem Ethanol versehen, welches die Bindung der DNA an die Silikonmembran verbessert. Das gesamte Volumen wurde auf die Säulen mit den Silikonmembranen übertragen. Nach Zentrifugation bei 6000  $xg$  für eine Minute wurde das Auffang-Gefäß verworfen und die Säule in ein frisches Gefäß platziert. Zwei Waschungen mit *washing buffer* 1 und 2 folgten. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 100 µl *AE buffer* eluiert, fünf Minuten inkubiert und nach Zentrifugation das Filtrat mit der eluierten DNA gewonnen wurde.

Zur Überprüfung des Erfolgs der DNA-Extraktion wurde die Konzentration der DNA sowie deren Reinheit mittels des Nano Drop ND-1000 (vgl. Tab. 2-4) bestimmt. DNA absorbiert bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine und Phenole dagegen bei ca. 280 nm. Der Quotient aus 260/280 ist daher ein Faktor für die Reinheit der DNA. Ein Wert von  $\geq 1,8$  wird dabei als rein angesehen (Thermo Fischer Scientific, 2015). In der Tab. 10-1 des Anhangs sind die Konzentrationen sowie der Quotient der Wellenlängen jeder einzelnen DNA-Extraktion aufgetragen. Die niedrigen Werte bei der Messreihe der DNA-Extraktion aus Erythrozytenkonzentrat (uninf. RBC) gehen darauf zurück, dass reife Erythrozyten keinen Zellkern und dadurch keine DNA mehr besitzen. Die gemessene DNA sollte sich daher auf den Anteil der Retikulozyten im Blut beschränken. Nach der Messung wurden die mit Vollblut versetzten Isolate gepoolt, ein zweites Mal gemessen, auf vier Eppendorf-Tubes aliquotiert und bei - 20 °C aufbewahrt (vgl. Tab. 2-16).

Tab. 2-16: *Ergebnisse der NanoDrop-Messungen der gepoolten DNA-Extrakte von Pf3D7 ①, PfHB3 und PfDd2.*

Stamm		Pool
PfDd2	Konz. [ng/µl]	35,1
	260/280	1,99
PfHB3	Konz. [ng/µl]	26,0
	260/280	1,83
Pf3D7 ①	Konz. [ng/µl]	33,0
	260/280	1,98

### 2.2.2.2 DNA-Extraktion von Filterpapier-Feldproben

Für die vorliegende Arbeit wurden klinische Proben verwendet, die im Rahmen von zwei verschiedenen Studien (NanoFRET und NoHRP2) zuvor gesammelt wurden und für die Arbeit zur Verfügung standen. Hierfür wurden Blutproben freiwilliger Personen aus Gabun von April 2017 bis Juni 2018 am CERMEC in Lambaréné, Gabun, gesammelt. NanoFRET war eine abgeschlossene, retrospektive Beobachtungsstudie, NoHRP2 ist eine noch nicht abgeschlossene, prospektive Beobachtungsstudie. Eingeschlossen werden Personen aus Lambaréné und der ländlichen Umgebung, die mindestens zwei Jahre alt sind und die persönlich oder deren Erziehungsberechtigte\*r die Zustimmung zur Teilnahme unterschreiben. Blut aus der Fingerbeere oder durch eine Venenpunktion gewonnen, wurde mittels eines dicken Blutropfens und Mikroskopie (vgl. 1.1.1) und/oder einem Schnelltest auf Malaria getestet. Für eine spätere DNA-Extraktion wurden Blutproben außerdem als Vollblut eingefroren und auf Filterpapier gesammelt (*Whatman FTA Elute Card, Protein Saver Card*). Beide Studien wurden unter den Nummern CEI-005/2016 für die NanoFRET- und CEI-005/2017 für die NoHRP2-Studie vom *Institutional Ethics Committee at the Centre de Recherches Médicales de Lambaréné* genehmigt. Bei den Proben der NanoFRET-Studie konnte zum Teil auf schon extrahierte DNA aus *Whatman FTA Elute Cards* zurückgegriffen werden. Weitere Vollblutproben wurden, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, entsprechend des „*QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*“ (Thermo Fischer Scientific, 2015, pp. 26–28) „*DNA Purification from Blood or Body Fluids*“ extrahiert.

Die getrockneten Proben auf der *Whatman FTA Elute Card* wurden mit einer in Ethanol gereinigten Schere in kleinste Stückchen geschnitten und nach Zugabe von 500 µl Wasser gründlich gevortext. Die Flüssigkeit wurde entfernt und die Probe mit 30 µl frischem Wasser 30 Minuten lang bei 98 °C inkubiert. Nach abermaligem Vortexen wurde das Eluat abgenommen und bei - 20 °C aufbewahrt.

In einigen Fällen wurde DNA auch von *Protein Saver Cards* extrahiert, da sonstige Proben nicht mehr vorhanden waren. Hierzu wurde das Blut auf der *Protein Saver Card* entsprechend des „*DNA purification from dried blood spots*“ des

„QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook“ (Thermo Fischer Scientific, 2015, pp. 42–43) extrahiert.

Dazu wurde das Papier mit den getrockneten Blutstropfen ebenfalls in kleine Stückchen geschnitten. Drei aufeinanderfolgende Inkubationsschritte unter Zugabe von 180 µl *ATL buffer* bei 85 °C für 10 Minuten, 20 µl Proteinase K bei 56 °C für eine Stunde und 200 µl *AL buffer* bei 70 °C für 10 Minuten folgten. Zusammen mit 200 µl Ethanol wurde anschließend die Flüssigkeit um die Stückchen auf die Silikon-Säulen übertragen. Die weiteren Waschungen sowie die Eluierung entsprachen dem Vorgehen, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben.

### **2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Die quantitative *PCR* (*qPCR*) mit der grafischen Erfassung und Darstellung der Amplifikation durch die Fluoreszenzsignale der Sonden, wie in Kapitel 1.1.3.2 beschrieben, wurde mit dem *LightCycler® 480 II* der Firma Roche durchgeführt. Der *LightCycler®* arbeitet mit den Reaktionsgemischen aus einer *480-Multiwell-Palette* (vgl. Tab. 2-9).

Die Beladung der *Multiwell-Palette* erfolgte durch den *QIAgility™* der Firma QIAGEN. Nach Programmierung werden die einzelnen Bänke mit den Proben und den finalen Mastermischungen besetzt. Je 7 µl der angefertigten finalen Mastermischung und jeweils 3 µl der jeweiligen Probe wurden durch den Roboter in die einzelnen Vertiefungen der *Multiwell-Palette* pipettiert.

Bevor die Palette in den *LightCycler®* transferiert wurde, wurden die Öffnungen durch eine Folie (vgl. Tab. 2-9) verschlossen und die Palette bei 1600 *xg* eine Minute lang zentrifugiert.

#### **2.2.3.1 Singleplex-qPCR**

Für die Detektion der Gene *hrp2* und *hrp3* wurden neue Primer und Sonden designt. Diese sollten bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität mit den zuvor verwendeten Primern und Sonden verglichen werden.

Im Verlauf dieser Arbeit werden die Primer und Sonden der neuen Generation, die hierfür neu designt und bestellt wurden, fortan als *hrp2\_v2* bzw. *hrp3\_v2* und

die Primer und Sonden der alten Generation, die schon in vorherigen Experimenten benutzt wurden, lediglich als *hrp2* und *hrp3* bezeichnet. In den Abb. 10-1 und Abb. 10-2 des Anhangs sind die Sequenzen der Gene sowie die Bindungsstellen der Primer und Sonden dargestellt.

Die erste Testung dieser Primer und Sonden der neuen Generation wurde in einer *singleplex*-Reaktion durchgeführt. Dabei ist nur jeweils eine Sonden- und Primerkombination (= *Assay*) für ein Gen in jedem finalen Reaktionsmix enthalten. Die Primer binden an einer auf dem entsprechenden Gen liegenden Sequenz, wie es der Tab. 2-17 und Tab. 2-18 zu entnehmen ist. Das Amplikon entspricht in diesen Fällen nicht der Länge des ganzen Gens, sondern nur einer <150 bp langen Sequenz, da dies für die Durchführung einer *qPCR* mit *hydrolysis probes* empfohlen wird (Roche Diagnostics GmbH, 2008, p. 68).

Die Sonden sind jeweils an ihrem 5'-Ende mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff (HEX, FAM) und an ihrem 3'-Ende mit einem *Minor-groove-binder* (*MGB*) und dem *quencher* (*EQ*) modifiziert. Die Sequenzen und Eigenschaften sind Tab. 2-19 und Tab. 2-20 zu entnehmen.

Die vom Hersteller gelieferten Stammlösungen von 100 µM wurden in 100 µl-Aliquots auf 10 µM verdünnt.

Tab. 2-17: Sequenzen und Eigenschaften der *hrp2\_v2*- und *hrp3\_v2*-Primer.

Primer_v2	Sequenz (5' -> 3')	bp	Tm [°C]
<i>hrp2_v2 Fwd</i>	TTCCGCATTTAATAATAACTTG TG	24	54,2
<i>hrp2_v2 Rev</i>	CGGCTACATGATGAGCATG	19	56,7
<i>hrp3_v2 Fwd</i>	CTCCGAATTTAACAATAACTTGTTTA	26	55,3
<i>hrp3_v2 Rev</i>	CAGCTACATGATGTGCATG	19	54,5

Tab. 2-18: Sequenzen und Eigenschaften der hrp2- und hrp3-Primer.

Primer	Sequenz (5' -> 3')	bp	Tm [°C]
<i>hrp2 Fwd</i>	AGGACTTAATTTAAATAAGAGATTA	25	51,5
<i>hrp2 Rev</i>	GCTACATGATGAGCATGA	18	51,4
<i>hrp3 Fwd</i>	AGGACTTAATTCAAATAAGAGATTA	25	53,1
<i>hrp3 Rev</i>	AGCTACATGATGTGCATGA	19	52,4

Tab. 2-19: Sequenzen und Eigenschaften der hrp2\_v2- und hrp3\_v2-Sonden.

Sonde v2	Sequenz 5' -> 3'	Modifikation 5'	Modifikation 3'	bp	Tm [°C]
<i>hrp2_v2</i>	ACTCAAGCACAT-GTAGATGATGCC	5' - HEX	3' - MGBEQ	24	61,0
<i>hrp3_v2</i>	AGTCAAGCACAT-GCAGGTGATGCC	5' - FAM	3' - MGBEQ	24	64,4

Tab. 2-20: Sequenzen und Eigenschaften der hrp2- und hrp3-Sonden.

Sonde	Sequenz 5' -> 3'	Modifikation 5'	Modifikation 3'	bp	Tm [°C]
<i>hrp2</i>	TACACGAAACTCA-AGCACA	5' - HEX	3' - MGBEQ	19	52,4
<i>hrp3</i>	GAAAGTCA-AGCACATGCAG	5' - FAM	3' - MGBEQ	19	54,5

In einem ersten Versuch wurde der neue Assay mit dem alten Assay verglichen. Als Probe wurden lediglich die extrahierte DNA des Pf3D7<sup>®</sup>-Stammes als Positivkontrolle, sowie extrahierte DNA aus nicht-infiziertem Erythrozytenkonzentrat und Wasser als Negativkontrollen eingesetzt.

Alle drei Proben wurden jeweils in Triplikaten mit den in Tab. 2-21 dargestellten vier verschiedenen Mastermischungen gemessen. Jede Mastermischung wurde daher für neun finale Reaktionsmischungen benötigt (3 Proben x 3 Replikaten). Die Herstellung der Mastermischung war in der Form in unserer AG schon etabliert.

Tab. 2-21: Reaktionsansätze für Vergleich des neuen und alten Assays in singleplex-qPCR mit Pf3D7<sup>®</sup> und Negativkontrollen als template.

Mastermischung	Reagenzien	finale Konz. [nM]	V [µl] pro 3 µl Probe	V [µl] pro qPCR Lauf
1	SensiFast NoRox Kit	1x	5	45
	Forward Primer <i>hrp2_v2</i>	400	0,4	3,6
	Reverse Primer <i>hrp2_v2</i>	400	0,4	3,6
	Sonde <i>hrp2_v2</i>	100	0,1	0,9
	Nuklease freies Wasser		1,1	9,9
2	SensiFast NoRox Kit	1x	5	45
	Forward Primer <i>hrp2</i>	400	0,4	3,6
	Reverse Primer <i>hrp2</i>	400	0,4	3,6
	Sonde <i>hrp2</i>	100	0,1	0,9
	Nuklease freies Wasser		1,1	9,9
3	SensiFast NoRox Kit	1x	5	45
	Forward Primer <i>hrp3_v2</i>	400	0,4	3,6
	Reverse Primer <i>hrp3_v2</i>	400	0,4	3,6
	Sonde <i>hrp3_v2</i>	100	0,1	0,9
	Nuklease freies Wasser		1,1	9,9
4	SensiFast NoRox Kit	1x	5	45
	Forward Primer <i>hrp3</i>	400	0,4	3,6
	Reverse Primer <i>hrp3</i>	400	0,4	3,6
	Sonde <i>hrp3</i>	100	0,1	0,9
	Nuklease freies Wasser		1,1	9,9

Die Mastermischungen wurden per Hand entsprechend der letzten Spalte in jeweils ein 1,5 ml-Eppendorf-Tubes pipettiert. Die Verteilung von je 7 µl der Mastermischung und je 3 µl der jeweiligen Proben auf die einzelnen Vertiefungen der *Multiwell*-Palette erfolgte anschließend durch den zuvor programmierten *QIAgil*ty<sup>TM</sup>.

Die PCR-Bedingungen sind Tab. 2-22 zu entnehmen.

Tab. 2-22: PCR-Bedingungen für die singleplex-qPCR.

PCR-Bedingungen		Temperatur	Dauer	Tempo
Aktivierung		95°C	4 Min.	4,8°C/s
Zyklen (45x)	Denaturation	95°C	10 Sek.	4,8°C/s
	Primer-Hybridisierung	61°C	80 Sek.	2,5°C/s
Kühlung		60°C	10 Min.	4,8°C/s

### Kreuzreaktivität der neuen hrp-Assays

Um die Spezifität der Primer und Sonden der neuen Generation zu testen, wurden die DNA-Extraktionen aus den Stämmen PfDd2 und PfHB3 hinzugenommen, da sie jeweils eines der beiden *hrp*-Gene nicht exprimieren (vgl. Tab. 2-13). Die Zusammensetzung der beiden Mastermischungen für die Amplifikation von *hrp2* und *hrp3* ist Tab. 2-23 zu entnehmen.

Tab. 2-23: Reaktionsansätze für Kreuzreaktivitäts-Test des neuen hrp-Assays in singleplex-qPCR mit Pf3D7<sup>o</sup>, PfHB3, PfDd2 und Negativkontrollen als template.

Mastermischung	Reagenzien	finale Konz. [nM]	V [µl] pro Probe	V [µl] pro qPCR Lauf
1	SensiFast NoRox Kit	1x	5	75
	Forward Primer <i>hrp2_v2</i>	400	0,4	6
	Reverse Primer <i>hrp2_v2</i>	400	0,4	6
	Sonde <i>hrp2_v2</i>	100	0,1	1,5
	Nuklease freies Wasser		1,1	16,5
2	SensiFast NoRox Kit	1x	5	75
	Forward Primer <i>hrp3_v2</i>	400	0,4	6
	Reverse Primer <i>hrp3_v2</i>	400	0,4	6
	Sonde <i>hrp3_v2</i>	100	0,1	1,5
	Nuklease freies Wasser		1,1	16,5

Insgesamt wurde die qPCR mit sechs Proben durchgeführt: Wasser und DNA-Extrakt aus Vollblut als Negativkontrollen, sowie DNA-Extrakt aus den Blutkultu-

ren der PfDd2, PfHB3 und Pf3D7<sup>Ⓢ</sup>-Stämmen. Jede Probe wurde einzeln mit beiden Mastermischungen und zusätzlich in Triplikaten gemessen. Die letzte Spalte der Tab. 2-23 ergibt sich aus der Multiplikation der Volumina pro einzelne Reaktion mit der Anzahl der Proben und der Anzahl der Replikaten ( $5 \times 3 = 18$ ). Die PCR-Bedingungen sind Tab. 2-22 zu entnehmen.

**Kreuzreaktivität einzelner Komponenten**

Zur getrennten Beurteilung der Kreuzreaktivität der einzelnen Komponenten (Primer und Sonden) wurden in einem weiteren Schritt in jeder qPCR vier Assays verwendet. Die üblichen *hrp2*- und *hrp3*-Assays als Positivkontrollen (Assay A und Assay B) sowie die beiden Kreuzreaktions-Assays 1 und 2 (Assay C und Assay D), um zu überprüfen, ob in einer solchen Paarung eine Amplifikation durch Kreuzreaktionen stattfindet (vgl. Tab. 2-24).

Tab. 2-24: Erstellung der singleplex-Kreuzreaktions-Assays zur Beurteilung einzelner Komponenten.

		Sonde	
		<i>hrp2</i>	<i>hrp3</i>
Primer	<i>hrp2</i>	Assay A = <i>hrp2</i> -Assay	Assay C = Kreuzreaktion-Assay1
	<i>hrp3</i>	Assay D = Kreuzreaktion-Assay2	Assay B = <i>hrp3</i> -Assay

Es wurden insgesamt fünf qPCRs mit den vier Assays durchgeführt, um die neuen Primer separat von den alten Primern und die neuen Sonden separat von den alten Sonden beurteilen zu können. Jeder der vier Assays einer qPCR wurde jeweils mit den Primern/ mit der Sonde der dem Diagramm zu entnehmenden Generation durchgeführt (vgl. Abb. 2-1).

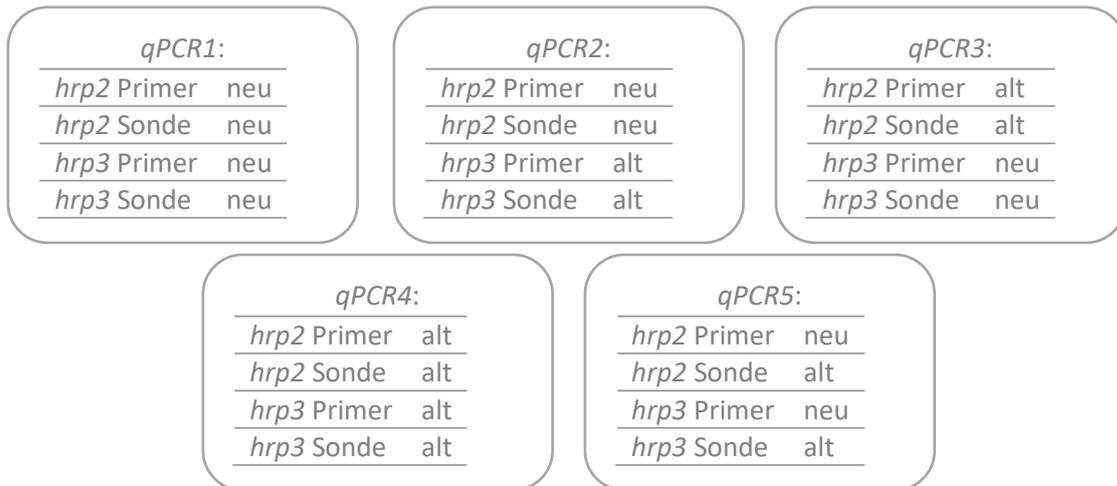


Abb. 2-1: *singleplex-qPCR zur Testung der Kreuzreaktivität einzelner Komponenten.*

Jeder Assay wurde auf fünf Proben angewendet: Wasser, DNA-Extrakt aus gesundem Vollblut und DNA-Extrakt aus den Blutkulturen der PfDd2, PfHB3 und Pf3D7<sup>①</sup>-Stämmen. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen.

Die *PCR*-Bedingungen sind Tab. 2-22 zu entnehmen.

### 2.2.3.2 Optimierung einer 4plex-qPCR

Eine *4plex*-Reaktion beschreibt die *qPCR*-Reaktion mit dem Nachweis vier verschiedener Gene innerhalb eines Reaktionsansatzes. Neben den Genen *hrp2* und *hrp3* wurden die Proben auf das Vorhandensein der Gene *β-tubulin* und *cytochrom b* untersucht (vgl. Tab. 2-13).

Die Mastermischungen setzten sich somit aus den Primern und Sonden für diese vier Gene zusammen. Es wurden die Primer der neuen Generation (*hrp2\_v2* und *hrp3\_v2*) aber die Sonden der alten Generation (*hrp2* und *hrp3*) genutzt (vgl. Tab. 2-17 und Tab. 2-20). Für die Gene *cytochrom b* und *β-tubulin* wurden keine neuen Primer und Sonden designt. Die Eigenschaften sind Tab. 2-25 und Tab. 2-26 zu entnehmen. In den Abb. 10-3 und Abb. 10-4 des Anhangs sind außerdem die Sequenzen der gesamten Gene mit den Bindungsstellen der Primer und Sonden dargestellt.

Die in Tab. 2-26 fett gedruckten Buchstaben der Nukleinbasen sind sogenannte *LNA*-Basen (*locked nucleic acids*). Sie besitzen ein modifiziertes Nukleinsäure-

Molekül mit einer zusätzlichen Bindung zwischen dem 2'-Sauerstoffatom und dem 4'-Kohlenstoffatom. Es sorgt für eine erhöhte Stabilität des nach Anlagerung der Sonde entstehenden Doppelstrangs (Singh et al., 1998). Die Modifikation des 5'-Endes beinhaltet den Fluoreszenzfarbstoff (ROX bzw. Cy5), die Modifikation des 3'-Endes den zugehörigen *quencher* (BHQ2).

Tab. 2-25: Sequenzen und Eigenschaften der Primer für *cytb* und  $\beta$ -*tub*.

Primer	Sequenz (5' -> 3')	bp	Tm [°C]
<i>cytb</i> Forward	TACTAACTTGTTATCCTCTATTCCAGTAGC	30	62,7
<i>cytb</i> Reverse	CCTTTAACATCAAGACTTAATAGATTTGGA	25,4	59,9
$\beta$ - <i>tub</i> Forward	TGATGTGCGCAAGTGATCC	19	56,7
$\beta$ - <i>tub</i> Reverse	TCCTTTGTGGACATTCTTCCTC	22	58,4

Tab. 2-26: Sequenzen und Eigenschaften der Sonden für *cytb* und  $\beta$ -*tub*.

Sonde	Sequenz 5' -> 3'	Modifikation 5'	Modifikation 3'	bp	Tm [°C]
<i>cytb</i>	GTGCTACCATGTAAATG-TAA	5' – ROX	3' – BHQ2	20	56,0
$\beta$ - <i>tub</i>	TAGCACATGCCGTTAAA-TATCTTCCATGTCT	5' – CY5	3' – BHQ2	31	64,2

Jeder der Fluoreszenzfarbstoffe (Modifikation des 5'-Endes) exzitiert und emittiert auf einem durch den Hersteller angegebenen Wellenlängenbereich und kann durch die entsprechenden Detektionsformate des *LightCyclers*® erfasst werden (vgl. Tab. 2-27).

Tab. 2-27: Zuordnung der Fluoreszenzfarbstoffe und Wellenlängen der Erregung zu den Genen *hrp2*, *hrp3*,  $\beta$ -*tub* und *cytb*.

Gene	Fluoreszenzfarbstoff	Wellenlänge der Exzitation/Emission [nm]	
		des Fluoreszenzfarbstoffs laut Hersteller der Sonden	entsprechend der Detektionsformate des <i>LightCycler</i> ®
<i>hrp2</i>	HEX	535/556	533/580
<i>hrp3</i>	FAM	495/520	465/510
$\beta$ - <i>tubulin</i>	Cy5	647/673	610/660
<i>cytochrom b</i>	ROX	573/602	533/610

Die Optimierung der *4plex*-Reaktion erfolgte ausgehend von einem zuvor etablierten Protokoll von Franziska Leonie Trauner, der *4plex-qPCR\_v1* (Kreidenweiss et al., 2019; Trauner, 2019) (vgl. Tab. 2-28 und Tab. 2-29). Durch die Verwendung neuer Primer für die Gene *hrp2* und *hrp3* war eine Anpassung dieses Protokolls notwendig.

Tab. 2-28: Reaktionsansätze für die 4plex-qPCR\_v1 entsprechend des Protokolls von Franziska Leonie Trauner (Trauner, 2019).

		finale Konz.	Volumen [µl] pro Probe	
Mastermischung:	TaqMan® Multiplex Master Mix	1x	5	
	<i>hrp2</i>	Fwd Primer <i>hrp2_v2</i>	400 nM	0,2
		Rev Primer <i>hrp2_v2</i>	400 nM	0,2
		Sonde <i>hrp2</i>	50 nM	0,1
	<i>hrp3</i>	Fwd Primer <i>hrp3_v2</i>	400 nM	0,2
		Rev Primer <i>hrp3_v2</i>	400 nM	0,2
		Sonde <i>hrp3</i>	50 nM	0,1
	<i>β-tub</i>	Fwd Primer	400 nM	0,2
		Rev Primer	400 nM	0,2
		Sonde	100 nM	0,1
	<i>cytb</i>	Fwd Primer	100 nM	0,2
		Rev Primer	100 nM	0,2
		Sonde	50 nM	0,1
DNA-Probe			3	
SUMME			10	

Tab. 2-29: PCR-Bedingungen bei der 4plex-qPCR\_v1 entsprechend des Protokolls von Franziska Leonie Trauner (Trauner, 2019).

PCR-Bedingungen		Temperatur	Dauer	Tempo
Aktivierung		95°C	20 Sek.	4,8 °C/s
Zyklen (45x)	Denaturatierung	95°C	3 Sek.	4,8°C/s
	Primer-Hybridisierung	60°C	150 Sek.	2,5°C/s
Kühlung		40°C	30 Sek.	4,8°C/s

Die Optimierung lief wie in Abb. 2-2 aufgezeigt in insgesamt drei Schritten ab. In jedem übergeordnetem Optimierungsschritt wurden einzelne Komponenten der qPCR variiert und für die nachfolgenden Experimente jeweils der beste Wert der

zuvor getesteten Komponente übernommen. Dabei war der erste Durchgang darauf ausgelegt eine zuverlässige und eindeutige Amplifikation in allen Kanälen zu erreichen und die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Kanäle einander anzugleichen. In einem zweiten Durchgang wurde das Hauptaugenmerk auf das Erreichen sigmoidaler Fluoreszenzkurven gelegt.

Im Laufe der Optimierung mussten die Primer und Sonden mehrmals nachbestellt werden. Der erste Optimierungsschritt wurde somit mit der Bestellung 1 begonnen und im Verlauf mit der Bestellung 2 fortgeführt. Bei der Bestellung 1 handelt es sich dabei um die Primer und Sonden, die auch schon bei den *singleplex*-Reaktionen genutzt wurden. Der zweite Optimierungsschritt wurde im Anschluss ausschließlich mit der Bestellung 2 durchgeführt.

Durch die Veränderungen in den Fluoreszenzintensitäten und Fluoreszenzkurven, die sich unter der Bestellung 3 im Vergleich zu den vorher durchgeführten Messungen unter der Bestellung 2 ergaben, wurde der letzte, dritte Optimierungsschritt nötig.

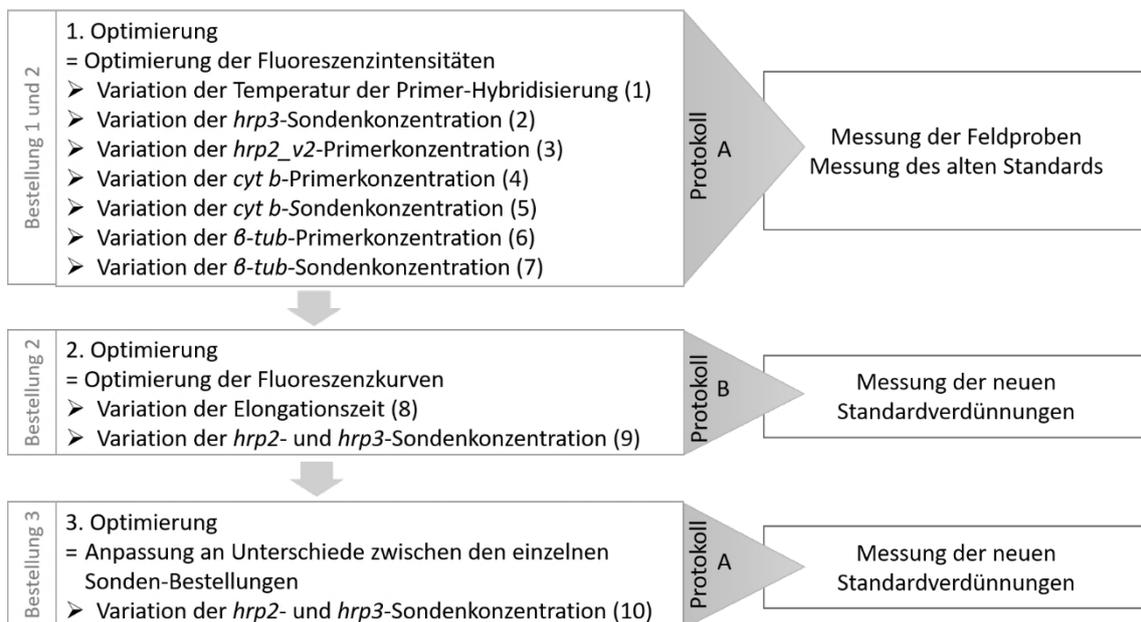


Abb. 2-2: Optimierungsschritte zur Erstellung eines 4plex-qPCR\_v2-Protokolls.

In den Tab. 2-30 und Tab. 2-31 sind die für den ersten Optimierungsschritt getesteten Werte in fett gedruckt dargestellt. Jeweils unterstrichen erscheint der

Wert, der nach diesem ersten Schritt als beste Einstellung festgesetzt wurde. Daraus ergab sich das Protokoll A.

Tab. 2-30: PCR-Bedingungen im ersten Optimierungsschritt zur Erstellung des Prot. A (vgl. Abb. 2-2)

PCR-Bedingungen (A)		Temperatur	Dauer	Tempo
Aktivierung		95°C	20 Sek.	4,8 °C/s
Zyklen (45x)	Denaturation	95°C	3 Sek.	4,8°C/s
	Primer-Hybridisierung	<b>60°C/61°C/62°C</b> <sup>(1)</sup>	150 Sek.	2,5°C/s
Kühlung		40°C	30 Sek.	4,8°C/s

Tab. 2-31: Reaktionsansätze im ersten Optimierungsschritt zur Erstellung des Prot. A. (vgl. Abb. 2-2).

Protokoll A		Konz. final [nM]	V [µl] pro Probe	
Mastermischung:	TaqMan® Multiplex Master Mix	1x	5	
	<i>hrp2</i>	Fwd Primer <i>hrp2_v2</i>	<b>400/200/100</b> <sup>(3)</sup>	0,2
		Rev Primer <i>hrp2_v2</i>	<b>400/200/100</b> <sup>(3)</sup>	0,2
		Sonde <i>hrp2</i>	50	0,1
	<i>hrp3</i>	Fwd Primer <i>hrp3_v2</i>	400	0,2
		Rev Primer <i>hrp3_v2</i>	400	0,2
		Sonde <i>hrp3</i>	<b>50/100</b> <sup>(2)</sup>	0,1
	<i>β-tub</i>	Fwd Primer	<b>400/500/600</b> <sup>(6)</sup>	0,2
		Rev Primer	<b>400/500/600</b> <sup>(6)</sup>	0,2
		Sonde	<b>100/150/200/250/300</b> <sup>(7)</sup>	0,1
	<i>cytb</i>	Fwd Primer	<b>100/200/400</b> <sup>(4)</sup>	0,2
		Rev Primer	<b>100/200/400</b> <sup>(4)</sup>	0,2
Sonde		<b>50/100/150</b> <sup>(5)</sup>	0,1	
DNA-Probe			3	
SUMME			10	

Der zweite Optimierungsschritt, aus dem sich das Protokoll B ergab, wurde aufgrund sehr hoher Fluoreszenzintensitäten und zusätzlich aufgrund des sehr flachen Verlaufs der Amplifikationskurven durchgeführt, die sich am eindrücklichsten unter Messung der Feldproben mit dem Protokoll A ergaben.

In den Tab. 2-32 und

Tab. 2-33 sind die Bedingungen sowie die Einstellungen dargestellt, die variiert wurden.

Tab. 2-32: PCR-Bedingungen im zweiten Optimierungsschritts zur Erstellung des Prot. B (vgl. Abb. 2-2)

PCR-Bedingungen (B)		Temperatur	Dauer	Tempo
Aktivierung		95°C	20 Sek.	4,8 °C/s
Zyklen (45x)	Denaturation	95°C	3 Sek.	4,8°C/s
	Primer-Hybridisierung	62°C <sup>(1)</sup>	<b>120/150/180 Sek. <sup>(8)</sup></b>	2,5°C/s
Kühlung		40°C	30 Sek.	4,8°C/s

Tab. 2-33: Reaktionsansätze im zweiten Optimierungsschritts zur Erstellung des Prot. B (vgl. Abb. 2-2).

Protokoll B		Konz. final [nM]	V [µl] pro Probe	
Mastermischung:	TaqMan® Multiplex Master Mix	1x	5	
	<i>hrp2</i>	Fwd Primer <i>hrp2_v2</i>	400	0,2
		Rev Primer <i>hrp2_v2</i>	400	0,2
		Sonde <i>hrp2</i>	<b>50/25/20<sup>(9)</sup></b>	0,1
	<i>hrp3</i>	Fwd Primer <i>hrp3_v2</i>	400	0,2
		Rev Primer <i>hrp3_v2</i>	400	0,2
		Sonde <i>hrp3</i>	<b>50/25/20<sup>(9)</sup></b>	0,1
	<i>β-tub</i>	Fwd Primer	600	0,2
		Rev Primer	600	0,2
		Sonde	300 <sup>)</sup>	0,1
	<i>cytb</i>	Fwd Primer	400	0,2
		Rev Primer	400	0,2
		Sonde	150	0,1
DNA-Probe			3	
SUMME			10	

Die Variation der *hrp2*- und *hrp3*-Sondenkonzentrationen wurde dabei in mehreren Kombinationen verglichen. Sie sind in der Tab. 2-34 ersichtlich.

Tab. 2-34: Kombination unterschiedlicher *hrp2*- und *hrp3*-Sondenkonz. im Rahmen des 2. Optimierungsschritts (9).

Kombinationen		Sonde <i>hrp3</i>		
		50 nM	25 nM	20 nM
Sonde <i>hrp2</i>	50 nM	1. Versuch	1. Versuch	X
	25 nM	1. Versuch	1. Versuch	X
	20 nM	X	2. Versuch	2. Versuch

Unter der Annahme, das Protokoll B sei das finale Protokoll der *4plex-qPCR\_v2*, wurden die neu angesetzten Standardverdünnungen (vgl. Kapitel 2.2.4) mit diesem Protokoll gemessen.

Nach Eintreffen der dritten Bestellung der Primer und Sonden wurden die neuen Ansätze entsprechend der Konzentrationen des Protokoll B verdünnt und zunächst unter Verwendung der Verdünnungen 1 - 14 des Pf3D7<sup>2</sup>-Standards sowie der Positivkontrollen der Stämme PfDd2 und PfHB3 getestet. Die oben erwähnten Merkmale der sehr hohen Fluoreszenzintensitäten und flachen Verläufe der Amplifikationskurven konnten dabei allerdings nicht mehr festgestellt werden. Gegenteilig ergaben sich sehr niedrige Fluoreszenzintensitäten. Alle Primer und Sonden der dritten Bestellung wurden in neuen Lösungen mit größeren Volumina ein zweites Mal angesetzt, um einen Fehler bei der Erstellung der Verdünnungen auszuschließen. Nachdem dieser Schritt nichts an dem Verlauf der Kurven änderte, wurde wieder auf das Protokoll A mit den höheren Konzentrationen der *hrp2*- und *hrp3*-Sonden zurückgegriffen.

Für alle Messungen der Optimierungsschritte wurde die extrahierte DNA aus den Stämmen Pf3D7<sup>1</sup>, PfDd2 und PfHB3 verwendet sowie Wasser und extrahierte DNA aus gesundem Vollblut als Negativkontrollen.

### 2.2.3.3 Farbkompensation

Da die einzelnen Filter des *LightCyclers*<sup>®</sup>, mit denen die Fluoreszenzsignale erfasst werden, einen zum Teil überschneidenden Wellenlängenbereich erfassen, ist eine Farbkompensation erforderlich. Hierbei teilt man der Software mit, welche spezifische Fluoreszenzkurve von welchem Farbstoff resultiert und somit dominierend für ein Detektionsformat sein soll.

Jeweils nach Beendigung der ersten beiden Optimierungsdurchläufe wurde mit dem dabei entstandenen, finalen Protokoll (vgl. Tab. 3-22, Tab. 3-23, Tab. 3-24) eine Farbkompensation durchgeführt.

Die Reaktionsmischungen wurden entsprechend der

Tab. 2-35 erstellt, wobei jede Mischung in fünf Replikaten hergestellt und entsprechend des in Tab. 2-36 beschriebenen Programms gemessen wurde.

Tab. 2-35: Erstellung der Reaktionsansätze für die Farbkompensation.

		HEX	FAM	Cy5	ROX	BLANK
TaqMan® Multiplex Master Mix		5 µl				
Primer	alle	je 0,2 µl				
Sonden	<i>hrp2</i>	0,1 µl	X	X	X	X
	<i>hrp3</i>	X	0,1 µl	X	X	X
	<i>β-tub</i>	X	X	0,1 µl	X	X
	<i>cytb</i>	X	X	X	0,1 µl	X
Nuklease freies Wasser		0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	3,4 µl
Pf3D7 <sup>①</sup>		3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	X

Tab. 2-36: PCR-Bedingungen für die Farbkompensation.

PCR-Bedingungen		Temperatur	Dauer	Tempo
Aktivierung		95 °C	20 Sek.	4,8 °C/s
Zyklen (45x)	Denaturation	95 °C	3 Sek.	4,8 °C/s
	Primer Hybridisierung	62 °C	150 Sek.	2,5 °C/s
Farbkompensation		40 °C	30 Sek.	2,5 °C/s
		67 °C	Kontinuierlich	1 Aufnahme/°C
Kühlung		40 °C	30 Sek.	4,8 °C/s

Anschließend konnten die Informationen dieses Experiments gespeichert und auf die weiteren Experimente, die mit den gleichen Primer- und Sondenkonzentrationen durchgeführt wurden, angewandt werden.

#### 2.2.3.4 Messung von klinischen Proben

Entsprechend des nach dem ersten Optimierungsdurchgang entstandenen Protokolls A unter der Bestellung 2 (vgl. Tab. 3-22 und Tab. 3-23) wurden Feldproben der Studien NoHRP2 und NanoFRET gemessen. Zu Teilen handelte es sich dabei um Proben, die schon in vorherigen Messungen unklare Ergebnisse erbrachten und die mit dem neuen Protokoll überprüft werden sollten. Die Proben der

Greendot-Studie (einer Untergruppe der NoHRP2-Studie) wurden hingegen zum ersten Mal gemessen.

### 2.2.4 Standardverdünnung

Um eine Aussage über die Sensitivität der optimierten *qPCR* treffen sowie einen Vergleich zu einer konventionellen *PCR* (k. *PCR*) ziehen zu können, wurden Proben mit absteigender Parasitämie gemessen und die Parasitenlast bestimmt, ab welcher keine eindeutige Aussage mehr über das Vorhandensein der Gene getroffen werden konnte.

Eine Verdünnungsreihe des Pf3D7-Stammes war noch von vorherigen Experimenten vorhanden. Sie wurde von Johanna Griesbaum im Rahmen der Masterarbeit von Miriam Rodi (Rodi, 2018, nicht veröffentlicht) erstellt und wird im weiteren Verlauf der Arbeit als Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Verdünnungsreihe bezeichnet (vgl. Tab. 2-37).

Tab. 2-37: Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Verdünnungsreihe (Rodi, 2018, nicht veröffentlicht).

Proben		Parasiten/ $\mu$ l	Parasiten/ml
Verdünnung:	1	600	600000
	2	204	204000
	3	60	60000
	4	20,4	20400
	5	6,0	6000
	6	2,04	2040
	7	0,6	600
	8	0,2	204
	9	0,06	60
	10	0,02	20,4
	11	0,006	6
	12	0,002	2,04
	13	0,003	3
	14	0,001	1,02

Proben		Parasiten/ $\mu$ l	Parasiten/ml
	15	0,0015	1,5
Kontrollen:	Medium	0	0
	uninf. Blut	0	0

Weitere Verdünnungsreihen für die Stämme Pf3D7, PfHB3 und PfDd2 wurden neu hergestellt. Für den PfHB3-Stamm wurde der Vorgang zweimal durchgeführt, es resultierte ein PfHB3<sup>①</sup>- und ein PfHB3<sup>②</sup>-Standard. Die Parasiten der einzelnen Zelllinien wurden kultiviert und durch Synchronisation sowohl mit Magnet als auch mit Sorbitol (vgl. Kapitel 2.2.1.2) auf einen synchronen Lebenszyklus gebracht. Bei Erreichen einer synchronen (> 95 %) Ringkultur wurde die Parasitämie per Auszählung am Mikroskop durch eine erfahrene technische Angestellte und durch Durchflusszytometrie mit dem *BD FACSCanto™ II Flow Cytometer* bestimmt.

Für die Messung am Zytometer wurde jeweils eine Stichprobe der Kultur mit einem Milliliter *Medium Complete* verdünnt, mit einem Mikroliter Hoechst 33342 gefärbt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Hoechst ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nach Anlagerung an die DNA und Anregung durch UV-Licht in erhöhter Intensität auf einer Wellenlänge zwischen 460 und 490 nm emittiert.

Die Differenzierung infizierter Zellen von nicht-infizierten Zellen, erfolgte dadurch, dass reife Erythrozyten keinen Zellkern und daher keine DNA mehr besitzen. Die angefärbte DNA beschränkte sich daher auf die DNA der Plasmodien in den infizierten Erythrozyten.

Die gefärbten Kulturproben werden im Zytometer durch eine Mikrokanalküvette geleitet, in denen sie einen Laser und einen Detektor passieren. Durch den schmalen Durchmesser der Küvette, kann der Detektor für jede Zelle einzeln die Wellenlänge des nach Anregung emittierten Lichts und dessen Intensität bestimmen. In dem Wellenlängenbereich zwischen 460 und 490 nm kann nach Passieren eines infizierten Erythrozyten eine erhöhte Fluoreszenzintensität detektiert werden.

Sowohl die Durchflusszytometrie als auch die Auszählung am Mikroskop gibt die Anzahl der Parasiten pro 100 Erythrozyten an. Die Umrechnung auf eine Aussage pro Milliliter erfolgte durch die Überlegung, dass bei einem Hämatokritwert von ca. 50 % im menschlichen Blut sich ca.  $5 \times 10^6$  *Erythrozyten*/μl *Blut* befinden. In dem genutzten Pellet herrscht ein 100 %-iger Hämatokrit. Entsprechend sind pro Volumen doppelt so viele Erythrozyten, also ca.  $1 \times 10^7$  *Erythrozyten*/μl *Blut* vorhanden (vgl. Tab. 2-38).

Tab. 2-38: Parasitämien der Zellkulturen vor Erstellung der neuen Verdünnungsreihen.

Stamm	Parasiten 100 Erythrozyten im Pellet			Parasiten ml
	Auszählung am Mikroskop	FACS-Messung	gerundeter Mittelwert	
Pf3D7	2,12	1,8	<b>2</b>	$2 \times 10^8$
PfHB3 ①	11	9,2	<b>10</b>	$10 \times 10^8$
PfHB3 ②	3,15	2,8	<b>3</b>	$3 \times 10^8$
PfDd2	9,3	8,8	<b>9</b>	$9 \times 10^8$

Die Konzentrationen der letzten Spalte der Tab. 2-38 wurden mit *Medium Complete* auf eine Ausgangskonzentration von  $6 \times 10^7$  *Parasiten/ml* verdünnt. Ausgehend von dieser Verdünnung wurden für alle Stämme die weiteren Verdünnungen entsprechend der Tab. 2-39 und Tab. 2-40 erstellt.

Tab. 2-39: Verdünnungsreihe mit Zugabe von *Medium Complete* für die neu erstellten Standards.

Proben	Volumen Kultur	Volumen Medium	P/μl	
Verdünnung:	1	100μl der $6 \times 10^7$ <i>P/ml</i> Verdünnung	900 μl	6000
	2	34μl der $6 \times 10^7$ <i>P/ml</i> Verdünnung	966 μl	2040
	3	100μl aus Verdünnung 1	900 μl	600
	4	34μl aus Verdünnung 1	966 μl	204
	5	100μl aus Verdünnung 3	900 μl	60

Proben	Volumen Kultur	Volumen Medium	P/ $\mu$ l
6	34 $\mu$ l aus Verdünnung 3	966 $\mu$ l	20,4
7	100 $\mu$ l aus Verdünnung 5	900 $\mu$ l	6
8	34 $\mu$ l aus Verdünnung 5	966 $\mu$ l	2,04
9	100 $\mu$ l aus Verdünnung 7	900 $\mu$ l	0,6
10	34 $\mu$ l aus Verdünnung 7	966 $\mu$ l	0,2
11	100 $\mu$ l aus Verdünnung 9	900 $\mu$ l	0,06
12	34 $\mu$ l aus Verdünnung 9	500 $\mu$ l	0,02
13	500 $\mu$ l aus Verdünnung 11	500 $\mu$ l	0,03
14	500 $\mu$ l aus Verdünnung 12	500 $\mu$ l	0,01
15	500 $\mu$ l aus Verdünnung 13	500 $\mu$ l	0,015
16	500 $\mu$ l aus Verdünnung 14	500 $\mu$ l	0,0051
17	500 $\mu$ l aus Verdünnung 15	500 $\mu$ l	0,0075
18	500 $\mu$ l aus Verdünnung 16	500 $\mu$ l	0,00255
19	500 $\mu$ l aus Verdünnung 17	500 $\mu$ l	0,00375
20	500 $\mu$ l aus Verdünnung 18	500 $\mu$ l	0,001275
21	500 $\mu$ l aus Verdünnung 19	500 $\mu$ l	0,001875
22	500 $\mu$ l aus Verdünnung 20	500 $\mu$ l	0,0006375
Kontrollen:	Medium	500 $\mu$ l	0
	uninf. Blut	500 $\mu$ l	0

Tab. 2-40: Verdünnungsreihe mit Zugabe von Vollblut für die neu erstellten Standards.

Proben	Volumen der Medium-verdünnung	Volumen Voll-blut	P/ $\mu$ l	P/ml	
Verdünnung	1	150 $\mu$ l aus Verdünnung 1	1,35ml	600	600000
	2	150 $\mu$ l aus Verdünnung 2	1,35ml	204	204000
	3	150 $\mu$ l aus Verdünnung 3	1,35ml	60	60000
	4	150 $\mu$ l aus Verdünnung 4	1,35ml	20,4	20400
	5	150 $\mu$ l aus Verdünnung 5	1,35ml	6,0	6000
	6	150 $\mu$ l aus Verdünnung 6	1,35ml	2,04	2040

Proben	Volumen der Medium-verdünnung	Volumen Voll-blut	P/ $\mu$ l	P/ml
7	150 $\mu$ l aus Verdünnung 7	1,35ml	0,6	600
8	150 $\mu$ l aus Verdünnung 8	1,35ml	0,2	204
9	150 $\mu$ l aus Verdünnung 9	1,35ml	0,06	60
10	150 $\mu$ l aus Verdünnung 10	1,35ml	0,02	20,4
11	150 $\mu$ l aus Verdünnung 11	1,35ml	0,006	6
12	150 $\mu$ l aus Verdünnung 12	1,35ml	0,002	2,04
13	150 $\mu$ l aus Verdünnung 13	1,35ml	0,003	3
14	150 $\mu$ l aus Verdünnung 14	1,35ml	0,001	1,02
15	150 $\mu$ l aus Verdünnung 15	1,35ml	0,0015	1,5
16	150 $\mu$ l aus Verdünnung 16	1,35ml	0,00051	0,51
17	150 $\mu$ l aus Verdünnung 17	1,35ml	0,00075	0,75
18	150 $\mu$ l aus Verdünnung 18	1,35ml	0,000255	0,255
19	150 $\mu$ l aus Verdünnung 19	1,35ml	0,000375	0,375
20	150 $\mu$ l aus Verdünnung 20	1,35ml	0,0001275	0,1275
21	150 $\mu$ l aus Verdünnung 21	1,35ml	0,0001875	0,1875
22	150 $\mu$ l aus Verdünnung 22	1,35ml	0,00006375	0,06375
Kontrol- len	Medium	-	0	0
	uninf. Blut	-	0	0

Die DNA der Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Verdünnungsreihe der Tab. 2-37 sowie die DNA der neu erstellten Pf3D7<sup>2-</sup>-, PfHB3<sup>①/②</sup>- und PfDd2-Verdünnungsreihen entsprechend der Tab. 2-40 wurden automatisiert mit dem *QIASymphony*<sup>®</sup> und dem dazugehörigen *QIASymphony DSP DNA Midi Kit* extrahiert. Dafür wurden jeweils 420  $\mu$ l jeder Probe benötigt und nach automatisierter Extraktion jeweils 100  $\mu$ l DNA-Eluat pro Probe gewonnen.

#### 2.2.4.1 Standardkurve und Detektionslimit der qPCR

Die DNA der Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Verdünnungsreihe (vgl. Tab. 2-37) wurde mit dem *qPCR*-Protokoll A unter Verwendung der Primer und Sonden der Bestellung 2 gemessen (vgl. Abb. 2-2 und Tab. 2-41, Tab. 2-42 (A)).

Die weiteren neu erstellten Verdünnungsreihen Pf3D7<sup>2</sup>, PfHB3<sup>2</sup> und PfDd2 wurden in einem ersten Durchgang mit dem Protokoll B unter Verwendung der Primer und Sonden der Bestellung 2 gemessen und ein zweites Mal mit dem Protokoll A unter Verwendung der Primer und Sonden der Bestellung 3 (vgl. Abb. 2-2 und Tab. 2-41, Tab. 2-42 (A) und (B)). Bei der Messung mit dem Protokoll A wurden lediglich die Verdünnungen 1-15 verwendet.

Tab. 2-41: PCR-Bedingungen der 4plex-qPCR\_v2.

PCR-Bedingungen		Temperatur	Dauer	Tempo
Aktivierung		95 °C	20 Sek.	4,8 °C/s
Zyklen (45x)	Denaturation	95 °C	3 Sek.	4,8 °C/s
	Primer-Hybridisierung	62 °C	150 Sek.	2,5 °C/s
Kühlung		40 °C	30 Sek.	4,8 °C/s

Tab. 2-42: Reaktionsansätze der 4plex-qPCR\_v2 Protokoll A und B.

		c final [mM]	V [µl] pro Probe	V [µl] für finale Mastermischung	
Mastermischung:	TaqMan® Multiplex Master Mix	1x	5	75	
	<i>hrp2</i>	Fwd Primer	400	0,2	3
		Rev Primer	400	0,2	3
		Sonde	50 (A) 20 (B)	0,1	1,5
	<i>hrp3</i>	Fwd Primer	400	0,2	3
		Rev Primer	400	0,2	3
		Sonde	50 (A) 25 (B)	0,1	1,5
	<i>β-tub</i>	Fwd Primer	600	0,2	3
		Rev Primer	600	0,2	3
		Sonde	300	0,1	1,5
	<i>cytb</i>	Fwd Primer	400	0,2	3
		Rev Primer	400	0,2	3
		Sonde	150	0,1	1,5
	DNA-Probe			3	
	SUMME			10	

Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen und jeder Lauf zweimal wiederholt. Pro Verdünnung erhielt man somit eine Gesamtanzahl von neun C<sub>q</sub>-Werten.

#### 2.2.4.2 Detektionslimit der k. PCR

Neben den Messungen durch den *LightCycler*® wurden die Verdünnungsreihen zusätzlich mit einer konventionellen *PCR* (k. *PCR*) analysiert.

Die Zusammensetzung der Reaktionsmischungen und der Ablauf der *PCR* erfolgte dabei entsprechend der in Tab. 2-43 und Tab. 2-44 beschriebenen Protokolle. Sie wurden von Laura Reinke (Reinke, 2017, nicht veröffentlicht) zur Detektion der Gene *hrp2* und *hrp3* optimiert. Jede *PCR* wurde zweimal durchgeführt und in jeder *PCR* jede Verdünnung zweimal gemessen. Die Reaktion lief dabei

nicht im *LightCycler*® ab, sondern in einem normalen *Thermal Cycler* (vgl. Tab. 2-7).

Tab. 2-43: Reaktionsansatz für die konventionelle *hrp2*- und *hrp3*-PCR.

		finale Konz.	V [µl] pro Probe	
			<i>hrp2</i>	<i>hrp3</i>
Mastermischung	Nuklease freies Wasser		14,74	12,74
	Buffer mit MgCl <sub>2</sub> (10x)	1 x	X	2
	Q Solution (5x)	0,5 x	2	2
	dNTPs	200 µM	0,16	0,16
	<i>hrp2</i> Primer <i>Fwd</i>	200 nM	0,2	0,2
	<i>hrp2</i> Primer <i>Rev</i>	200 nM	0,2	0,2
	Taq	5 U/µl	0,2	0,2
DNA-Probe			2,5	2,5
SUMME			20	20

Tab. 2-44: PCR-Bedingungen für die konventionelle *hrp2*- und *hrp3*-PCR.

PCR-Bedingungen		<i>hrp2</i>		<i>hrp3</i>	
		Temp.	Dauer	Temp.	Dauer
Aktivierung		95 °C	5 Min.	95 °C	5 Min.
Zyklen (35x)	Denaturation	95 °C	30 Sek.	95 °C	30 Sek.
	Primer-Hybridisierung	57 °C	30 Sek.	60 °C	30 Sek.
	Elongation	72 °C	1 Min.	72 °C	1 Min.
Elongation		72 °C	10 Min.	72 °C	10 Min.
Kühlung		10 °C	∞	10 °C	∞

Die Primer sind für die konventionelle *PCR* so designt, dass sie das gesamte Gen amplifizieren (vgl. Abb. 10-1 und Abb. 10-2 des Anhangs). Die Sequenzen sind in Tab. 2-45 ersichtlich.

Tab. 2-45: Sequenzen und Eigenschaften der *hrp2*- und *hrp3*-Primer für die konventionelle PCR.

Primer	Sequenz (5' -> 3')	Länge des Primer [bp]	Länge des Amplikon [bp]
<i>hrp2 Fwd</i>	GGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAG	23	1062
<i>hrp2 Rev</i>	TTAATGGCGTAGGCAATGTGTGG	23	
<i>hrp3 Fwd</i>	GGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAA	23	971
<i>hrp3 Rev</i>	TGGTGTAAGTGATGCGTAGT	20	

Zur Auswertung der Produkte der PCR wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe einer Gelelektrophorese und mit dem *QIAxcel* analysiert.

Für die Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte unter Zugabe von Ladepuffer und *SYBR-Green* entsprechend der Tab. 2-46 in die Taschen eines 1,5 %-igen Agarosegels pipettiert. Das *SYBR-Green* ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die DNA anlagert. Nach Befüllung der Taschen wurde eine Spannung von 90 V bei einer Stromstärke von 400 mA für eine Dauer von 80 Minuten angelegt. Durch das negativ geladene Rückgrat der DNA wandern die DNA-Fragmente zur Kathode. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt dabei entsprechend ihrer Größen. Je kleiner die Fragmente sind, desto schneller gelangen sie durch das Gitter des Agarosegels und legen dadurch in der vorgegebenen Zeit eine weitere Strecke zurück als die größeren DNA-Fragmente.

Tab. 2-46: Zusammensetzung der Mischung zur Befüllung der Taschen des Agarosegels.

	Volumen [µl] pro Tasche	
	Proben:	Marker:
PCR-Produkt	20	-
Marker	-	7
Ladepuffer	6	2
SYBR-Green	1	1
SUMME	27	10

Die Messung der PCR-Produkte durch den *QIAxcel* erfolgt ebenfalls durch Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe. Die DNA-Fragmente werden dabei in

eine mit Gel-Matrix und linearen Ethidiumbromid-Polymeren gefüllte Kapillare durch eine angesetzte Spannung hochgezogen. Ähnlich wie bei der Gelelektrophorese erreichen die kleineren DNA-Fragmente früher die Kathode als die größeren. Durch die Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid an die DNA erhöht sich die Intensität der Fluoreszenz um ein Vielfaches. Die DNA, die die Kapillare hochläuft, kann daher durch die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff mit einem speziellen Detektor am oberen Bereich der Kapillare erfasst und mittels eines Photoelektronenvervielfältigers in ein Elektropherogramm oder ein Gel-Bild umgewandelt werden (Lepecq and Paoletti, 1967; QIAGEN, 2017).

### **2.2.5 Auswertung der LightCycler-Daten**

Alle Proben wurden jeweils mindestens in Triplikaten gemessen. Eine Probe wurde dann als positiv bezeichnet, wenn mindestens 50 % eine Amplifikation mit einem  $C_q$ -Wert  $< 40$  aufwies, graphisch eine Amplifikationskurve sichtbar war und die im gleichen Lauf mitgemessenen Negativkontrollen (Wasser/DNA aus gesundem Vollblut) negativ waren.

Die mittels der Standardkurven ermittelten Detektionslimits sind jeweils die höchsten Verdünnungen, bei denen noch eine Amplifikation nachgewiesen werden kann. Hierfür wurde jede Verdünnung dreimal in Triplikaten gemessen. Es waren somit mind. 5 aus 9 Messungen nötig, in denen eine Amplifikation mit einem  $C_q$ -Wert  $< 40$  dargestellt werden konnte und die oben genannten Kriterien zutrafen. Die Darstellung der Standardkurve entspricht einer Regressionsgeraden, die sich nach Auftragen der jeweiligen Mittelwerte der  $C_q$ -Werte aus den 9 Messungen gegenüber dem Logarithmus der Parasitämie errechnen ließ. Die jeweilige Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ , welches aufzeigt wie gut die Gerade die einzelnen Messpunkte repräsentiert, wurden jeweils mitangegeben. Die Effizienz der Amplifikation wurde entsprechend der Formel 2-1 berechnet.

$$E = (10^{-1/Steigung}) - 1$$

*Formel 2-1: Berechnung der Effizienz anhand der Steigung der Standardkurve (Bustin et al., 2009).*

Eine hundertprozentige Effizienz würde eine Verdopplung der DNA bei jedem Zyklus bedeuten.

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein in der Arbeitsgruppe entwickeltes Protokoll (Kreidenweiss et al., 2019) einer *4plex* quantitativen *real-time PCR* (*4plex-qPCR*) weiterentwickelt und zur Messung von klinischen Proben, die von Probanden aus Gabun gewonnen wurden, angewandt. In einer einzigen Probe werden zeitgleich Infektionen mit *P. falciparum* detektiert, der Status der *hrp2*- und *hrp3*-Gene bestimmt, und eine Qualitätskontrolle (*β-tubulin*) mitgemessen. Neue Primer für *hrp2* und *hrp3* (*hrp2\_v2*, *hrp3\_v3*) wurden getestet, um eine *4plex-qPCR* der zweiten Generation (*4plex-qPCR\_v2*) mit optimierter Detektion der *hrp2*-/*hrp3*-Gene zu entwickeln. Zudem wurde die Sensitivität des *4plex-qPCR\_v2* mit der *PCR*, die konventionelle Methode zur Detektion von *hrp2*-/*hrp3*-Deletionen, verglichen. Das weiter entwickelte *4plex-qPCR\_v2* Protokoll soll das Risiko minimieren, dass fälschlicherweise *hrp2*-Deletionen detektiert werden und somit die Prävalenz der Deletionen zu hoch erfasst wird.

#### 3.1 Etablierung der *4plex-qPCR\_v2*

Basierend auf dem Ausgangprotokoll der *4plex-qPCR\_v1* etabliert von Franziska Trauner (Trauner, 2019) wurden neue Primer-Paare und Sonden für *hrp2* und *hrp3* bestellt und getestet. Hinweis zur Konvention der Bezeichnung in der Arbeit: Reagenzien und Protokolle, die abweichend sind vom *4plex*-Protokoll, Trauner, werden im Weiteren mit dem Zusatz „v2“ gekennzeichnet.

In den Tab. 3-1 und Tab. 3-2 sind die jeweiligen Primer- und Sonden-Sequenzen nochmal im direkten Vergleich dargestellt.

Tab. 3-1: qPCR-Primer- und Sondensequenzen des *hrp2*-Gen.

		Sequenz
Forward Primer in 5'-3' Richtung	<i>hrp2_v2</i>	TTCCGCATTTAATAATAACTTGTG
	<i>hrp2</i>	AGGACTTAATTTAAATAAGAGATTA
Reverse Primer in 5'-3' Richtung	<i>hrp2_v2</i>	CGGCTACATGATGAGCATG
	<i>hrp2</i>	GCTACATGATGAGCATGA
Sonde in 5'-3' Richtung	<i>hrp2_v2</i>	ACTCAAGCACATGTAGATGATGCC
	<i>hrp2</i>	TACACGAAACTCAAGCACA

Tab. 3-2: qPCR-Primer- und Sondensequenzen des *hrp3*-Gen.

		Sequenz
Forward Primer In 5'-3' Richtung	<i>hrp3_v2</i>	CTCCGAATTTAACAATAACTTGTTTA
	<i>hrp3</i>	AGGACTTAATTCAAATAAGAGATTA
Reverse Primer in 5'-3' Richtung	<i>hrp3_v2</i>	CAGCTACATGATGTGCATG
	<i>hrp3</i>	AGCTACATGATGTGCATGA
Sonde in 5'-3' Richtung	<i>hrp3_v2</i>	AGTCAAGCACATGCAGGTGATGCC
	<i>hrp3</i>	GAAAGTCAAGCACATGCAG

Ziel der neuen Primersequenzen war es die Kreuzreaktivität zwischen *hrp2* und *hrp3* zu verringern. In Tab. 3-3 sind die Fehlpaarungen, die sich durch eine Anlagerung an das jeweils fälschliche Gen ergeben würden und im Falle einer Kreuzreaktivität überwunden werden müssten, sowohl für die Sonden und Primer der ersten als auch der zweiten Generation zusammengefasst (*hrp2*-Primer/Sonde an *hrp3*-Gen, bzw. *hrp3*-Primer/Sonde an *hrp2*-Gen). In den Abb. 10-5, Abb. 10-6, Abb. 10-7, Abb. 10-8, Abb. 10-9 und Abb. 10-10 des Anhangs sind die einzelnen Primer- und Sondensequenzen für *hrp2* und *hrp3* einander gegenüber gestellt und die Mismatches grafisch hervorgehoben.

Tab. 3-3: Anzahl der Mismatches zwischen den qPCR-Primern und Sonden für *hrp2* und *hrp3*.

		Fehlpaarung zw. <i>hrp2</i> & <i>hrp3</i>
<i>qPCR Fwd Primer</i>	neu	4
	alt	1
<i>qPCR Rev Primer</i>	neu	2
	alt	3
<i>qPCR Sonde</i>	neu	3
	alt	2

In Bezug auf die Primer sind dabei unter der neuen Generation in Summe sechs Fehlpaarungen im Falle einer Kreuzreaktivität zu überwinden, im Gegensatz zu vier bei der alten Generation. Das lässt entsprechend auf eine höhere Spezifität hoffen.

### 3.1.1 Singleplex-qPCR

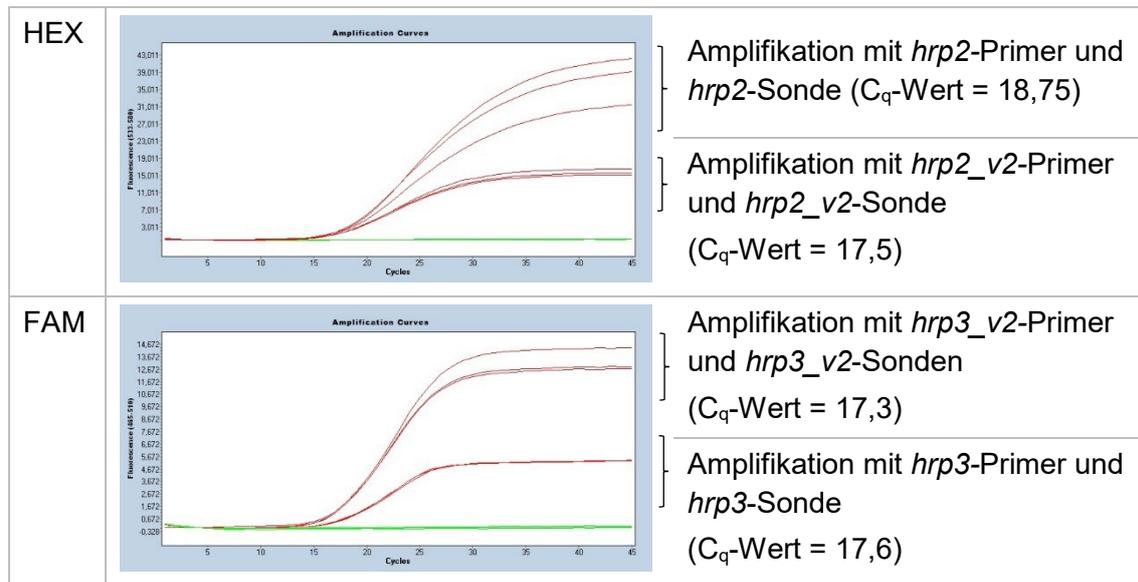
Zunächst wurden die Messungen der neuen Primer als *singleplex-qPCR* durchgeführt. Dies ermöglichte eine separate Beurteilung der Qualität der *qPCR* ohne Einflüsse/Störungen durch andere Komponenten, die zu interferierenden Signal-Überlagerungen durch die Fluoreszenzfarbstoffe, usw. führen können.

In der ersten *singleplex*-Reaktion wurde der neue Assay mit den neuen Primern und Sonden (*hrp2\_v2*, *hrp3\_v2*) mit dem alten Assay mit den alten Primern und Sonden (*hrp2*, *hrp3*) für die Amplifikation von *hrp2* und *hrp3* bei Pf3D7<sup>2</sup> verglichen.

Die Amplifikation hat sowohl mit dem neuen als auch mit dem alten Assay funktioniert (vgl. Tab. 3-4). Im Vergleich zu dem alten Assay ergaben sich unter Verwendung des *hrp2\_v2*-Assays niedrigere Fluoreszenzintensitäten, bzw. unter Verwendung des *hrp3\_v2*-Assays höhere Fluoreszenzintensitäten. Die  $C_q$ -Werte unterschieden sich zwischen den beiden Assays nicht im relevanten Maße.

In den abgebildeten Grafiken gibt die Y-Achse stets die RFU (Relative Fluoreszenz-Units), die X-Achse die Anzahl der Zyklen an.

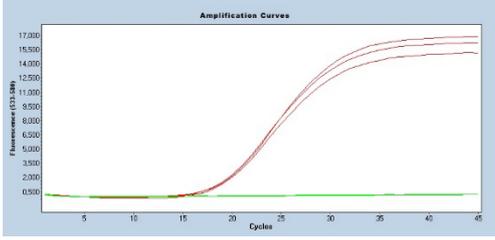
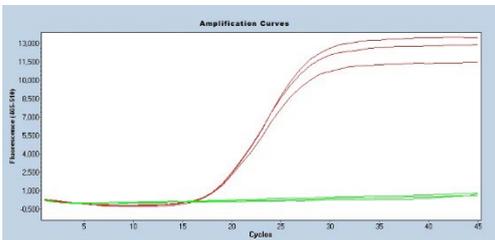
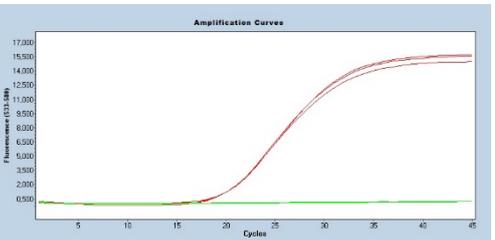
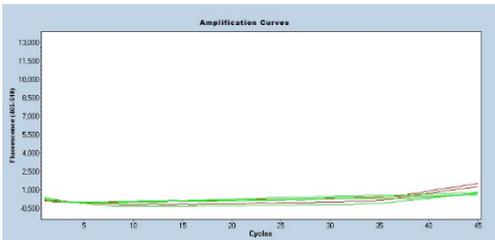
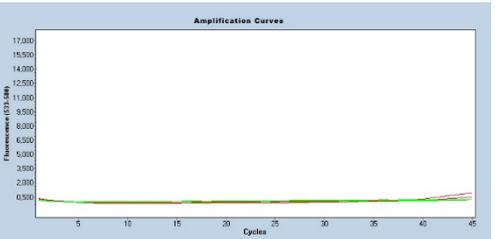
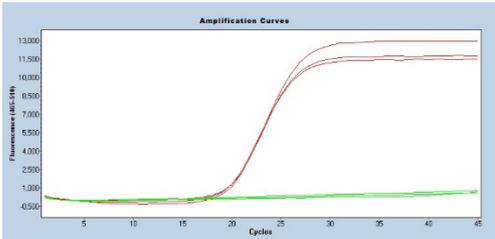
Tab. 3-4: Vergleich des neuen und alten Assays in singleplex-qPCR mit Pf3D7 ② und Negativkontrollen als template.



### 3.1.1.1 Kreuzreaktivität der neuen hrp-Assays

Es ist wichtig, dass die *hrp2*- bzw. *hrp3*-qPCR-Assays (= Primer und Sonde) spezifisch das jeweilige Zielgen amplifizieren. Zur Untersuchung der Spezifität der Primer wurde *Template*-DNA von PfDd2 (*hrp2* neg/*hrp3* pos) und PfHB3 (*hrp2* pos/*hrp3* neg) zusätzlich zu Pf3D7 ① (*hrp2* pos/*hrp3* pos) als Kontrolle verwendet. Zwar steigt die Fluoreszenzintensität für den *hrp2\_v2*-Assay bei PfDd2 (nur *hrp3*-Gen) und für *hrp3\_v2* bei PfHB3 (nur *hrp2*-Gen) gegen Ende des Zyklus minimal an, jedoch ist dies zu vernachlässigen (vgl. Tab. 3-5). Die neuen *hrp2\_v2* und *hrp3\_v2*-Assays detektieren spezifisch das entsprechende Zielgen.

Tab. 3-5: Kreuzreaktivität der neuen *hrp*-Assays in *singleplex-qPCR* mit Pf3D7 ①, PfHB3, PfDd2 und Negativkontrollen als *template*.

	HEX ( <i>hrp2</i> )	FAM ( <i>hrp3</i> )
Pf3D7	 <p>C<sub>q</sub>-Wert: 19,16</p>	 <p>C<sub>q</sub>-Wert: 18,44</p>
PfHB3	 <p>C<sub>q</sub>-Wert: 20,26</p>	 <p>C<sub>q</sub>-Wert: 35,83</p>
PfDd2	 <p>C<sub>q</sub>-Wert: 39,1</p>	 <p>C<sub>q</sub>-Wert: 19,69</p>

### 3.1.1.2 Kreuzreaktivität der einzelnen Komponenten

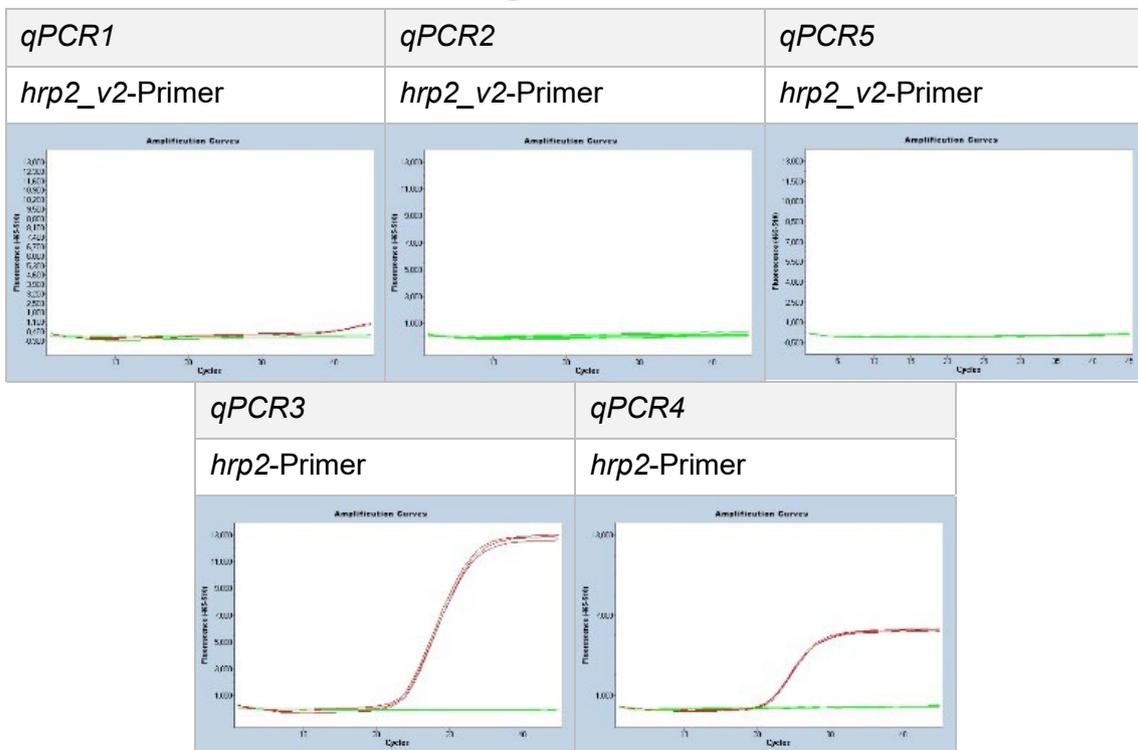
Um die Kreuzreaktivität der Primer und der Sonden getrennt voneinander zu überprüfen, wurden *singleplex-qPCR* durchgeführt, bei denen die *hrp2*-Primer mit der Sonde für *hrp3* bzw. umgekehrt kombiniert wurden (Kreuzreaktion-Assays 1 und 2) und mit *Template*-DNA aus PfDd2 bzw. PfHB3 getestet wurden (vgl. Tab. 2-24 und Abb. 2-1).

In den Tab. 3-6, Tab. 3-7, Tab. 3-8 und Tab. 3-9 sind jeweils die Kombinationen genannt, die zur separaten Beurteilung einer einzelnen Komponente entscheidend sind. Darunter sind alle Graphen der fünf verschiedenen *qPCR*s dieser Kombination abgebildet sowie die dabei verwendete Generation der Komponente

vermerkt. Die Spezifität ist umso schlechter je eindeutiger eine Amplifikationskurve erkennbar ist.

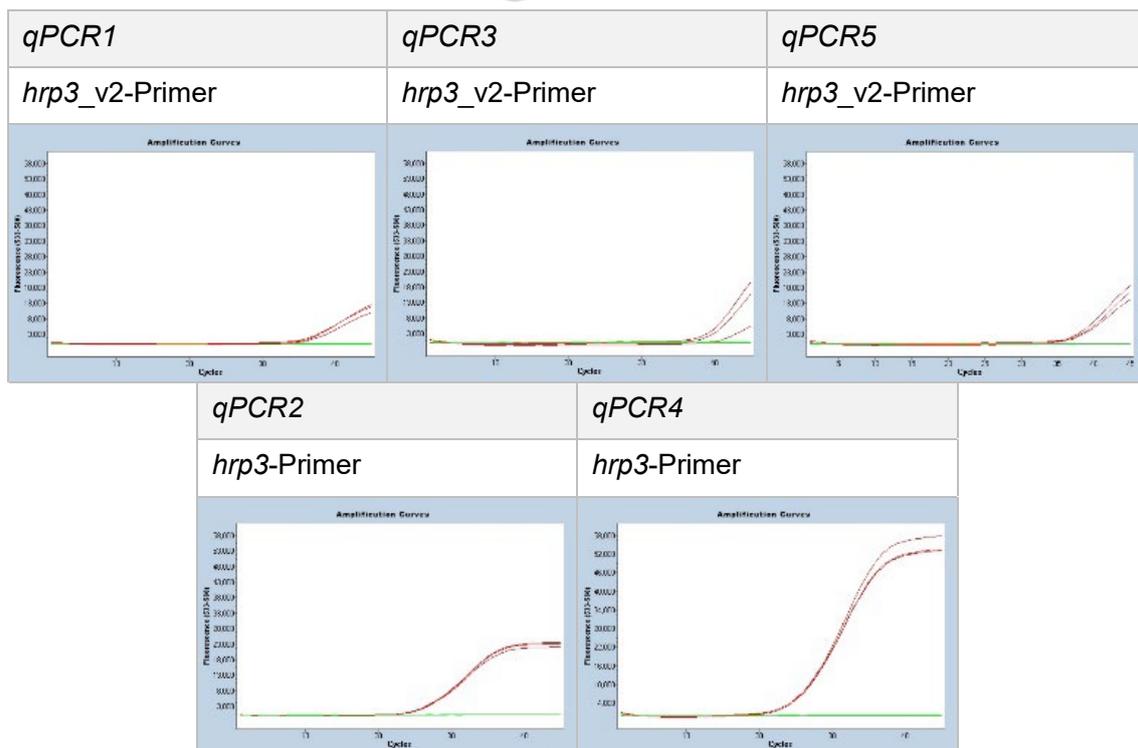
Tab. 3-6: *hrp2*-Primer-Spezifität: singleplex-qPCR mit *PfDd2*, *PfHB3*, *Pf3D7* Ⓢ und Negativkontrollen als template.

	Kombination	Bedeutung/Interpretation
<i>hrp2</i> -Primer-Spezifität	Primer: <i>hrp2</i> Sonde: <i>hrp3</i> DNA: <i>PfDd2</i> Kanal: FAM	Signal in FAM: Amplifikation durch <i>hrp2</i> -Primerbindung an <i>hrp3</i> Gen. (Max. Y-Achse = 13 RFU)



Tab. 3-7: *hrp3*-Primer-Spezifität: singleplex-qPCR mit *PfDd2*, *PfHB3*, *Pf3D7* ① und Negativkontrollen als template.

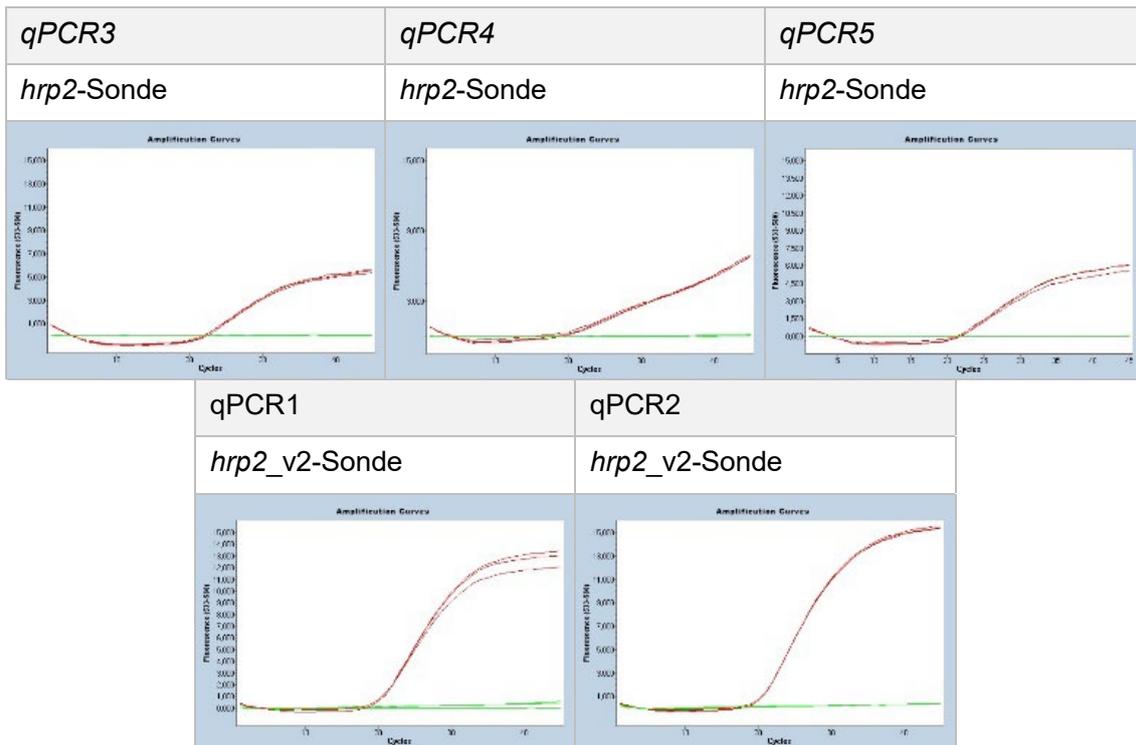
	Kombination	Bedeutung/Interpretation
<i>hrp3</i> -Primer-Spezifität	Primer: <i>hrp3</i> Sonde: <i>hrp2</i> DNA: <i>PfHB3</i> Kanal : HEX	Signal in HEX: Amplifikation durch <i>hrp3</i> -Primerbindung an <i>hrp2</i> -Gen. (Max. Y-Achse = 58 RFU)



Insgesamt scheinen hierbei die Primer der neuen Generation (*v2*) sowohl für *hrp2* als auch für *hrp3* spezifischer zu sein als die der alten Generation, da sich keine bzw. spätere und flachere Amplifikationskurven in diesen Fällen ergaben.

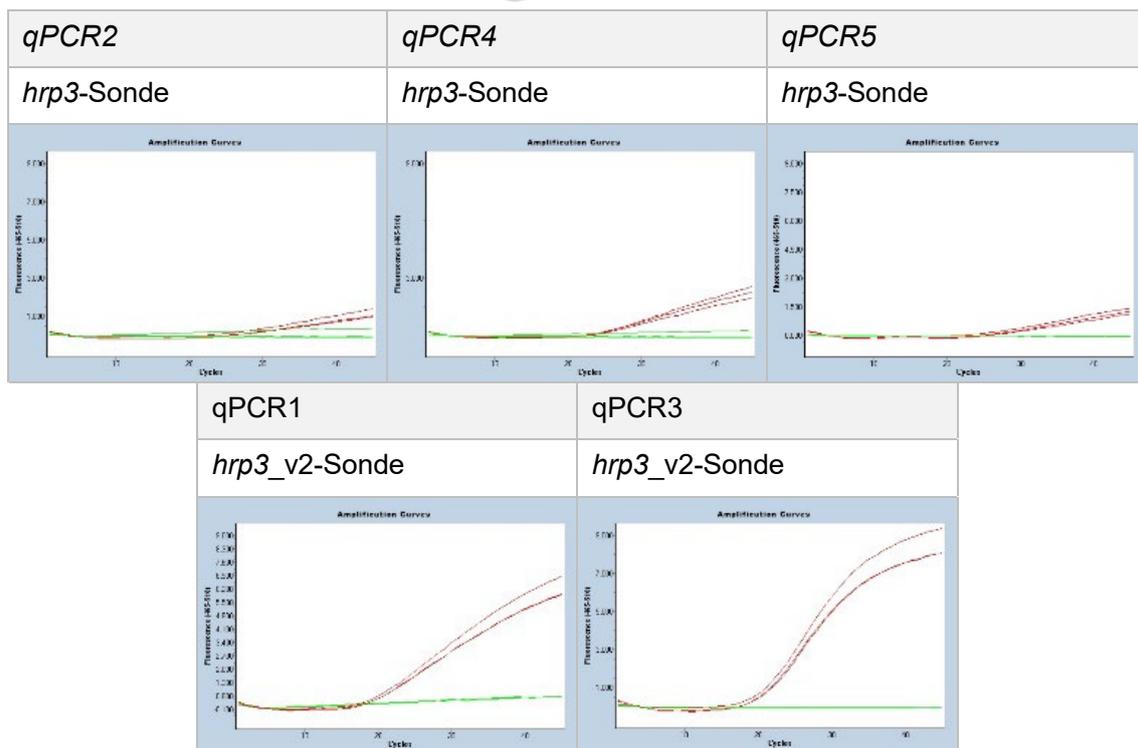
Tab. 3-8: *hrp2*-Sonden-Spezifität: singleplex-qPCR mit *PfDd2*, *PfHB3*, *Pf3D7* ① und Negativkontrollen als template.

	Kombination	Bedeutung/Interpretation
<i>hrp2</i> -Sonden-Spezifität	Primer: <i>hrp3</i> Sonde: <i>hrp2</i> DNA : <i>PfDd2</i> Kanal : HEX	Signal in HEX: Amplifikation durch <i>hrp2</i> -Sondenbindung an <i>hrp3</i> -Gen. (Max. Y-Achse = 15 RFU)



Tab. 3-9: *hrp3*-Sonden-Spezifität: *singleplex-qPCR* mit *PfDd2*, *PfHB3*, *Pf3D7* ① und Negativkontrolle als template.

	Kombination	Bedeutung/Interpretation
<i>hrp3</i> -Sonden-Spezifität	Primer: <i>hrp2</i> Sonde: <i>hrp3</i> DNA: <i>PfHB3</i> Kanal: FAM	Signal in FAM: Amplifikation durch <i>hrp3</i> -Sondenbindung an <i>hrp2</i> -Gen. (Max. Y-Achse = 9 RFU)



Bei den Sonden waren die Ergebnisse nicht so eindeutig wie bei den Primern. Ein kleine Überlegenheit ließ sich jedoch bei den Sonden der alten Generation im Gegensatz zu den Sonden der neuen Generation erkennen.

Im weiteren Verlauf wurden entsprechend dieser Ergebnisse für die Optimierung einer *4plex-qPCR* die neuen Primer (*v2*) und die alten Sonden für *hrp2* und *hrp3* verwendet.

### 3.1.2 Optimierung der *4plex-qPCR\_v2*

Basierend auf dem bereits etablierten *4plex-qPCR*-Protokoll wurde dieses mit den *hrp2*/*hrp3*-Primern der 2. Generation (*v2*) erweitert und neu optimiert.

### 3.1.2.1 Optimierung der Fluoreszenzintensitäten

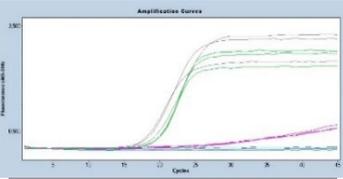
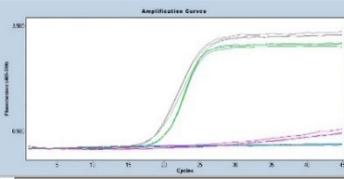
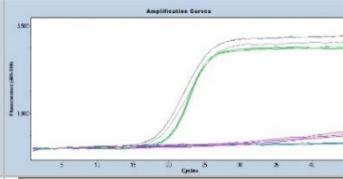
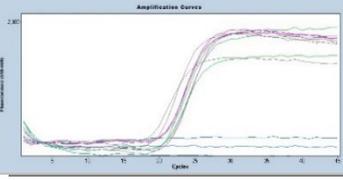
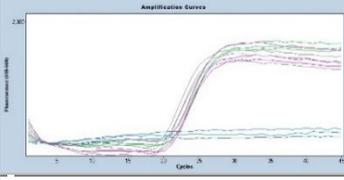
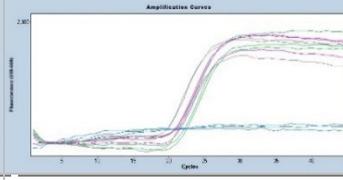
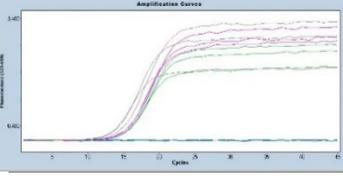
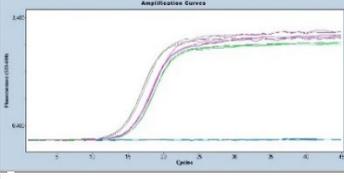
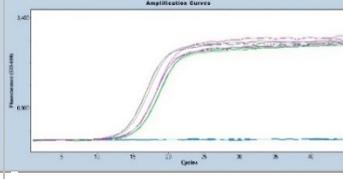
Bei der *4plex-qPCR\_v2* wird die Amplifikation von vier verschiedenen Genen (*cytb*, *hrp2*, *hrp3*,  $\beta$ -*tub*) parallel über fluoreszierende Sonden detektiert. Idealerweise sollte das Fluoreszenzsignal bei Positivität ungefähr dieselbe Intensität in den entsprechend verschiedenen Kanälen aufweisen. Hierzu wurden verschiedene Parameter der *qPCR* (Temperatur, Primer- und Sondenkonzentrationen sowie Elongationszeiten) variiert, mit dem gleichzeitigen Ziel, die Kreuzreaktivität für *hrp2* und *hrp3* minimal zu halten. Miteinbezogen in die Analyse und abgebildet in den jeweiligen Tabellen wurden immer die  $C_q$ -Werte sowie die RFU.

#### Hybridisierungstemperatur der Primer

Es wurden Hybridisierungstemperaturen von 60 °C, 61 °C und 62 °C getestet. Eine Temperatur von 62 °C hat sich als optimal erwiesen (vgl. Tab. 3-10). Zwar hat sich die Fluoreszenzintensität für die vier Amplifikate über die drei verschiedenen Temperaturen nicht verändert, jedoch haben die minimalen Kreuzamplifikationen von *hrp2* und *hrp3* bei zunehmender Temperatur weiter abgenommen. Die weiteren *qPCRs* wurden daher bei einer Temperatur der Primer-Hybridisierung von 62°C durchgeführt.

Tab. 3-10: Variation der Hybridisierungstemp.: *4plex-qPCR\_v2* mit *PfDd2*, *PfHB3*, *Pf3D7* ① und Negativkontrollen (Wasser und DNA-Extrakt aus gesundem Vollblut) als template.

	60 °C	61 °C	62 °C					
<b>HEX/hrp2</b>								
	<b><math>C_q</math></b>	<b><math>C_q</math></b>	<b><math>C_q</math></b>					
	<b>RFU</b>	<b>RFU</b>	<b>RFU</b>					
	<b>PfDd2</b>	21,8	2,7	<b>PfDd2</b>	-	-	<b>PfDd2</b>	-
<b>PfHB3</b>	21,6	30,1	<b>PfHB3</b>	21,1	29,2	<b>PfHB3</b>	21,0	27,8
<b>Pf3D7</b>	20,0	31,4	<b>Pf3D7</b>	20,1	30,7	<b>Pf3D7</b>	20,2	29,5

	60 °C	61 °C	62 °C
<b>FAM/hrp3</b>			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 19,4    2,9	<b>PfDd2</b> 19,7    3,1	<b>PfDd2</b> 19,7    3,0
	<b>PfHB3</b> -       -	<b>PfHB3</b> -       -	<b>PfHB3</b> -       -
	<b>Pf3D7</b> 18,5    3,3	<b>Pf3D7</b> 18,6    3,4	<b>Pf3D7</b> 18,6    3,3
<b>CY5/β-tub</b>			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,7    2,2	<b>PfDd2</b> 20,9    2,0	<b>PfDd2</b> 20,9    2,2
	<b>PfHB3</b> 20,7    2,2	<b>PfHB3</b> 20,6    2,0	<b>PfHB3</b> 20,4    2,1
	<b>Pf3D7</b> 19,2    2,1	<b>Pf3D7</b> 19,4    1,8	<b>Pf3D7</b> 19,2    2,0
<b>ROX/cytb</b>			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 15,5    2,7	<b>PfDd2</b> 15,4    2,8	<b>PfDd2</b> 15,4    2,7
	<b>PfHB3</b> 15,3    3,2	<b>PfHB3</b> 15,0    3,1	<b>PfHB3</b> 14,9    3,0
	<b>Pf3D7</b> 13,8    3,4	<b>Pf3D7</b> 13,8    3,1	<b>Pf3D7</b> 13,7    2,9

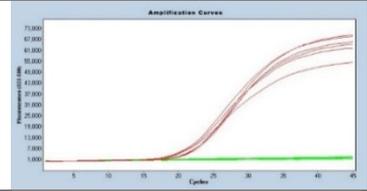
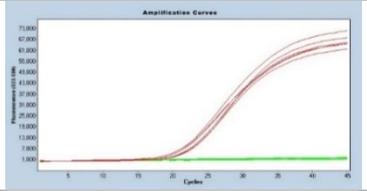
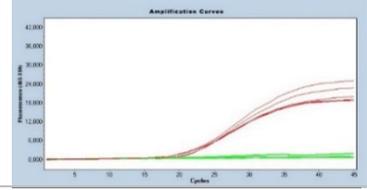
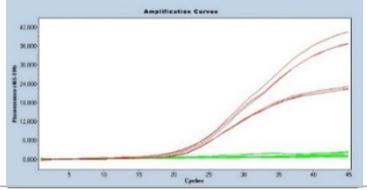
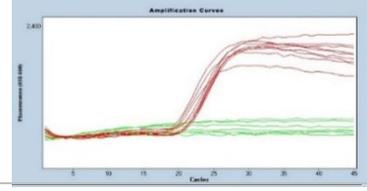
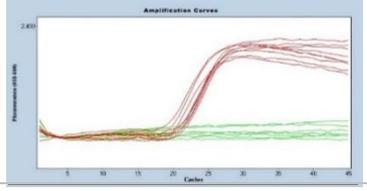
### hrp3-Sondenkonzentration

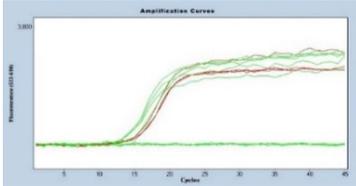
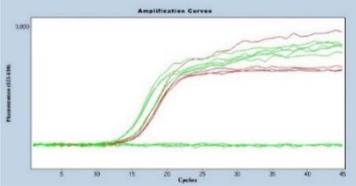
Bislang lag die Fluoreszenzintensität bei positiver Amplifikation von *hrp3* in der Größenordnung von ca. 3 RFU und bei *hrp2* bei ca. 30 RFU (vgl. Tab. 3-10). Durch Variation der *hrp3*-Sondenkonzentration sollte das Fluoreszenzsignal von *hrp3* dem des *hrp2* angeglichen werden. Die bisherige Konzentration betrug 50 nM. Nun wurde auch 100 nM getestet. Interessanterweise führte allein das

Ansetzen neuer Reagenzien und Verdünnungen aus einer neuen Bestellung (Bestellung 2) zu dem gewünschten Effekt, der Erhöhung der Fluoreszenzintensität im FAM-Kanal auf durchschnittlich ca. 20 RFU (vgl. Tab. 3-11).

Für die weiteren Experimente wurde daher die ursprüngliche Konzentration von 50 nM beibehalten, da die Fluoreszenzintensität durch die neue Verdünnung auch in dieser Konzentration ausreichend war.

Tab. 3-11: Variation der hrp3-Sondenkonz.: 4plex-qPCR\_v2 mit pfDd2, PfHB3, Pf3D7 und Negativkontrollen als template.

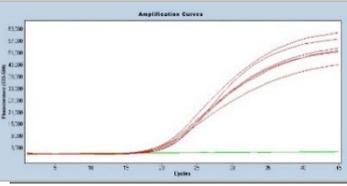
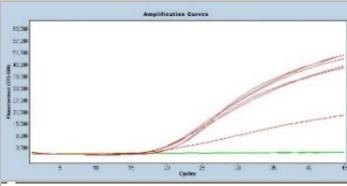
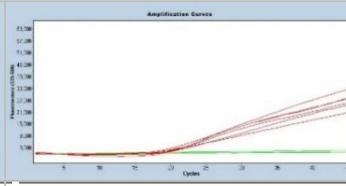
	50 nM	100 nM
HEX/hrp2		
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -
	<b>PfHB3</b> 22,6    70,7	<b>PfHB3</b> 22,5    73,0
	<b>Pf3D7</b> 21,4    69,9	<b>Pf3D7</b> 21,5    69,1
FAM/hrp3		
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 21,5    19,34	<b>PfDd2</b> 21,8    41,3
	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> -    -
	<b>Pf3D7</b> 22,5    25,4	<b>Pf3D7</b> 23,5    23,7
Cy5/β-tub		
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,9    2,3	<b>PfDd2</b> 20,9    2,2
	<b>PfHB3</b> 20,6    2,4	<b>PfHB3</b> 20,4    2,0
	<b>Pf3D7</b> 19,0    2,1	<b>Pf3D7</b> 19,1    2,1

	50 nM	100 nM
ROX/cytb		
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 15,4    2,6	<b>PfDd2</b> 15,4    2,6
	<b>PfHB3</b> -        (3,2)	<b>PfHB3</b> -        (3,7)
<b>Pf3D7</b> -        (3,0)	<b>Pf3D7</b> -        (3,4)	

### hrp2-Primerkonzentration

Um die maximale Fluoreszenzintensitäten der Amplifikationen von *hrp2* und *hrp3* weiter anzugleichen, wurde der Einfluss der *hrp2*-Primerkonzentration auf das Fluoreszenzsignal im HEX-Kanal untersucht. Hierzu wurden verschiedene *hrp2*-Primerkonzentrationen getestet - bislang 400 nM, nun auch 200 nM und 100 nM Konzentrationen (vgl. Tab. 3-12). Allerdings wurde bei niedrigeren Primerkonzentrationen die *hrp2*-Amplifikation schlechter. Die Konzentration wurde daher bei 400 nM belassen.

Tab. 3-12: Variation der *hrp2*-Primerkonz.: 4plex-qPCR\_v2 mit *pfDd2*, *PfHB3*, *Pf3D7* und Negativkontrollen als template.

	400 nM	200 nM	100 nM
HEX/ <i>hrp2</i>			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -        -	<b>PfDd2</b> -        -	<b>PfDd2</b> -        -
	<b>PfHB3</b> 21,0    58,9	<b>PfHB3</b> 20,0    50,7	<b>PfHB3</b> 19,9    28,7
<b>Pf3D7</b> 20,0    62,3	<b>Pf3D7</b> 19,2    50,8	<b>Pf3D7</b> 17,4    33,2	

	400 nM	200 nM	100 nM
FAM/hrp3			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,9    17,8	<b>PfDd2</b> 21,1    17,7	<b>PfDd2</b> 21,1    17,4
	<b>PfHB3</b> -        -	<b>PfHB3</b> -        -	<b>PfHB3</b> -        -
	<b>Pf3D7</b> 21,0    22,9	<b>Pf3D7</b> 21,3    23,6	<b>Pf3D7</b> 20,6    23,1
Cy5/β-tub			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,3    1,9	<b>PfDd2</b> 20,5    2,2	<b>PfDd2</b> 20,5    2,1
	<b>PfHB3</b> 19,6    1,6	<b>PfHB3</b> 19,4    1,5	<b>PfHB3</b> 19,9    1,7
	<b>Pf3D7</b> 18,3    1,6	<b>Pf3D7</b> 18,4    1,5	<b>Pf3D7</b> 18,3    1,6
ROX/cytb			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -        (1,9)	<b>PfDd2</b> 15,7    2,2	<b>PfDd2</b> 15,1    2,3
	<b>PfHB3</b> -        (2,1)	<b>PfHB3</b> -        (2,4)	<b>PfHB3</b> -        (2,3)
	<b>Pf3D7</b> -        (2,0)	<b>Pf3D7</b> -        (2,0)	<b>Pf3D7</b> -        (2,1)

### Cytochrom b-Primer- und Sondenkonzentration

Auch für die Primer- und Sondenkonzentrationen für *cytochrom b* sollten kontrolliert werden, ob sie für das neue *4plex-qPCR\_v2* Protokoll passend sind. Die Primer wurden zusätzlich zur ursprünglichen Konzentration von 100 nM auch bei einer Konzentration von 200 und 400 nM getestet. Die Sonde wurde zusätzlich von 50 nM auch mit 100 und 150 nM getestet. Mit zunehmender Primerkonzentration nahm auch die Signalintensität zu (vgl. Tab. 3-13). Eine erhöhte Sonden-

konzentration erhöhte zwar auch das Signal für *cytochrom b*, verschlechterte allerdings auch die Amplifikationen von *β-tubulin* (vgl. Tab. 3-14). Für die nächsten Versuche wurde daher die *cytochrom b*-Primerkonzentration auf 400 nM festgelegt und die Sondenkonzentration in einem weiteren Schritt unter Variation der *β-tubulin*-Primerkonzentration sowohl mit 50 als auch 150 nM ein weiteres Mal getestet.

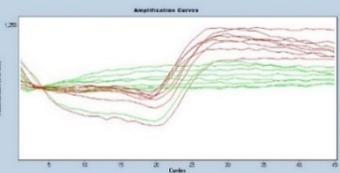
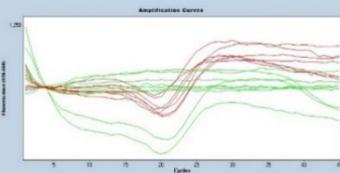
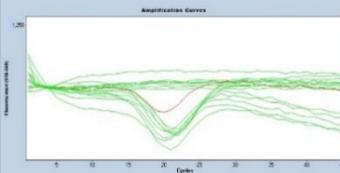
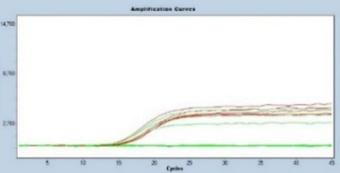
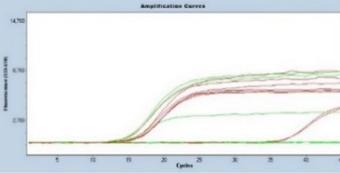
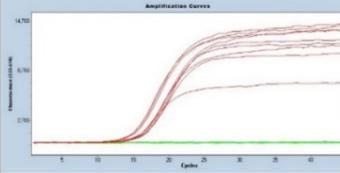
Tab. 3-13: Variation der *cytb*-Primerkonz.: 4plex-qPCR\_v2 mit *pfDd2*, *PfHB3*, *Pf3D7* und Negativkontrollen als template.

	100 nM	200 nM	400 nM
HEX/hrp2			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -
	<b>PfHB3</b> 20,3    53,4	<b>PfHB3</b> 20,7    60,1	<b>PfHB3</b> 20,9    57,2
	<b>Pf3D7</b> 21,1    65,0	<b>Pf3D7</b> 20,9    69,8	<b>Pf3D7</b> 20,1    63,0
FAM/hrp3			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,9    17,4	<b>PfDd2</b> 21,0    17,1	<b>PfDd2</b> 21,1    20,0
	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> 35,7    0,9
	<b>Pf3D7</b> 22,2    24,6	<b>Pf3D7</b> 22,1    26,7	<b>Pf3D7</b> 21,8    25,6
Cy5/β-tub			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,5    1,2	<b>PfDd2</b> 20,7    1,4	<b>PfDd2</b> 20,9    1,6
	<b>PfHB3</b> 19,5    1,1	<b>PfHB3</b> 19,8    0,9	<b>PfHB3</b> 20,2    1,0
	<b>Pf3D7</b> 19    1,1	<b>Pf3D7</b> 19,1    1,4	<b>Pf3D7</b> 19,2    1,2

	100 nM	200 nM	400 nM						
ROX/cytb									
	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>			
	<b>PfDd2</b>	-	(2,4)	<b>PfDd2</b>	15,4	2,9	<b>PfDd2</b>	16,3	4,6
	<b>PfHB3</b>	-	(2,9)	<b>PfHB3</b>	-	(4,2)	<b>PfHB3</b>	15,7	5,4
	<b>Pf3D7</b>	-	(3,1)	<b>Pf3D7</b>	-	(4,0)	<b>Pf3D7</b>	14,7	5,6

Tab. 3-14: Variation der cytb-Sondenkonz.: 4plex-qPCR\_v2 mit pfDd2, PfHB3, Pf3D7 und Negativkontrollen als template.

	50 nM	100 nM	150 nM						
HEX/hrp2									
	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>			
	<b>PfDd2</b>	-	-	<b>PfDd2</b>	-	-	<b>PfDd2</b>	-	-
	<b>PfHB3</b>	20,5	57,5	<b>PfHB3</b>	20,5	31,4	<b>PfHB3</b>	20,6	55,9
<b>Pf3D7</b>	20,6	65,0	<b>Pf3D7</b>	20,9	65,9	<b>Pf3D7</b>	20,9	62,9	
FAM/hrp3									
	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>			
	<b>PfDd2</b>	20,8	17,2	<b>PfDd2</b>	21,0	17,4	<b>PfDd2</b>	21,4	18,5
	<b>PfHB3</b>	-	-	<b>PfHB3</b>	-	-	<b>PfHB3</b>	-	-
<b>Pf3D7</b>	22,2	23,4	<b>Pf3D7</b>	22,3	25,6	<b>Pf3D7</b>	22,4	26,2	

	50 nM	100 nM	150 nM
Cy5/ $\beta$ -tub			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,8    1,2	<b>PfDd2</b> 21,1    0,9	<b>PfDd2</b> -       -
	<b>PfHB3</b> 20,1    1,1	<b>PfHB3</b> 20,2    1,2	<b>PfHB3</b> -       -
	<b>Pf3D7</b> 19,3    1,2	<b>Pf3D7</b> 19,8    1,0	<b>Pf3D7</b> -       -
ROX/cytb			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 16,12    4,0	<b>PfDd2</b> 16,4    6,6	<b>PfDd2</b> 16,6    12,6
	<b>PfHB3</b> 15,8    4,7	<b>PfHB3</b> 15,9    8,8	<b>PfHB3</b> 15,7    13,9
	<b>Pf3D7</b> -       (5,2)	<b>Pf3D7</b> -       (8,8)	<b>Pf3D7</b> 15,1    14,6

### $\beta$ -tubulin-Primerkonzentration

Zunächst wurde bei einer *cytochrom b*-Sondenkonzentration von 150 nM die  $\beta$ -tubulin-Primerkonzentration verändert und anschließend die unterschiedlichen  $\beta$ -tubulin-Primerkonzentrationen auch unter einer *cytochrom b*-Sondenkonzentration von bei 50 nM getestet (vgl. Tab. 3-15, Tab. 3-16). Die erhöhte  $\beta$ -tubulin-Primerkonzentration von 600 nM bei der höheren *cytochrom b*-Sondenkonzentration von 150 nM verbesserte das Amplifikationssignal von Cy5 deutlich und erbrachte weiterhin das verbesserte Signal in ROX. Für die nächsten Experimente wurde daher eine *cytochrom b*-Sondenkonzentration von 150 nM, sowie eine  $\beta$ -tubulin-Primerkonzentration von 600 nM eingesetzt.

Tab. 3-15: Variation der  $\beta$ -tub-Primerkonz. bei cytb-Sondenkonz. 150 nM: 4plex-qPCR\_v2 mit PfDd2, PfHB3, Pf3D7 und Negativkontrollen als template.

	400 nM	500 nM	600 nM
HEX/hrp2			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 18,1    2,7	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -
	<b>PfHB3</b> 21,6    75,7	<b>PfHB3</b> 21,9    79,4	<b>PfHB3</b> 22,1    78,1
	<b>Pf3D7</b> 21,7    86,6	<b>Pf3D7</b> 21,8    87,3	<b>Pf3D7</b> 21,5    85,9
FAM/hrp3			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,9    20,0	<b>PfDd2</b> 21,0    19,3	<b>PfDd2</b> 20,9    20,6
	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> 35,8    1,3
	<b>Pf3D7</b> 22,8    28,1	<b>Pf3D7</b> 23,0    28,4	<b>Pf3D7</b> 22,7    27,7
Cyt5/ $\beta$ -tub			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 21,0    1,6	<b>PfDd2</b> 21,1    1,7	<b>PfDd2</b> 21,1    1,7
	<b>PfHB3</b> 20,4    1,2	<b>PfHB3</b> 20,6    1,6	<b>PfHB3</b> 20,6    1,4
	<b>Pf3D7</b> 19,6    1,3	<b>Pf3D7</b> 19,6    1,6	<b>Pf3D7</b> 19,6    1,6
ROX/cytb			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 16,5    9,3	<b>PfDd2</b> 16,6    8,8	<b>PfDd2</b> 16,6    10,1
	<b>PfHB3</b> 15,9    10,4	<b>PfHB3</b> 16,0    11,0	<b>PfHB3</b> 16,1    11,2
	<b>Pf3D7</b> 15,0    11,4	<b>Pf3D7</b> 15,0    11,3	<b>Pf3D7</b> 15,0    11,7

Tab. 3-16: Variation der  $\beta$ -tub-Primerkonz. Bei cytb-Sondenkonz. 50nM: 4plex-qPCR\_v2 mit pfDd2, PfHB3, Pf3D7 und Negativkontrollen als template.

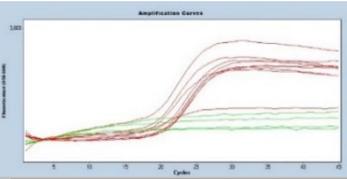
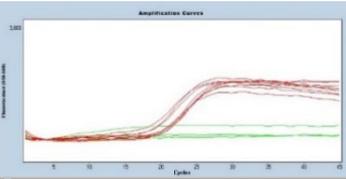
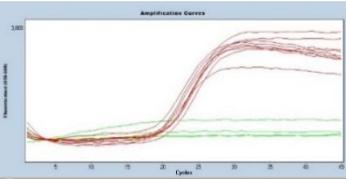
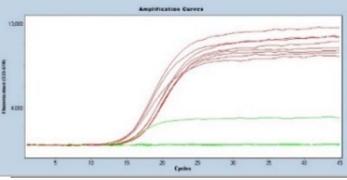
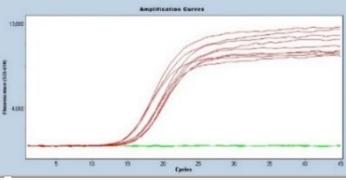
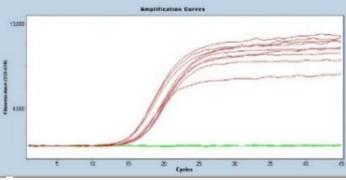
	400 nM	500 nM	600 nM
HEX/hrp2			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -        -	<b>PfDd2</b> 17,1    2,7	<b>PfDd2</b> -        -
	<b>PfHB3</b> 21,2    68,6	<b>PfHB3</b> 22,9    82,3	<b>PfHB3</b> 22,4    81,4
	<b>Pf3D7</b> 21,1    80,7	<b>Pf3D7</b> 21,1    85,4	<b>Pf3D7</b> 21,7    87,8
FAM/hrp3			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 21,2    21,0	<b>PfDd2</b> 21,0    19,7	<b>PfDd2</b> 20,9    20,3
	<b>PfHB3</b> 35,4    1,5	<b>PfHB3</b> 34,7    2,0	<b>PfHB3</b> -        -
	<b>Pf3D7</b> 22,7    28,6	<b>Pf3D7</b> 22,5    29,8	<b>Pf3D7</b> 22,7    28,4
Cy5/ $\beta$ -tub			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,7    2,0	<b>PfDd2</b> 20,7    1,8	<b>PfDd2</b> 20,7    2,1
	<b>PfHB3</b> 20,1    1,6	<b>PfHB3</b> 20,5    2,0	<b>PfHB3</b> 19,7    2,0
	<b>Pf3D7</b> 19,0    1,9	<b>Pf3D7</b> 19,0    2,2	<b>Pf3D7</b> 19,5    1,9
ROX/cytb			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 16,3    3,7	<b>PfDd2</b> 16,2    3,6	<b>PfDd2</b> 16,3    3,6
	<b>PfHB3</b> 15,8    4,1	<b>PfHB3</b> 16,3    5,5	<b>PfHB3</b> 16,1    5,1
	<b>Pf3D7</b> -        (4,7)	<b>Pf3D7</b> -        (5,0)	<b>Pf3D7</b> 15,0    5,1

### β-tubulin-Sondenkonzentration

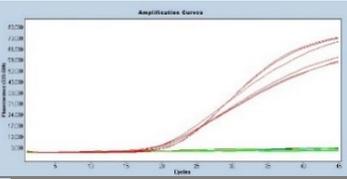
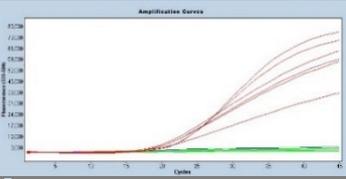
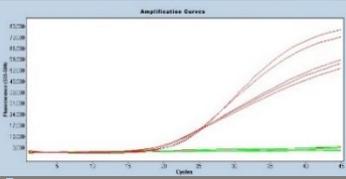
Abschließend wurde untersucht, ob das Amplifikationssignal von β-tubulin weiter verbessert werden kann – ohne mit den anderen Parametern zu interferieren – wenn die β-tubulin-Sondenkonzentration erhöht wird. Es wurden folgende Konzentrationen getestet: 100, 150, 200, 250 und 300 nM (vgl. Tab. 3-17, Tab. 3-18). Die höchste Konzentration ergab die beste Amplifikation. Für die nächsten Experimente wurde daher mit einer β-tubulin-Sondenkonzentration von 300 nM weitergearbeitet.

Tab. 3-17: Variation der β-tub-Sondenkonz. auf max 200 nM: 4plex-qPCR\_v2 mit pfDd2, PfHB3, Pf3D7 und Negativkontrollen als template.

	100 nM	150 nM	200 nM
HEX/hrp2			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> 17,0    3,6
	<b>PfHB3</b> 21,3    77,0	<b>PfHB3</b> 22,3    80,1	<b>PfHB3</b> 21,9    82,9
	<b>Pf3D7</b> 21,7    88,4	<b>Pf3D7</b> 21,6    90,7	<b>Pf3D7</b> 22,0    91,3
FAM/hrp3			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,9    20,8	<b>PfDd2</b> 21,1    20,4	<b>PfDd2</b> 21,0    20,8
	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> 37,3    1,7
	<b>Pf3D7</b> 22,7    30,5	<b>Pf3D7</b> 22,8    30,5	<b>Pf3D7</b> 22,9    28,7

	100 nM	150 nM	200 nM
Cy5/ $\beta$ -tub			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 20,6    2,7	<b>PfDd2</b> 20,3    2,1	<b>PfDd2</b> 20,9    3,8
	<b>PfHB3</b> 16,4    2,8	<b>PfHB3</b> 19,8    2,0	<b>PfHB3</b> 20,1    3,4
	<b>Pf3D7</b> 19,0    3,4	<b>Pf3D7</b> 18,7    2,1	<b>Pf3D7</b> 19,3    3,4
ROX/cy5b			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 16,7    10,6	<b>PfDd2</b> 16,7    10,9	<b>PfDd2</b> 16,7    10,6
	<b>PfHB3</b> 16,2    12,0	<b>PfHB3</b> 16,2    12,7	<b>PfHB3</b> 16,0    11,8
	<b>Pf3D7</b> 15,0    12,9	<b>Pf3D7</b> 14,5    12,9	<b>Pf3D7</b> 15,1    12,1

Tab. 3-18: Variation der  $\beta$ -tub-Sondenkonz. auf max. 300 nM: 4plex-qPCR\_v2 mit pfDd2, PfHB3, Pf3D7 und Negativkontrollen als template.

	200 nM	250 nM	300 nM
HEX/hrp2			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -
	<b>PfHB3</b> 21,7    75,0	<b>PfHB3</b> 21,3    77,9	<b>PfHB3</b> 22,6    79,4
	<b>Pf3D7</b> 20,0    72,2	<b>Pf3D7</b> 16,3    65,7	<b>Pf3D7</b> 19,2    60,4

	200 nM	250 nM	300 nM
FAM/hrp3			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 21,2    21,6	<b>PfDd2</b> 22,1    25,2	<b>PfDd2</b> 21,1    22,5
	<b>PfHB3</b> 35,1    1,5	<b>PfHB3</b> -        -	<b>PfHB3</b> -        -
	<b>Pf3D7</b> 22,3    25,6	<b>Pf3D7</b> 21,1    21,4	<b>Pf3D7</b> 21,5    24,5
Cy5/β-tub			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 21,0    3,6	<b>PfDd2</b> 18,9    3,7	<b>PfDd2</b> 18,9    5,1
	<b>PfHB3</b> 20,3    3,4	<b>PfHB3</b> 20,2    4,1	<b>PfHB3</b> 20,0    6,6
	<b>Pf3D7</b> 18,8    3,2	<b>Pf3D7</b> 21,2    4,6	<b>Pf3D7</b> 21,5    6,7
ROX/cytb			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 16,8    9,9	<b>PfDd2</b> 16,7    10,0	<b>PfDd2</b> 16,8    10,7
	<b>PfHB3</b> 16,1    10,3	<b>PfHB3</b> 15,9    11,3	<b>PfHB3</b> 16,5    11,7
	<b>Pf3D7</b> 14,7    9,9	<b>Pf3D7</b> 14,6    9,6	<b>Pf3D7</b> 14,6    9,3

### 3.1.2.2 Optimierung der Fluoreszenzkurve

Nachdem zunächst die Angleichung der erzielbaren maximalen Fluoreszenzintensitäten erreicht werden sollte (vgl. Kapitel 3.1.2), sollte nun die Amplifikationszunahme von *hrp2* und *hrp3* hinsichtlich einer sigmoidalen Fluoreszenzzunahme optimiert werden. Dies wurde notwendig, da bei den Messungen von klinischen Isolaten mit niedrigen Parasitämien die Fluoreszenzkurven von *hrp2* und *hrp3* mehrfach keine eindeutig sigmoidale Zunahme zeigte. Für diesen Optimierungs-

schritt wurden deshalb zusätzlich zu den Laborisolaten ausgewählte Proben klinischer Isolate hinzugenommen. Da aufgrund zu geringer Volumina nicht ein- und dieselben Feldproben für alle Optimierungsschritte verwendet werden konnten, war ein direkter Vergleich der Amplifikationskurven der Feldproben zwischen den einzelnen Experimenten nicht möglich. In den Darstellungen wurden daher lediglich die Positivkontrollen abgebildet.

### Elongationsdauer

Die Elongationsdauer wurde ausgehend von 2:30 min auf 2:00 min erniedrig sowie auf 3:00 min erhöht. Die Erhöhung der Elongationszeit auf 3:00 min erbrachte gegenüber 2:30 min zwar eine kleine, aber nicht nennenswerte Besserung der Fluoreszenzkurve (vgl. Tab. 3-19). Die Zeit von 2:30 min wurde daher für die weiteren Experimente beibehalten.

Tab. 3-19: Variation der Elongationszeit: 4plex-qPCR\_v2 mit pfDd2, PfHB3, Pf3D7 und Negativkontrollen als template.

	2:00 Minuten	2:30 Minuten	3:00 Minuten
HEX/hrp2			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -
	<b>PfHB3</b> 22,4   86,4	<b>PfHB3</b> 22,8   73,8	<b>PfHB3</b> 22,6   59,9
	<b>Pf3D7</b> 20,1   63,6	<b>Pf3D7</b> 20,9   74,9	<b>Pf3D7</b> 21,1   56,6
FAM/hrp3			
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 21,3   23,8	<b>PfDd2</b> 21,3   21,2	<b>PfDd2</b> 21,5   23,8
	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> -    -
	<b>Pf3D7</b> 22,3   24,1	<b>Pf3D7</b> 22,4   27,0	<b>Pf3D7</b> 22,7   27,0

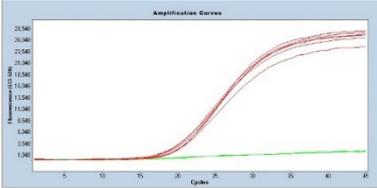
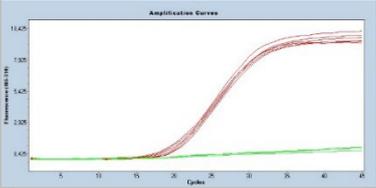
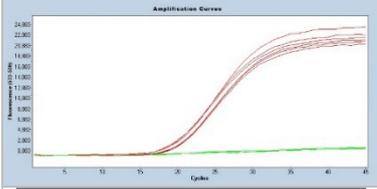
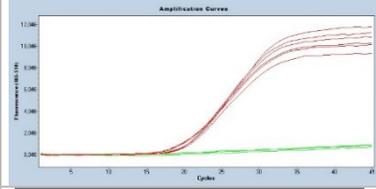
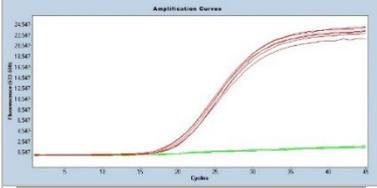
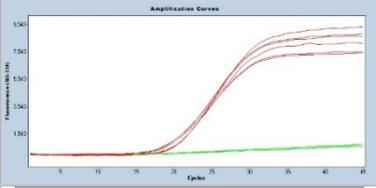
	2:00 Minuten		2:30 Minuten		3:00 Minuten	
Cy5/ $\beta$ -tub						
	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b>	21,9    8,3	<b>PfDd2</b>	21,8    5,4	<b>PfDd2</b>	22,0    7,3
	<b>PfHB3</b>	21,3    6,1	<b>PfHB3</b>	21,3    5,1	<b>PfHB3</b>	21,4    5,5
	<b>Pf3D7</b>	19,9    4,9	<b>Pf3D7</b>	19,8    5,9	<b>Pf3D7</b>	19,9    5,1
ROX/cytb						
	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b>	<b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b>	17,1    13,5	<b>PfDd2</b>	16,8    10,3	<b>PfDd2</b>	16,9    13,2
	<b>PfHB3</b>	16,54    14,4	<b>PfHB3</b>	16,4    12,5	<b>PfHB3</b>	16,5    12,8
	<b>Pf3D7</b>	15,1    11,9	<b>Pf3D7</b>	15,0    12,2	<b>Pf3D7</b>	15,0    12,3

### hrp2- und hrp3-Sondenkonzentrationen

Während der Durchführung der Arbeiten wurden insgesamt drei verschiedene Stocklösungen der *hrp2*- und *hrp3*-Sonden verwendet (drei verschiedene Synthesen). Es fiel auf, dass mit den Sonden der zweiten Lieferung erhöhte Fluoreszenzintensitäten erzielt wurden (vgl. RFU im FAM-Kanal der Tab. 3-10 im Vergleich zur Tab. 3-11). Gleichzeitig wurde festgestellt, dass die Erhöhung der *hrp3*-Sondenkonzentration zu einer Verschlechterung des sigmoidalen Verlaufs führte (vgl. Tab. 3-11). Deshalb wurde bei diesem zusätzlichen Optimierungsschritt eine Erniedrigung der *hrp2*- und *hrp3*-Sondenkonzentrationen, ausgehend von 50 nM auf 25 und 20 nM, getestet (vgl. Tab. 3-20). Dies führte zu einer Verringerung der absoluten maximalen Fluoreszenzintensität und gleichzeitig verbesserten sich die Amplifikationskurven hinsichtlich eines sigmoidalen Verlaufs. Für die weiteren Experimente wurden die Konzentrationen von 20 nM für die *hrp2*-Sonde und 25 nM für die *hrp3*-Sonde übernommen.

Tab. 3-20: Variation der hrp2- und hrp3-Sondenkonz.: 4plex-qPCR\_v2 mit pfDd2, PfHB3, Pf3D7 und Negativkontrollen als template.

Sondenkonz.	HEX	FAM
hrp2: 50 nM hrp3: 50 nM		
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> 20,7    18,6
	<b>PfHB3</b> 21,2    53,9	<b>PfHB3</b> -    -
<b>Pf3D7</b> 21,2    60,7	<b>Pf3D7</b> 22,9    26,4	
hrp2: 25 nM hrp3: 50 nM		
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> 20,74    18,5
	<b>PfHB3</b> 20,3    29,9	<b>PfHB3</b> -    -
<b>Pf3D7</b> 19,8    26,8	<b>Pf3D7</b> 22,8    25,6	
hrp2: 50 nM hrp3: 25 nM		
	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>	<b>C<sub>q</sub></b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> 20,1    8,2
	<b>PfHB3</b> 21,0    52,1	<b>PfHB3</b> -    -
<b>Pf3D7</b> 21,1    64,4	<b>Pf3D7</b> 20,4    10,3	

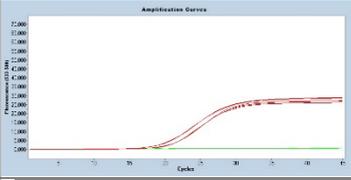
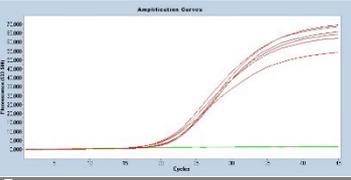
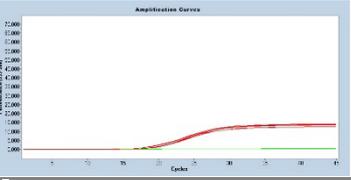
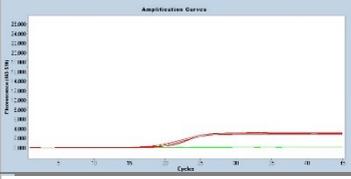
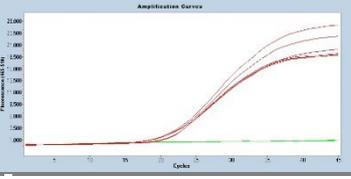
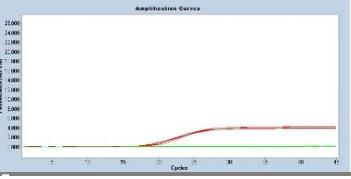
Sondenkonz.	HEX	FAM																								
<i>hrp2</i> : 25 nM <i>hrp3</i> : 25 nM	 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C<sub>q</sub></th> <th>RFU</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>PfDd2</b></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><b>PfHB3</b></td> <td>20,2</td> <td>28,5</td> </tr> <tr> <td><b>Pf3D7</b></td> <td>19,9</td> <td>28,3</td> </tr> </tbody> </table>		C <sub>q</sub>	RFU	<b>PfDd2</b>	-	-	<b>PfHB3</b>	20,2	28,5	<b>Pf3D7</b>	19,9	28,3	 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C<sub>q</sub></th> <th>RFU</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>PfDd2</b></td> <td>20,3</td> <td>9,6</td> </tr> <tr> <td><b>PfHB3</b></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><b>Pf3D7</b></td> <td>20,5</td> <td>10,4</td> </tr> </tbody> </table>		C <sub>q</sub>	RFU	<b>PfDd2</b>	20,3	9,6	<b>PfHB3</b>	-	-	<b>Pf3D7</b>	20,5	10,4
	C <sub>q</sub>	RFU																								
<b>PfDd2</b>	-	-																								
<b>PfHB3</b>	20,2	28,5																								
<b>Pf3D7</b>	19,9	28,3																								
	C <sub>q</sub>	RFU																								
<b>PfDd2</b>	20,3	9,6																								
<b>PfHB3</b>	-	-																								
<b>Pf3D7</b>	20,5	10,4																								
<i>hrp2</i> : 20 nM <i>hrp3</i> : 25 nM	 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C<sub>q</sub></th> <th>RFU</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>PfDd2</b></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><b>PfHB3</b></td> <td>20,1</td> <td>22,4</td> </tr> <tr> <td><b>Pf3D7</b></td> <td>19,8</td> <td>24,9</td> </tr> </tbody> </table>		C <sub>q</sub>	RFU	<b>PfDd2</b>	-	-	<b>PfHB3</b>	20,1	22,4	<b>Pf3D7</b>	19,8	24,9	 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C<sub>q</sub></th> <th>RFU</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>PfDd2</b></td> <td>20,3</td> <td>10,5</td> </tr> <tr> <td><b>PfHB3</b></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><b>Pf3D7</b></td> <td>21,1</td> <td>12,0</td> </tr> </tbody> </table>		C <sub>q</sub>	RFU	<b>PfDd2</b>	20,3	10,5	<b>PfHB3</b>	-	-	<b>Pf3D7</b>	21,1	12,0
	C <sub>q</sub>	RFU																								
<b>PfDd2</b>	-	-																								
<b>PfHB3</b>	20,1	22,4																								
<b>Pf3D7</b>	19,8	24,9																								
	C <sub>q</sub>	RFU																								
<b>PfDd2</b>	20,3	10,5																								
<b>PfHB3</b>	-	-																								
<b>Pf3D7</b>	21,1	12,0																								
<i>hrp2</i> : 20 nM <i>hrp3</i> : 20 nM	 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C<sub>q</sub></th> <th>RFU</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>PfDd2</b></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><b>PfHB3</b></td> <td>20,3</td> <td>23,8</td> </tr> <tr> <td><b>Pf3D7</b></td> <td>19,9</td> <td>24,5</td> </tr> </tbody> </table>		C <sub>q</sub>	RFU	<b>PfDd2</b>	-	-	<b>PfHB3</b>	20,3	23,8	<b>Pf3D7</b>	19,9	24,5	 <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>C<sub>q</sub></th> <th>RFU</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>PfDd2</b></td> <td>20,1</td> <td>8,3</td> </tr> <tr> <td><b>PfHB3</b></td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><b>Pf3D7</b></td> <td>20,4</td> <td>9,5</td> </tr> </tbody> </table>		C <sub>q</sub>	RFU	<b>PfDd2</b>	20,1	8,3	<b>PfHB3</b>	-	-	<b>Pf3D7</b>	20,4	9,5
	C <sub>q</sub>	RFU																								
<b>PfDd2</b>	-	-																								
<b>PfHB3</b>	20,3	23,8																								
<b>Pf3D7</b>	19,9	24,5																								
	C <sub>q</sub>	RFU																								
<b>PfDd2</b>	20,1	8,3																								
<b>PfHB3</b>	-	-																								
<b>Pf3D7</b>	20,4	9,5																								

### 3.1.2.3 Anpassung an Unterschiede zwischen den Sonden-Bestellungen

Nach dem Eintreffen der dritten Bestellung der Sonden für *hrp2* und *hrp3* fielen die Fluoreszenzintensitäten wieder auf Werte, die vergleichbar sind mit denen, die sich unter Verwendung der ersten Bestellung der Sonden ergaben. In der Tab. 3-21 sind die Fluoreszenzkurven, RFU- und C<sub>q</sub>-Werte für die Bestellungen 1-3 dargestellt. Unter der Bestellung 2 erfolgte zunächst die Erniedrigung der *hrp2*-Sondenkonzentration von 50 nM auf 20 nM, bzw. der *hrp3*-Sondenkonzentration von 50 nM auf 25 nM. Es resultierte das Protokoll B. Nachdem die dritte

Bestellung die hohen Fluoreszenzintensitäten nicht halten konnte, wurde wieder auf die Sondenkonzentrationen des Protokoll A von 50 nM zurückgegriffen.

Tab. 3-21: Vergleich der Fluoreszenzkurve/-Intensitäten zw. Bestellung 1-3 der Sonden bei 50 nM: 4plex-qPCR\_v2 mit PfDd2, PfHB3, Pf3D7 ① und Negativkontrollen als template.

	Bestellung 1	Bestellung 2	Bestellung 3
HEX/hrp2			
	<b>Cq</b> <b>RFU</b>	<b>Cq</b> <b>RFU</b>	<b>Cq</b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -	<b>PfDd2</b> -    -
	<b>PfHB3</b> 21,0   27,9	<b>PfHB3</b> 22,6   70,9	<b>PfHB3</b> 19,9   14,1
	<b>Pf3D7</b> 20,2   29,5	<b>Pf3D7</b> 21,4   70,0	<b>Pf3D7</b> 18,8   14,5
FAM/hrp3			
	<b>Cq</b> <b>RFU</b>	<b>Cq</b> <b>RFU</b>	<b>Cq</b> <b>RFU</b>
	<b>PfDd2</b> 19,7   3,0	<b>PfDd2</b> 21,5   19,5	<b>PfDd2</b> 19,66   4,0
	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> -    -	<b>PfHB3</b> -    -
	<b>Pf3D7</b> 18,6   3,3	<b>Pf3D7</b> 22,5   25,6	<b>Pf3D7</b> 18,55   4,4

### 3.1.3 Parameter der 4plex-qPCR\_v2

Nach den Optimierungsschritten ergaben sich die in Tab. 3-22 ersichtlichen Einstellungen für die Durchführung der qPCR.

Tab. 3-22: PCR-Bedingungen der 4plex-qPCR\_v2.

PCR-Bedingungen		Temperatur	Dauer	Tempo
Aktivierung		95 °C	20 Sek.	4,8 °C/s
Zyklen (45x)	Denaturation	95 °C	3 Sek.	4,8 °C/s
	Primer-Hybridisierung	62 °C	150 Sek.	2,5 °C/s
Kühlung		40 °C	30 Sek.	4,8 °C/s

Bezüglich der Konzentrationen ergaben sich im Verlauf dieser Arbeit ein Protokoll A und ein Protokoll B (vgl. Tab. 3-23, Tab. 3-24).

Tab. 3-23: Reaktionsansatz der 4plex-qPCR\_v2 Protokoll A.

		c final [nM]	V [µl] pro Probe	
Mastermischung:	TaqMan® Multiplex Master Mix	1 x	5	
	<i>hrp2</i>	Fwd Primer	400	0,2
		Rev Primer	400	0,2
		Sonde	50	0,1
	<i>hrp3</i>	Fwd Primer	400	0,2
		Rev Primer	400	0,2
		Sonde	50	0,1
	<i>β-tub</i>	Fwd Primer	600	0,2
		Rev Primer	600	0,2
		Sonde	300	0,1
	<i>cytb</i>	Fwd Primer	400	0,2
		Rev Primer	400	0,2
		Sonde	150	0,1
DNA-Probe			3	
SUMME			10	

Tab. 3-24: Reaktionsansatz der 4plex-qPCR\_v2 Protokoll B.

		c final [nM]	V [µl] pro Probe	
Mastermischung:	TaqMan® Multiplex Master Mix	1 x	5	
	<i>hrp2</i>	<i>Fwd</i> Primer	400	0,2
		<i>Rev</i> Primer	400	0,2
		Sonde	20	0,1
	<i>hrp3</i>	<i>Fwd</i> Primer	400	0,2
		<i>Rev</i> Primer	400	0,2
		Sonde	25	0,1
	<i>β-tub</i>	<i>Fwd</i> Primer	600	0,2
		<i>Rev</i> Primer	600	0,2
		Sonde	300	0,1
	<i>cytb</i>	<i>Fwd</i> Primer	400	0,2
		<i>Rev</i> Primer	400	0,2
Sonde		150	0,1	
DNA-Probe			3	
SUMME			10	

Das Protokoll A entstand nach dem ersten Optimierungsschritt (vgl. Abb. 2-2). Unter der Bestellung 2 der Primer und Sonden wurden die Konzentrationen der *hrp2*- und *hrp3*-Sonden nochmal variiert. Diese Variante ergab dann das Protokoll B. Nachdem die dritte Bestellung/Synthese der Sonden genutzt wurde, wurde jedoch wieder auf das Protokoll A zurückgegriffen.

Insgesamt erfolgten die Messungen der Feldproben, die Messungen des alten Standards sowie die Messungen des neuen Standards mit dem Protokoll A – lediglich der neue Standard wurde zusätzlich auch mit dem Protokoll B gemessen.

### 3.2 Analyse klinischer Isolate

Die 4plex-qPCR\_v2 wurde zur retrospektiven Analyse von einer Auswahl an Proben, die innerhalb von zwei Studien in Gabun gewonnen wurden und für diese

Arbeit zur Verfügung standen, angewandt (vgl. 2.2.2.2). Bei den Proben handelte es sich um Blutproben von sowohl Personen, die mit *P. falciparum* infiziert waren als auch von nicht-infizierten Personen. Die Proben wurden als Vollblutproben oder auf Filterpapier (*FTA Elute Card*, *Protein Saver Card*) gesammelt und die DNA entsprechend extrahiert.

In Abb. 3-1 sind die Ergebnisse der *4plex-qPCR\_v2*-Analyse zu sehen. Unter den 122 Proben sind 20 Proben dabei, die nur 10 Patient\*innen zuzuordnen sind, da Proben dieser Patient\*innen sowohl als *FTA Elute Card* als auch als Vollblutproben zur Verfügung standen und gemessen wurden.

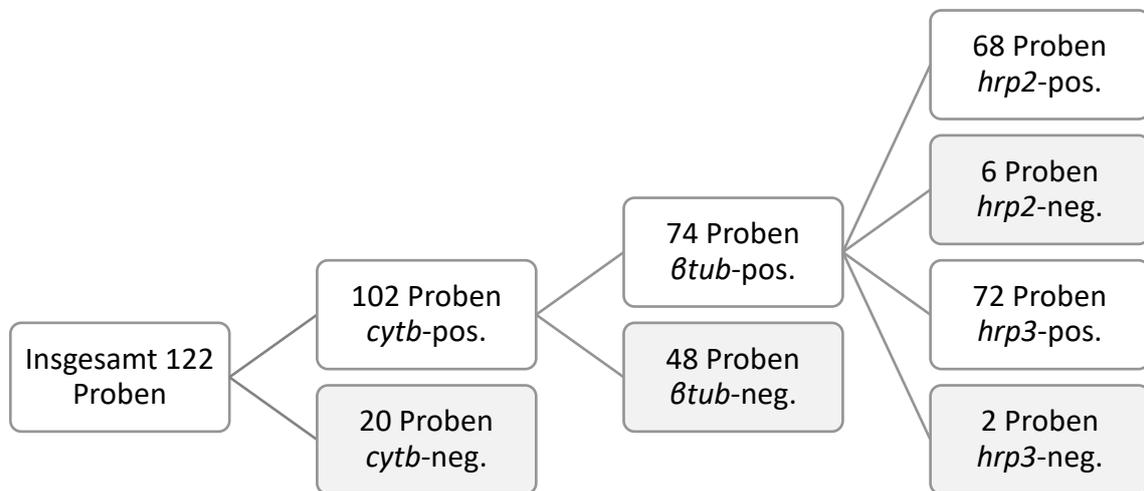


Abb. 3-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Feldproben.

In Abb. 3-2 sind im Gegensatz dazu nur die Proben aufgeführt, welche der Grendot-Studie (Untergruppe der NoHRP2-Studie) angehören. Diese Proben wurden mit der *4plex-qPCR\_v2* das erste Mal gemessen und unterlagen somit keiner Vorauswahl. Unter den gemessenen Proben gab es keine Malariainfektion mit einer *hrp2/hrp3*-Deletion.

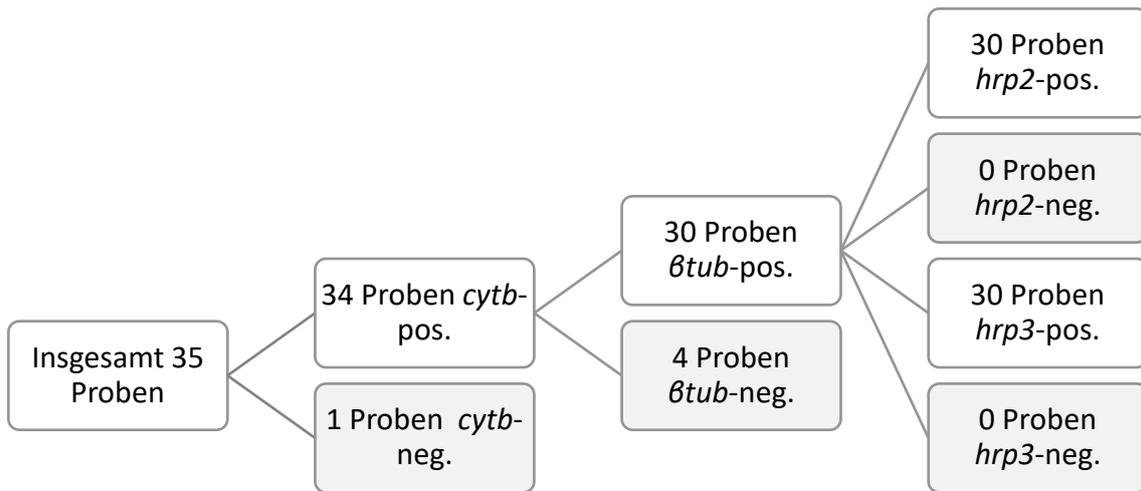


Abb. 3-2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Greendot-Studien-Proben.

Von den 122 Proben wurden insgesamt 85 Proben auch mit der *4plex-qPCR\_v1* analysiert. Der Vergleich der Ergebnisse ist in Tab. 3-25 zu sehen. Bei der Messung mit dem Protokoll der ersten Generation wurden für die Gene *β-tubulin*, *hrp2* und *hrp3* häufiger positive Ergebnisse gemessen. Inwieweit das erste Protokoll sensitiver war oder aber einige der positiven Ergebnisse durch Kreuzreaktivität zustande kamen, kann nicht abschließend geklärt werden. Unter den Proben, die unterschiedliche Ergebnisse in den Messungen der ersten Generation im Vergleich zur zweiten Generation ergaben, waren lediglich 3 Proben Vollblutproben.

Tab. 3-25: Vergleich der Ergebnisse der Feldproben der *4plex-qPCR\_v1* und *\_v2*.

<i>4plex-qPCR_v1</i>	<i>4plex-qPCR_v2</i>
<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">60 Proben <i>cytb</i>-pos.</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">47 Proben <i>βtub</i>-pos.</div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">43 Proben <i>hrp2</i>-pos.</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">46 Proben <i>hrp3</i>-pos.</div> </div> </div>	<div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">66 Proben <i>cytb</i>-pos.</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">41 Proben <i>βtub</i>-pos.</div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">36 Proben <i>hrp2</i>-pos.</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">42 Proben <i>hrp3</i>-pos.</div> </div> </div>

Die Methode der Probengewinnung und der DNA-Extraktion beeinflusst das Ergebnis der *4plex-qPCR*. Das Blutvolumen eines *blood spot* einer *FTA Elute Card* beträgt lediglich 40 µl; für die Extraktion aus Vollblut wurden bis zu 200 µl Probenvolumen genutzt, sofern noch so viel vorhanden war.

In der Abb. 3-3 sind jeweils alle Patientenproben dargestellt, die als *FTA Elute Card* und Vollblutprobe vorhanden waren. Es wurden lediglich die Proben abgebildet, bei denen eines der beiden Ergebnisse positiv war. Negative Ergebnisse sind in den Diagrammen zur besseren Übersicht nicht mit einer Null, sondern mit dem C<sub>q</sub>-Wert von 40 dargestellt.

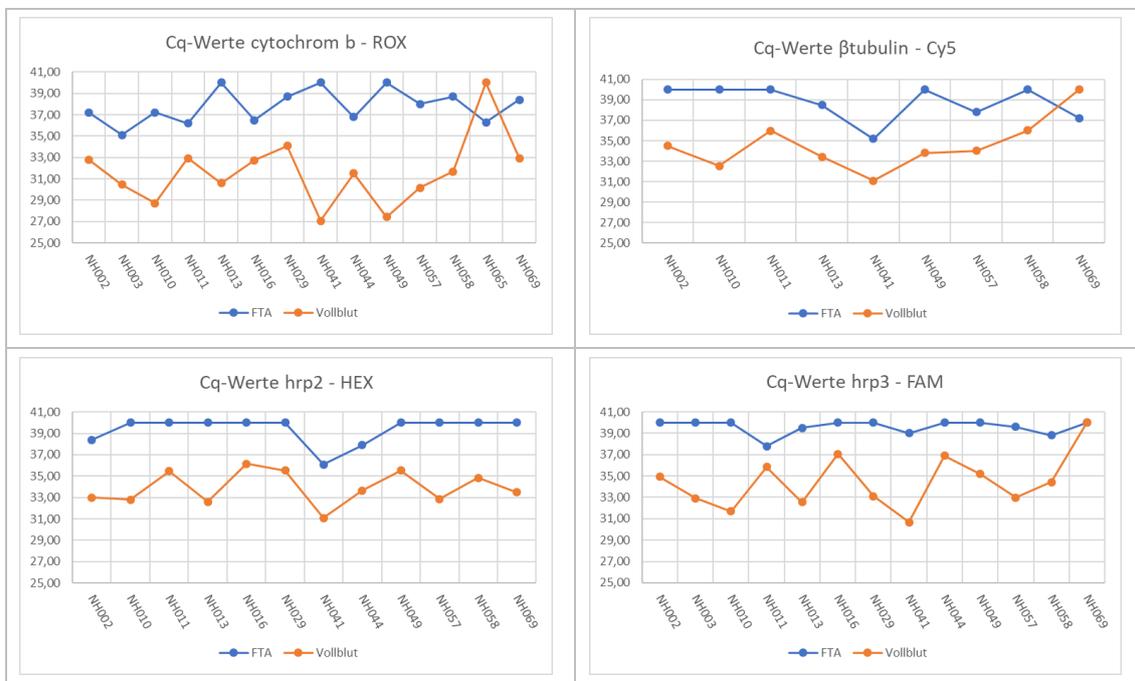


Abb. 3-3: Vergleich der Ergebnisse der Feldproben aus *FTA Elute Cards* und Vollblutproben. (*FTA Elute cards* = blau, *Vollblutproben* = orange)

Für die *FTA Elute Card*-Proben sind alle C<sub>q</sub>-Werte höher, d.h. die Amplifikation war geringer als für die Vollblutproben desselben Probanden. Ob allein die geringere DNA-Menge durch die geringere Probenmenge ausschlaggebend war oder ob zusätzlich auch *qPCR*-inhibierende Cofaktoren aus den *FTA Elute Cards* in der eluierten DNA enthalten sind, lässt sich aus diesen Daten nicht sagen. Klar ist aber, dass sich die *FTA Elute Cards* nicht eignen für eine Probensammlung

einer epidemiologischen Studie zur Prävalenzbestimmung von *P. falciparum* mit *hrp2*-Deletionen.

### 3.3 Vergleich der Sensitivität der 4plex-qPCR mit k. PCR

*Hrp2/hrp3*-Deletionen werden dadurch detektiert, dass keine Genamplifikation experimentell nachgewiesen werden kann. Dieser Ansatz ist grundsätzlich nicht ganz unproblematisch, da verschiedene Faktoren zu einem negativen Ergebnis führen können, wie zum Beispiel eine zu geringe *Template*-DNA-Menge. Ein solches falsch-negatives Ergebnis würde die fälschliche Detektion und Berichterstattung von deletierten *P. falciparum*-Stämmen zur Folge haben. Mit diesem Teil der Arbeit sollte verglichen werden, ob die *4plex-qPCR\_v2* sensitiver ist als die konventionelle *PCR* (k. *PCR*) für die Detektion von *hrp2* und *hrp3* und somit weniger falsch-negative Ergebnisse erzielt, also seltener fälschlicherweise *hrp2/hrp3*-Deletionen anzeigt.

Hierzu wurden aus Ringstadien sorgfältig ein Standard hergestellt mit definierten Parasitämien zwischen 600 und 0,001 Parasiten/ $\mu$ l.

Das Detektionslimit und die Effizienz der *4plex-qPCR\_v2* wurde mit zwei Pf3D7-Standards bestimmt. Die Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Verdünnungsreihe wurde zur Verfügung gestellt und der Pf3D7<sup>2</sup>-Standard wurde selbst hergestellt. Zusätzlich wurden das Detektionslimit und die Effizienz auch unter Verwendung der zwei Stämme mit *hrp2*- bzw. *hrp3*-Deletionen – PfDd2 und PfHB3 – bestimmt.

Die Tab. 3-26, Tab. 3-27, Tab. 3-28 und Tab. 3-29 zeigen das Detektionslimit und die Effizienz der *4plex-qPCR\_v2*, *Protokoll A* für die Detektion der einzelnen Gene.

Tab. 3-26: 4plex-qPCR\_v2 Prot. A Messung der Verdünnungsreihe des Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Standards für hrp2, hrp3,  $\beta$ -tub und cytb.

	Standardkurve des Pf3D7-Stamms	Effizienz	Detektionslimit (P/ml)
hrp2	<p> <math>y = -2,4481x + 42,948</math>  <math>R^2 = 0,9941</math> </p>	1,56	204
hrp3	<p> <math>y = -2,7669x + 45,693</math>  <math>R^2 = 0,9975</math> </p>	1,30	6000
$\beta$ -tub	<p> <math>y = -3,0413x + 44,162</math>  <math>R^2 = 0,9975</math> </p>	1,13	2040
cytb	<p> <math>y = -3,1463x + 41,204</math>  <math>R^2 = 0,9993</math> </p>	1,08	60

Tab. 3-27: 4plex-qPCR\_v2 Prot. A Messung der Verdünnungsreihe des Pf3D7<sup>2</sup>-Standards für hrp2, hrp3,  $\beta$ -tub und cytb.

	Standardkurve des neuen Pf3D7-Stamms	Effizienz	Detektionslimit (P/ml)
<i>hrp2</i>	<p><math>y = -2,5677x + 41,29</math> <math>R^2 = 0,9679</math></p>	1,45	204
<i>hrp3</i>	<p><math>y = -3,1575x + 43,907</math> <math>R^2 = 0,9865</math></p>	1,07	204
$\beta$ - <i>tub</i>	<p><math>y = -2,8966x + 43,677</math> <math>R^2 = 0,9919</math></p>	1,21	600
<i>cytb</i>	<p><math>y = -2,8091x + 39,744</math> <math>R^2 = 0,9836</math></p>	1,27	20,4

Tab. 3-28: 4plex-qPCR\_v2 Prot. A Messung der Verdünnungsreihe des PfHB3-Standards für hrp2, hrp3,  $\beta$ -tub und cytb.

	Standardkurve des PfHB3-Stamms	Effizienz	Detektionslimit (P/ml)
<i>hrp2</i>	<p> <math>y = -2,31x + 39,787</math>  <math>R^2 = 0,8811</math> </p>	1,71	60
$\beta$ -tub	<p> <math>y = -3,0863x + 44,629</math>  <math>R^2 = 0,9977</math> </p>	1,11	2040
<i>cytb</i>	<p> <math>y = -2,9474x + 40,149</math>  <math>R^2 = 0,9796</math> </p>	1,18	20,4

Tab. 3-29: 4plex-qPCR\_v2 Prot. A Messung der Verdünnungsreihe des PfDd2-Standards für hrp2, hrp3,  $\beta$ -tub und cytb.

	Standardkurve des PfDd2-Stamms	Effizienz	Detektionslimit (P/ml)
hrp3	<p><math>y = -3,2462x + 43,611</math> <math>R^2 = 0,9967</math></p>	1,03	600
$\beta$ -tub	<p><math>y = -2,739x + 43,247</math> <math>R^2 = 0,9936</math></p>	1,32	600
cytb	<p><math>y = -2,8472x + 39,832</math> <math>R^2 = 0,984</math></p>	1,25	20,4

Die neuen Verdünnungsreihen wurden neben dem Protokoll A der 4plex-qPCR\_v2 auch mit dem Protokoll B gemessen. Die Ergebnisse sind den Tab. 3-30, Tab. 3-31 und Tab. 3-32 zu entnehmen.

Tab. 3-30: 4plex-qPCR\_v2 Prot. B Messung der Verdünnungsreihe des Pf3D7<sup>2</sup>-Standards für hrp2, hrp3,  $\beta$ -tub und cytb.

	Standardkurve des Pf3D7 <sup>2</sup> -Stamms	Effizienz	Detektionslimit (P/ml)
<i>hrp2</i>	<p>Standard curve for <i>hrp2</i>. The y-axis represents Cq-Werte (0 to 45) and the x-axis represents log(Parasiten/ml) (1 to 6). The regression equation is <math>y = -2,6735x + 42,415</math> with <math>R^2 = 0,9877</math>.</p>	1,37	204
<i>hrp3</i>	<p>Standard curve for <i>hrp3</i>. The y-axis represents Cq-Werte (0 to 45) and the x-axis represents log(Parasiten/ml) (1 to 6). The regression equation is <math>y = -3,2177x + 46,084</math> with <math>R^2 = 0,9949</math>.</p>	1,05	2040
$\beta$ -tub	<p>Standard curve for <math>\beta</math>-tub. The y-axis represents Cq-Werte (0 to 45) and the x-axis represents log(Parasiten/ml) (1 to 6). The regression equation is <math>y = -3,0189x + 44,032</math> with <math>R^2 = 0,9856</math>.</p>	1,14	2040
<i>cytb</i>	<p>Standard curve for <i>cytb</i>. The y-axis represents Cq-Werte (0 to 40) and the x-axis represents log(Parasiten/ml) (1 to 6). The regression equation is <math>y = -3,0496x + 40,935</math> with <math>R^2 = 0,9937</math>.</p>	1,13	20,4

Tab. 3-31: 4plex-qPCR\_v2 Prot. B Messung der Verdünnungsreihe des PfHB3-Standards für hrp2, hrp3,  $\beta$ -tub und cytb.

	Standardkurve des PfHB3-Stamms	Effizienz	Detektionslimit (P/ml)
<i>hrp2</i>	<p> <math>y = -2,8283x + 42,797</math>  <math>R^2 = 0,9932</math> </p>	1,26	204
$\beta$ -tub	<p> <math>y = -3,1482x + 44,664</math>  <math>R^2 = 0,994</math> </p>	1,08	2040
<i>cytb</i>	<p> <math>y = -3,2036x + 41,398</math>  <math>R^2 = 0,9981</math> </p>	1,05	60

Tab. 3-32: 4plex-qPCR\_v2 Prot. B Messung der Verdünnungsreihe des PfDd2-Standards für hrp2, hrp3,  $\beta$ -tub und cytb.

	Standardkurve des PfDd2-Stamms	Effizienz	Detektionslimit (P/ml)
<i>hrp3</i>	<p>Standard curve for <i>hrp3</i>. The y-axis represents Cq-Werte (0 to 45) and the x-axis represents log(Parasiten/ml) (1 to 6). The regression equation is <math>y = -3,1697x + 43,981</math> with <math>R^2 = 0,9907</math>.</p>	1,07	204
$\beta$ - <i>tub</i>	<p>Standard curve for <math>\beta</math>-<i>tub</i>. The y-axis represents Cq-Werte (0 to 45) and the x-axis represents log(Parasiten/ml) (1 to 6). The regression equation is <math>y = -3,029x + 44,504</math> with <math>R^2 = 0,9949</math>.</p>	1,14	2040
<i>cytb</i>	<p>Standard curve for <i>cytb</i>. The y-axis represents Cq-Werte (0 to 40) and the x-axis represents log(Parasiten/ml) (1 to 6). The regression equation is <math>y = -3,2372x + 41,724</math> with <math>R^2 = 0,9985</math>.</p>	1,04	60

In Tab. 3-33 sind die Detektionslimits aufgetragen und nach Amplifikations- und Analysemethode dargestellt. Sofern bei keiner Verdünnung die Amplifikation dargestellt werden konnte, ist dies mit einem Bindestrich gekennzeichnet. Das kann entweder darauf zurückgeführt werden, dass das Gen gar nicht vorhanden war (*hrp3* in PfHB3 und *hrp2* in PfDd2) oder dass die Amplifikationsleistung nicht ausreichte bzw. die anschließende Analyse zu wenig sensitiv war. Der Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Standard wurde nur mit dem Protokoll A der 4plex-qPCR\_v2 gemessen, daher

sind die entsprechenden Felder in der Tabelle bei Protokoll B mit einem X gekennzeichnet.

Tab. 3-33: Detektionslimits der Standards nach Analyse- und Amplifikationsmethode.

Methode	Gen	Detektionslimit (Parasiten/ml)				
		Pf3D7 <sup>Rodi</sup>	Pf3D7 <sup>2</sup>	PfHB3 <sup>Ⓢ</sup>	PfDd2	
k. PCR	QIAxcel	<i>hrp2</i>	600.000	600.000	204.000	-
		<i>hrp3</i>	-	-	-	600.000
	Agarosegel	<i>hrp2</i>	6.000	60.000	-	-
		<i>hrp3</i>	60.000	600.000	-	-
qPCR_v2 Protokoll A		<i>hrp2</i>	204	204	60	-
		<i>hrp3</i>	6.000	204	-	600
		<i>β-tub</i>	2040	600	2040	600
		<i>cytb</i>	60	20,4	20,4	20,4
qPCR_v2 Protokoll B		<i>hrp2</i>	X	204	204	-
		<i>hrp3</i>	X	2.040	-	204
		<i>β-tub</i>	X	2040	2040	2040
		<i>cytb</i>	X	20,4	60	60

Das Limit zur Detektion von *P. falciparum*-Infektionen mit *cytochrom b* ist hochsensitiv und liegt je nach verwendetem Standard zwischen 20 und 60 P/ml Blut. Die Detektionslimits der einzelnen Gene der qPCR sind außerdem über die einzelnen Standardverdünnungen relativ konstant. Lediglich die Detektionsgrenze von *hrp3* ist bei den neuen Standards etwas niedriger als bei dem Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Standard. Im Vergleich zur konventionellen PCR zeigten die Ergebnisse der qPCR jeweils die sensitiveren Ergebnisse. Außerdem konnte das identische Produkt der konventionellen PCR bei der Betrachtung des Agarosegels bis zu einer höheren Verdünnung visualisiert werden als durch die Analyse des QIAxcel.

## 4 Diskussion

Menschen in ärmeren und abgelegeneren Gebieten Afrikas mit einer schlechten Anbindung an Gesundheitszentren die Möglichkeit einer schnellen Diagnose bei unklaren Fieberverläufen ermöglichen zu können, ist ein entscheidender Faktor, Malaria therapieren und als Gesundheitsproblem eliminieren zu können. Die breite Verfügbarkeit und Nutzung der Malariaschnelltests im letzten Jahrzehnt haben dazu einen wichtigen Beitrag geleistet. So hat sich die Anzahl an Patient\*innen, die auf Malaria untersucht wurden, in den Jahren von 2010 bis 2017 von 55 Millionen auf 223 Millionen mehr als vervierfacht. Die WHO schätzt den Anteil der Malariadiagnosen durch Schnelltests dabei auf 75 % (World Health Organization, 2018b).

Die meisten Schnelltests erkennen das HRP2-Protein, das von *P. falciparum* exprimiert wird und im Blut von infizierten Personen nachweisbar ist. Die zunehmenden Berichte über Gendeletionen des *hrp2*-Gens im *P. falciparum*-Genom haben zu großen Diskussionen geführt.

Die WHO äußerte sich dahingehend mit der Empfehlung einer weiteren Verwendung *hrp2*-basierter Schnelltests, solange die Prävalenz der Plasmodien mit *hrp2*-Deletionen bei einem 90 %-igem Konfidenzintervall nicht größer als fünf Prozent ist. Die Grenze basiert auf der Annahme, dass durch die Nutzung nicht *hrp2*-basierter Schnelltests der Anteil falscher Testergebnisse aufgrund deren schlechteren Beständigkeit gegenüber Hitze und Feuchtigkeit bis zu einer Prävalenz der Deletionen von fünf Prozent ein höheres Risiko darstellt als der Anteil falscher Testergebnisse aufgrund der Gendeletion (World Health Organization, 2016).

Entsprechend können treffende Empfehlungen zur Diagnostik in endemischen Regionen nur getroffen werden, wenn die vorherrschenden Prävalenzen der Gendeletionen bekannt sind.

Die aktuellen Studien nutzten dabei den Nachweis der Gene dieser Proteine mittels konventioneller *PCR* (Amoah et al., 2016; Berhane et al., 2018; Beshir et al., 2017; Kozycki et al., 2017; Kumar et al., 2013; Parr et al., 2017; Pati et al., 2018).

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde bereits eine *4plex-qPCR* zur Detektion der Gene *hrp2* und *hrp3* sowie zusätzlich *cytochrom b* und  $\beta$ -*tubulin* entwickelt und evaluiert (*4plex-qPCR\_v1*). Die Entwicklung spezifischer Primer und Sonden stellte dabei durch die starke Ähnlichkeit der Sequenzen des *hrp2*- und des *hrp3*-Gens eine große Herausforderung dar. Das Gen *cytochrom b* ermöglicht einen sehr sensiblen Nachweis, ob eine Probe *P. falciparum* enthält, da das Gen im Genom des *P. falciparum* in vielen Kopien vorliegt.  $\beta$ -*tubulin* dient als Qualitätskontrolle, ob eine Amplifikation eines *single copy genes* möglich ist.

Bei der Verwendung der *hrp2/hrp3*-Primer und -Sonden der *4plex-qPCR* der ersten Generation (*4plex-qPCR\_v1*) konnten Kreuzamplifikation zwischen *hrp2* und *hrp3* nicht vollständig ausgeschlossen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue *hrp2/hrp3*-Primer und -Sonden designt, getestet und eine *4plex-qPCR* der zweiten Generation (*4plex-qPCR\_v2*) etabliert.

#### 4.1 Optimierungsschritte

Die Spezifität der Primer und Sonden der neuen und alten Generation wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst in *singleplex*-Reaktionsansätzen verglichen. Der Einbau mehrerer Mismatches zwischen den *hrp2*- und *hrp3*-Primern der neuen Generation gegenüber denen der alten Generation spiegelte sich dabei in einer erhöhten Spezifität wieder und hat sich damit rentiert. Für die Sonden konnte dadurch allerdings keine Besserung erzielt werden und es wurden die alten Sonden behalten.

Bei der anschließenden Optimierung der *4plex-qPCR\_v2* zeigte sich bei Erhöhung der Primer-Hybridisierungstemperatur ein klarer Zusammenhang mit einer Abnahme der Kreuzreaktivität. Den hohen Temperaturen konnte somit nur eine sehr starke, gut passende/komplementäre Bindung standhalten. Die Bindung nicht hundertprozentig passender Sequenzen an dem entsprechend fälschlichem Gen wurden somit zu einem höheren Maß durch die hohen Temperaturen verhindert.

In wie weit sich die einzelnen Sonden und Primer gegenseitig beeinflussen, zeigte in den *4plex*-Reaktionen kein eindeutiges Muster. Während die Erhöhung

der *cytochrom b*-Sonden- und Primerkonzentration mit einer stetigen Verschlechterung der Kurven im Cy5-Kanal für *β-tubulin* einhergingen, blieb die Erhöhung der *β-tubulin*-Primer- und Sondenkonzentration ohne negativen Einfluss auf die *cytochrom b*-, *hrp2*- oder *hrp3*-Kurven. Ebenfalls ergab auch die Verringerung der *hrp2*-Primerkonzentration keine verbesserten Werte für die Kanäle ROX und Cy5 (*cytochrom b* und *β-tubulin*).

Ein starker Einfluss konnte hingegen unter Verwendung neuer Bestellungen/Synthesen bei den Sonden festgestellt werden. Am eindeutigsten ist dieser Effekt bei dem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des FAM- und HEX-Kanals jeweils bei Verwendung der *hrp3*- und *hrp2*-Sondenkonzentration von 50 nM zu sehen. Im Falle von *hrp3* stieg dabei die Fluoreszenzintensität ohne Veränderung der Konzentration, aber unter Wechsel von Bestellung 1 auf Bestellung 2 von unter vier auf über 25 an. Die daraufhin angestrebte Erniedrigung der Sondenkonzentration auf die Hälfte wurde nach Wechsel auf die Bestellung 3 wieder rückgängig gemacht, da nun selbst bei der Verwendung von den ursprünglichen 50 nM RFU-Werte von lediglich ca. 4 erreicht wurden.

Worin der Grund für die großen Schwankungen lag, konnte leider nicht geklärt werden. Nicht alle Grundlösungen wurden von der gleichen Person angesetzt. Die veranlasste Besprechung ergab jedoch keinen Unterschied in der Durchführung.

Für weitere Sonden, die in Zukunft bestellt werden, sollten, um den Einfluss besser beurteilen zu können, stets das Datum des Anbruchs der Grundverdünnung, das Datum der Erstellung der Arbeitsverdünnungen, die Anzahl der Auftauprozesse pro Grundverdünnung und Arbeitsverdünnung sowie der Name des Verantwortlichen protokolliert werden.

## 4.2 Klinische Isolate

Bei der Messung der Feldproben zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Studien und der Probenaufbewahrung. Die Feldproben, bei denen die DNA aus getrockneten Blutpunkten der *FTA Elute Cards* oder *Protein Saver Cards* gewonnen wurden, zeigten wesentlich höhere C<sub>q</sub>-Werte und/oder oft nur

im ROX-Kanal überhaupt eine Amplifikation im Vergleich zu aus Vollblut gewonnener DNA. Die durchschnittlich rund 160 µl mehr Probenvolumen, die bei der Extraktion aus Vollblut im Vergleich zur Extraktion aus den *blood spots* genutzt wurden, spiegeln sich dabei in den Ergebnissen wider. Da die größte Gefahr eine ausbleibende Amplifikation des *hrp2/hrp3*-Gens irrtümlich als eine Deletion zu deuten, eine zu niedrige Konzentration der Parasiten-DNA in der Probe ist, sollten weitere Proben für epidemiologische Studien, wenn möglich, als Vollblutproben gesammelt werden.

Der tatsächliche Anteil *hrp2/hrp3*-deletierter *P. falciparum*-Infektionen ist den in dieser Arbeit gemessenen Feldproben nicht zu entnehmen, da es sich hierbei nicht um die zufällige Auswahl von Proben handelte, sondern abgesehen der Proben der Greendot-Studie (Untergruppe der NoHRP2-Studie) um Proben, die in vorherigen Messungen unklare Ergebnisse erbrachten und somit nochmal gemessen werden sollten, um eine Positivität sicher zu bestätigen bzw. ausschließen zu können.

### 4.3 Standardkurve

Verdünnungsreihen wurden genutzt, um die Sensitivität der neuen *4plex-qPCR\_v2* zu analysieren. Dabei wurde auf einen schon bestehenden Pf3D7-Standard zurückgegriffen (vgl. 2.2.4 Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Verdünnungsreihe) sowie drei weitere Standardverdünnungen selbst hergestellt. Das Kultivieren und Synchronisieren der Parasitenkulturen sowie der Zeitpunkt der DNA-Extraktion zur Erstellung dieser neuen Standards wurde mit der Hilfe einer erfahrenden MTA durchgeführt und die DNA automatisiert mit dem QIASymphony extrahiert. Das Problem von Effizienzen über 100 %, welches sich in den Messungen des bestehenden Pf3D7<sup>Rodi</sup>-Standard mit dem *4plex-qPCR\_v1*-Protokoll im Rahmen der Masterarbeit von Miriam Rodi ergab, sollte dadurch verhindert werden. Die Effizienz von 100 % beschreibt die exakte Verdopplung der vorliegenden DNA während jedes Zyklus und entspricht eigentlich der maximal möglichen Vervielfältigung. Eine Effizienz höher als 100 % ist somit nicht mehr rein mit dem Modell der Vervielfältigung der DNA zu erklären. Als Gründe für die zu hohen Effizienzen wurden im Rahmen von Miriam Rodis Masterarbeit das Vorliegen von Inhibitoren

in den Proben durch Kontaminationen bei der DNA-Isolation durch Ethanol oder Proteinkinase K bzw. durch das Vorhandensein anderer Proteine wie Hämoglobin oder Polysaccharide diskutiert. Leider ergaben sich auch dieses Mal trotz der großen Vorsicht bei der Erstellung der Verdünnungen bei den Messungen mit dem *4plex-qPCR\_v2*-Protokoll wieder für alle Verdünnungsreihen und über alle Kanäle hinweg Effizienzen über 100 %. Es scheint also, dass weiterhin Inhibitoren in den Proben der Verdünnungsreihen präsent sind.

Beim Vergleich der Detektionslimits der konventionellen *PCR* gegenüber der *qPCR* erbrachte die *qPCR* eine wesentlich höhere Sensitivität. Zwar wurde für die konventionelle *PCR* lediglich ein Probenvolumen von 2,5 µl pro 20 µl Gesamtreaktionsansatz im Gegensatz zu 3 µl pro 10 µl Gesamtreaktionsansatz bei der *qPCR* verwendet. Doch auch wenn man das Erstellen der Reaktionsansätze als einen letzten Verdünnungsschritt miteinbezieht, errechnet sich für den Pf3D7<sup>2</sup>-Standard ein Detektionslimit der *qPCR* von 61,2 Parasiten/ml für *hrp2* und *hrp3* im Gegensatz zu 7.500 Parasiten/ml für *hrp2* und 75.000 Parasiten/ml für *hrp3* bei der konventionellen *PCR*.

#### 4.4 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Risiko von Kreuzamplifikation durch die *4plex-qPCR\_v2* minimiert wurde. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die entwickelte *4plex-qPCR\_v2* sensitiver ist als die konventionelle *hrp2-/hrp3-PCR* und somit weniger häufig fälschlicherweise *hrp2-/hrp3*-Deletionen in *P. falciparum*-Isolaten detektiert werden. Dies verspricht eine genauere Prävalenzbestimmung der *hrp2-/hrp3*-Deletionen in epidemiologischen Studien, insbesondere in Regionen mit einer niedrigen Endemizität und Populationen mit niedrigen Parasitämien (z.B. Erwachsene in hoch endemischen Regionen). Die *4plex-qPCR\_v2* wird nun für die Analyse der weiteren Feldproben aus Lambaréné im Rahmen der NoHRP2-Studie eingesetzt und leistet damit einen Beitrag in der Prävalenzbestimmung der *hrp2-/hrp3*-deletierten *P. falciparum*-Stämme in Gabun.

## 5 Zusammenfassung

Malaria ist eine der global bedeutendsten Infektionskrankheiten. Als Goldstandard zum Nachweis einer Malariainfektion gilt die Mikroskopie. Diese Methode birgt Probleme durch den nicht flächendeckenden Zugang zu Elektrizität vor allem in den Hauptendemiegebieten der Erkrankung und aufgrund der großen Expertise, die für das richtige Erkennen der Infektionen bei dieser Diagnostikmethode vorausgesetzt wird. Im letzten Jahrzehnt konnte durch die Einführung von Schnelltests die Rate von Personen, die auf Malaria getestet werden, entscheidend erhöht und damit auch die Behandlung dieser Personen ermöglicht werden. Nach Einführung und breiter Nutzung dieser Schnelltests wurden in mehreren Studien falsch-negative Testergebnisse beschrieben. Als Gründe werden zu niedrige Parasitämien und Schnelltests geringer Qualität genannt, bis hin zu Parasitenstämmen, die das nachzuweisende Protein HRP2 nicht mehr exprimieren. Die WHO hat daraufhin empfohlen, die Prävalenzen der *hrp2*- und *hrp3*-Gendelektionen zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeitsgruppe wurde dazu ein *4plex-qPCR*-Protokoll entwickelt, welches in einem einzigen Schritt eine Aussage über das Vorhandensein der Gene *hrp2* und *hrp3* trifft, gleichzeitig durch das Gen *cytochrom b* hochsensitiv eine Infektion mit dem *P. falciparum* nachweist und durch das *single copy gene*  $\beta$ -*tubulin* eine interne Qualitätskontrolle ermöglicht. Bei dem ersten *4plex-qPCR\_v1*-Protokoll wurde von einer relativ hohen Rate an Kreuzreaktivität zwischen *hrp2* und *hrp3* ausgegangen, weshalb für die vorliegende Arbeit neue Primer und Sonden designt wurden und ein *4plex-qPCR*-Protokoll der zweiten Generation etabliert und optimiert wurde. Mit diesem Protokoll wurden klinische Feldproben aus Lambaréné, Gabun, gemessen, die in vorherigen Messungen mit dem *4plex-qPCR\_v1*-Protokoll unklare Ergebnisse erbracht haben. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität des Nachweises einer *hrp2*- bzw. *hrp3*-Deletion mit dem *4plex-qPCR\_v2*-Protokoll entscheidend höher liegt als die Sensitivität, die mit der konventionellen *PCR* zu erreichen ist. Für weitere epidemiologische Studien zur Prävalenzbestimmung der Deletionen empfiehlt sich daher die Methode der *qPCR*. Das *4plex-qPCR\_v2*-Protokoll wird von nun an innerhalb dieser Arbeitsgruppe für die weitere Detektion von *hrp2*- und *hrp3*-Deletionen in Lambaréné, Gabun, verwendet.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, M., Joshi, S. N., Mbambo, G., Mu, A. Z., Roemmich, S. M., Shrestha, B., Strauss, K. A., Johnson, N. E., Oo, K. Z., Hlaing, T. M., Han, Z. Y., Han, K. T., Thura, S., Richards, A. K., Huang, F., Nyunt, M. M. and Plowe, C. V. (2015) 'An ultrasensitive reverse transcription polymerase chain reaction assay to detect asymptomatic low-density *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in small volume blood samples', *Malaria journal*, vol. 14, p. 520.
- Aikawa, M., Iseki, M., Barnwell, J. W., Taylor, D., Oo, M. M. and Howard, R. J. (1990) 'The pathology of human cerebral malaria', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 43, 2 Pt 2, pp. 30–37.
- Amaral, L. C., Robortella, D. R., Guimarães, L. F. F., Limongi, J. E., Fontes, C. J. F., Pereira, D. B., Brito, C. F. A. de, Kano, F. S., Sousa, T. N. de and Carvalho, L. H. (2019) 'Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections', *Malaria journal*, vol. 18, no. 1, p. 154.
- Amoah, L. E., Abankwa, J. and Opong, A. (2016) '*Plasmodium falciparum* histidine rich protein-2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana', *Malaria journal*, vol. 15, p. 101.
- Baker, J., Gatton, M. L., Peters, J., Ho, M.-F., McCarthy, J. S. and Cheng, Q. (2011) 'Transcription and expression of *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins in different stages and strains: implications for rapid diagnostic tests', *PloS one*, vol. 6, no. 7, e22593.
- Basu, S. and Sahi, P. K. (2017) 'Malaria: An Update', *The Indian Journal of Pediatrics*, vol. 84, no. 7, pp. 521–528.
- Berhane, A., Anderson, K., Mihreteab, S., Gresty, K., Rogier, E., Mohamed, S., Hagos, F., Embaye, G., Chinorumba, A., Zehaie, A., Dowd, S., Waters, N. C., Gatton, M. L., Udhayakumar, V., Cheng, Q. and Cunningham, J. (2018) 'Major Threat to Malaria Control Programs by *Plasmodium falciparum* Lacking Histidine-Rich Protein 2, Eritrea', *Emerging infectious diseases*, vol. 24, no. 3, pp. 462–470.
- Beshir, K. B., Sepúlveda, N., Bharmal, J., Robinson, A., Mwanguzi, J., Busula, A. O., Boer, J. G. de, Sutherland, C., Cunningham, J. and Hopkins, H. (2017) '*Plasmodium falciparum* parasites with histidine-rich protein 2 (pfrhp2) and pfrhp3 gene deletions in two endemic regions of Kenya', *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, p. 14718.
- Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J. and DeRisi, J. L. (2003) 'The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*', *PLoS biology*, vol. 1, no. 1, E5.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J.

- and Wittwer, C. T. (2009) 'The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments', *Clinical chemistry*, vol. 55, no. 4, pp. 611–622.
- Butcher, G. A. and Mitchell, G. H. (2018) 'The role of *Plasmodium knowlesi* in the history of malaria research', *Parasitology*, vol. 145, no. 1, pp. 6–17.
- Castro-Sesquen, Y. E., Kim, C., Gilman, R. H., Sullivan, D. J. and Searson, P. C. (2016) 'Nanoparticle-Based Histidine-Rich Protein-2 Assay for the Detection of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 95, no. 2, pp. 354–357.
- Chiodini, P. L., Bowers, K., Jorgensen, P., Barnwell, J. W., Grady, K. K., Luchavez, J., Moody, A. H., Cenizal, A. and Bell, D. (2007) 'The heat stability of *Plasmodium lactate* dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 101, no. 4, pp. 331–337.
- Choi, C. Y., Cerda, J. F., Chu, H. A., Babcock, G. T. and Marletta, M. A. (1999) 'Spectroscopic characterization of the heme-binding sites in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2', *Biochemistry*, vol. 38, no. 51, pp. 16916–16924.
- Conway, D. J., Fanello, C., Lloyd, J. M., Al-Joubori, B. M.A.-S., Baloch, A. H., Somanath, S. D., Roper, C., Oduola, A. M.J., Mulder, B., Pova, M. M., Singh, B. and Thomas, A. W. (2000) 'Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA', *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 111, no. 1, pp. 163–171.
- Farrugia, C., Cabaret, O., Botterel, F., Bories, C., Foulet, F., Costa, J.-M. and Bretagne, S. (2011) 'Cytochrome b gene quantitative PCR for diagnosing *Plasmodium falciparum* infection in travelers', *Journal of clinical microbiology*, vol. 49, no. 6, pp. 2191–2195.
- Fung, A. O., Damoiseaux, R., Grundleen, S., Panes, J. L., Horton, D. H., Judy, J. W. and Moore, T. B. (2012) 'Quantitative detection of PfHRP2 in saliva of malaria patients in the Philippines', *Malaria journal*, vol. 11, p. 175.
- Gamboa, D., Ho, M.-F., Bendezu, J., Torres, K., Chiodini, P. L., Barnwell, J. W., Incardona, S., Perkins, M., Bell, D., McCarthy, J. and Cheng, Q. (2010) 'A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests', *PloS one*, vol. 5, no. 1, e8091.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M. A., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W.,

- Fraser, C. M. and Barrell, B. (2002) 'Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*', *Nature*, vol. 419, no. 6906, pp. 498–511.
- Harris, B., Lennard, N., Clark, L., Line, A., Barron, A., Corton, C., Berriman, M., Pain, A., Hall, N., Atkin, R., Chillingworth, C., Doggett, J., Ormond, D., Sanders, M., Hayes, R., Hall, S., Quail, M. and Barrell, B. (2002) *P.falciparum Genome Sequencing, Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 13, AL844507.3*. [Online]. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AL844507.3?report=graph&from=1374236&to=1375299#> (Accessed 2 August 2020).
- Hofmann, N., Mwingira, F., Shekalaghe, S., Robinson, L. J., Mueller, I. and Felger, I. (2015) 'Ultra-sensitive detection of *Plasmodium falciparum* by amplification of multi-copy subtelomeric targets', *PLoS medicine*, vol. 12, no. 3, e1001788.
- Howard, R. J., Uni, S., Aikawa, M., Aley, S. B., Leech, J. H., Lew, A. M., Wellem, T. E., Renner, J. and Taylor, D. W. (1986) 'Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes', *The Journal of cell biology*, vol. 103, no. 4, pp. 1269–1277.
- Joanny, F., Löhr, S. J. Z., Engleitner, T., Lell, B. and Mordmüller, B. (2014) 'Limit of blank and limit of detection of *Plasmodium falciparum* thick blood smear microscopy in a routine setting in Central Africa', *Malaria journal*, vol. 13, p. 234.
- Kahama-Maró, J., D'Acremont, V., Mtasiwa, D., Genton, B. and Lengeler, C. (2011) 'Low quality of routine microscopy for malaria at different levels of the health system in Dar es Salaam', *Malaria journal*, vol. 10, p. 332.
- Kayser, F. H., Böttger, E. C., Deplazes, P., Haller, O. and Roers, A. (2014) *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: Hygiene, Immunologie, Bakteriologie, Virologie, Mykologie, Parasitologie, Infektiologie*, 13th edn, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Kolakovich, K. A., Gluzman, I. Y., Duffin, K. L. and Goldberg, D. E. (1997) 'Generation of hemoglobin peptides in the acidic digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* implicates peptide transport in amino acid production', *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 87, no. 2, pp. 123–135.
- Kozycki, C. T., Umulisa, N., Rulisa, S., Mwikarago, E. I., Musabyimana, J. P., Habimana, J. P., Karema, C. and Krogstad, D. J. (2017) 'False-negative malaria rapid diagnostic tests in Rwanda: impact of *Plasmodium falciparum* isolates lacking *hrp2* and declining malaria transmission', *Malaria journal*, vol. 16, no. 1, p. 123.
- Krampa, F. D., Aniweh, Y., Awandare, G. A. and Kanyong, P. (2017) 'Recent Progress in the Development of Diagnostic Tests for Malaria', *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, vol. 7, no. 3.

- Kreidenweiss, A., Trauner, F., Rodi, M., Koehne, E., Held, J., Wyndorps, L., Manouana, G. P., McCall, M., Adegnika, A. A., Lalremruata, A., Kremsner, P. G., Fendel, R. and Sandri, T. L. (2019) 'Monitoring the threatened utility of malaria rapid diagnostic tests by novel high-throughput detection of *Plasmodium falciparum* hrp2 and hrp3 deletions: A cross-sectional, diagnostic accuracy study', *EBioMedicine*, vol. 50, pp. 14–22.
- Kumar, N., Pande, V., Bhatt, R. M., Shah, N. K., Mishra, N., Srivastava, B., Valecha, N. and Anvikar, A. R. (2013) 'Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian *Plasmodium falciparum* population and false negative malaria rapid diagnostic test', *Acta tropica*, vol. 125, no. 1, pp. 119–121.
- Kumar, N., Singh, J. P., Pande, V., Mishra, N., Srivastava, B., Kapoor, R., Valecha, N. and Anvikar, A. R. (2012) 'Genetic variation in histidine rich proteins among Indian *Plasmodium falciparum* population: possible cause of variable sensitivity of malaria rapid diagnostic tests', *Malaria journal*, vol. 11, p. 298.
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B. and Hedgpeth, J. (2000) '3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures', *Nucleic acids research*, vol. 28, no. 2, pp. 655–661.
- Lambros, C. and Vanderberg, J. P. (1979) 'Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture', *The Journal of Parasitology*, vol. 65, no. 3, p. 418.
- Leech, J. H., Barnwell, J. W., Aikawa, M., Miller, L. H. and Howard, R. J. (1984) '*Plasmodium falciparum* malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton', *The Journal of cell biology*, vol. 98, no. 4, pp. 1256–1264.
- Lepecq, J.-B. and Paoletti, C. (1967) 'A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids', *Journal of Molecular Biology*, vol. 27, no. 1, pp. 87–106.
- Li, P., Xing, H., Zhao, Z., Yang, Z., Cao, Y., Li, W., Yan, G., Sattabongkot, J., Cui, L. and Fan, Q. (2015) 'Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in the China-Myanmar border area', *Acta tropica*, vol. 152, pp. 26–31.
- Mayxay, M., Pukrittayakamee, S., Chotivanich, K., Looareesuwan, S. and White, N. J. (2001) 'Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP-2 in successfully treated acute falciparum malaria', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 95, no. 2, pp. 179–182.
- Oakley, M. S., Gerald, N., McCutchan, T. F., Aravind, L. and Kumar, S. (2011) 'Clinical and molecular aspects of malaria fever', *Trends in parasitology*, vol. 27, no. 10, pp. 442–449.
- Owusu, E. D. A., Djonor, S. K., Brown, C. A., Grobusch, M. P. and Mens, P. F. (2018) '*Plasmodium falciparum* diagnostic tools in HIV-positive under-5-

- year-olds in two ART clinics in Ghana: are there missed infections?', *Malaria journal*, vol. 17, no. 1, p. 92.
- Pal, P., Daniels, B. P., Oskman, A., Diamond, M. S., Klein, R. S. and Goldberg, D. E. (2016) 'Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein II Compromises Brain Endothelial Barriers and May Promote Cerebral Malaria Pathogenesis', *mBio*, vol. 7, no. 3.
- Parr, J. B., Verity, R., Doctor, S. M., Janko, M., Carey-Ewend, K., Turman, B. J., Keeler, C., Slater, H. C., Whitesell, A. N., Mwandagalirwa, K., Ghani, A. C., Likwela, J. L., Tshefu, A. K., Emch, M., Juliano, J. J. and Meshnick, S. R. (2017) 'Pfhrp2-Deleted Plasmodium falciparum Parasites in the Democratic Republic of the Congo: A National Cross-sectional Survey', *The Journal of infectious diseases*, vol. 216, no. 1, pp. 36–44.
- Pati, P., Dhangadamajhi, G., Bal, M. and Ranjit, M. (2018) 'High proportions of pfrhp2 gene deletion and performance of HRP2-based rapid diagnostic test in Plasmodium falciparum field isolates of Odisha', *Malaria journal*, vol. 17, no. 1, p. 394.
- Paul, F., Roath, S., Melville, D., Warhurst, D. C. and Osisanya, J.O.S. (1981) 'SEPARATION OF MALARIA-INFECTED ERYTHROCYTES FROM WHOLE BLOOD: USE OF A SELECTIVE HIGH-GRADIENT MAGNETIC SEPARATION TECHNIQUE', *The Lancet*, vol. 318, no. 8237, pp. 70–71.
- QIAGEN (2016) *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook* [Online], 5th edn.
- QIAGEN (2017) *QIAxcel Advanced User Manual* [Online].
- Reinke, L. (2017, nicht veröffentlicht) *Establishment and application of a PCR for the detection of hrp2 and hrp3 gene deletions in the genome of Plasmodium falciparum*. [Online].
- Roche Diagnostics GmbH (2008) *LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual* [Online].
- Rodi, M. (2018, nicht veröffentlicht) *Validation of a Multiplex Real-Time PCR for Detection of hrp2 and hrp3 Gene Negative Plasmodium falciparum Parasites* [Online].
- Rodriguez-del Valle, M., Quakyi, I. A., Amuesi, J., Quaye, J. T., Nkrumah, F. K. and Taylor, D. W. (1991) 'Detection of antigens and antibodies in the urine of humans with Plasmodium falciparum malaria', *Journal of clinical microbiology*, vol. 29, no. 6, pp. 1236–1242.
- Samal, A. G., Behera, P. K., Mohanty, A. K., Satpathi, S., Kumar, A., Panda, R. R., Minz, A. M., Mohanty, S., Samal, A. and van der Pluijm, R. W. (2017) 'The sensitivity and specificity of a urine based Rapid Diagnostic Test for the diagnosis of plasmodium falciparum in a malaria endemic area in Odisha, India', *Pathogens and global health*, vol. 111, no. 7, pp. 383–387.
- Seeger, K., Murphy, L., Harris, D., Berriman, M., Pain, A. and Hall, N. (2002) *Plasmodium falciparum 3D7 genome assembly, chromosome: 8* [Online],

- Unpublished. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AL844507.3?report=graph&from=1374236&to=1375299> (Accessed 2 August 2020).
- Sharma, Y. D. (1988) 'Genomic organization, structure and possible function of histidine-rich proteins of malaria parasites', *International Journal of Biochemistry*, vol. 20, no. 5, pp. 471–477.
- Sherman, I. W., Eda, S. and Winograd, E. (2003) 'Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind', *Microbes and Infection*, vol. 5, no. 10, pp. 897–909.
- Shiff, C. J., Premji, Z. and Minjas, J. N. (1993) 'The rapid manual ParaSight®-F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 87, no. 6, pp. 646–648.
- Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Abdullah, M. S. and Rahman, H. A. (1999) 'A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 60, no. 4, pp. 687–692.
- Singh, S. K., Koshkin, A. A., Wengel, J. and Nielsen, P. (1998) 'LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition', *Chemical Communications*, no. 4, pp. 455–456.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S. and Brown, K.N. (1993) 'Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections', *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 58, no. 2, pp. 283–292.
- Swan, H., Sloan, L., Muyombwe, A., Chavalitshewinkoon-Petmitr, P., Krudsood, S., Leowattana, W., Wilairatana, P., Looareesuwan, S. and Rosenblatt, J. (2005) 'Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 73, no. 5, pp. 850–854.
- Thermo Fischer Scientific (2015) *Assessment of Nucleic Acid Purity* [Online].
- Trauner, F. L. (2019) *Etablierung einer Multiplex-qPCR zur Detektion einer Deletion des pfhrp2-Gens in Plasmodium falciparum* [Online].
- Uguen, C., Rabodonirina, M., Pina, J. J. de, Vigier, J. P., Martet, G., Maret, M. and Peyron, F. (1995) 'ParaSight-F rapid manual diagnostic test of *Plasmodium falciparum* infection', *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 73, no. 5, pp. 643–649.
- Wellems, T. E. and Howard, R. J. (1986) 'Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 16, pp. 6065–6069.

- Weltgesundheitsorganisation (2010) *Basic malaria microscopy*, 2nd edn, Geneva, World Health Organization.
- Willie, N., Zimmerman, P. A. and Mehlotra, R. K. (2018) 'Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 Gene Variation in a Malaria-Endemic Area of Papua New Guinea', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 99, no. 3, pp. 697–703.
- World Health Organization *WHO Malaria Threat Maps: tracking biological challenges to malaria control and elimination* [Online]. Available at [https://apps.who.int/malaria/maps/threats/?theme=diagnosis&mapType=diagnosis%3A0&bounds=%5B%5B-136.86350400000885%2C-34.536652300722984%5D%2C%5B103.60524599997035%2C68.74703954485526%5D%5D&insecticideClass=PYRETHROIDS&insecticideTypes=&assayTypes=MOLECULAR\\_ASSAY%2CBIOCHEMICAL\\_ASSAY%2CSYNERGIST-INSECTICIDE\\_BIOASSAY&synergistTypes=&species=&vectorSpecies=&surveyTypes=&deletionType=HRP2\\_PROPORTION\\_DELETION&plasmodiumSpecies=P.\\_FALCIPARUM&drug=DRUG\\_AL&mmType=1&endemicity=false&countryMode=false&storyMode=false&storyModeStep=0&filterOpen=false&filtersMode=filters&years=1998%2C2020](https://apps.who.int/malaria/maps/threats/?theme=diagnosis&mapType=diagnosis%3A0&bounds=%5B%5B-136.86350400000885%2C-34.536652300722984%5D%2C%5B103.60524599997035%2C68.74703954485526%5D%5D&insecticideClass=PYRETHROIDS&insecticideTypes=&assayTypes=MOLECULAR_ASSAY%2CBIOCHEMICAL_ASSAY%2CSYNERGIST-INSECTICIDE_BIOASSAY&synergistTypes=&species=&vectorSpecies=&surveyTypes=&deletionType=HRP2_PROPORTION_DELETION&plasmodiumSpecies=P._FALCIPARUM&drug=DRUG_AL&mmType=1&endemicity=false&countryMode=false&storyMode=false&storyModeStep=0&filterOpen=false&filtersMode=filters&years=1998%2C2020) (Accessed 2 August 2020).
- World Health Organization (1988) 'Malaria diagnosis: memorandum from a WHO meeting', *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 66, no. 5, pp. 575–594 [Online]. Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3061674>.
- World Health Organization (2006) *The use of malaria rapid diagnostic tests. Second edition* [Online].
- World Health Organization (2016) *P. falciparum hrp2/3 gene deletions* [Online], Geneva.
- World Health Organization (2018a) *Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8* [Online].
- World Health Organization (2018b) *World Malaria Report 2018* [Online].
- World Health Organization (2019a) *False-negative RDT results and P. falciparum histidine-rich protein 2/3 gene deletions* [Online].
- World Health Organization (2019b) *Guidance on control materials for antigen detecting malaria RDTs: tools for preparation and validation* [Online], WHO reference number: WHO/CDS/GMP/2019.08.
- World Health Organization (2019c) *WORLD MALARIA REPORT 2019*, [S.l.], World Health Organization.
- World Health Organization (2020a) *Template protocols to support surveillance and research for pfhrp2/pfhrp3 gene deletions* [Online], WHO Reference Number 978-92-4-000203-6.
- World Health Organization (2020b) *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges*.

Ziegler, J., Chang, R. T. and Wright, D. W. (1999) 'Multiple-Antigenic Peptides of Histidine-Rich Protein II of *Plasmodium falciparum*: Dendrimeric Biomineralization Templates', *Journal of the American Chemical Society*, vol. 121, no. 11, pp. 2395–2400.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Tropeninstitut der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Peter G. Kremsner durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Kreidenweiss, Arbeitsgruppen-Leiterin und Dr. Thaisa Lucas Sandri, PostDoc. Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Johanna Griesbaum, TA und Gédéon Prince Manouana, PhD Student) von mir eigenständig durchgeführt. Die Methode der Herstellung der Standardverdünnung wurde in Zusammenarbeit mit Johanna Griesbaum und Unterstützung durch Annette Knoblich durchgeführt, die erste Pf3D7-Standardverdünnung konnte von Miriam Rodi und Johanna Griesbaum übernommen werden. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## 8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Kreidenweiss, A., Trauner, F., Rodi, M., Koehne, E., Held, J., Wyndorps, L., Manouana, G.P., McCall, M., Adegnika, A.A., Lalremruata, A., Kremsner, P.G., Fendel, R., Sandri, T.L., 2019. Monitoring the threatened utility of malaria rapid diagnostic tests by novel high-throughput detection of *Plasmodium falciparum* hrp2 and hrp3 deletions: A cross-sectional, diagnostic accuracy study. *EBioMedicine* 50, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.10.048>

## 9 Danksagung

Im Folgenden möchte ich gerne einigen Personen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre bzw. die einen entscheidenden Beitrag während der Zeit meiner Promotion geleistet haben.

An erster Stelle ist hierbei **Prof. Dr. Peter G. Kremsner**, Leiter des Tropeninstituts Tübingen, zu nennen, für die Möglichkeit meine Promotion unter seiner Leitung am Institut durchzuführen.

**Dr. Andrea Kreidenweiss** danke ich für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die Supervision meiner Arbeit und die geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Besonderen Dank geht an **Dr. Thaisa Lucas Sandri**, an die ich mich stets mit fachlichen Fragestellungen wenden konnte und deren Unterstützung einen großen Beitrag im Fortschritt meiner Arbeit geleistet hat.

Herzlichst danke ich **Johanna Griesbaum** für die Einarbeitung in die Parasitenkultur, die Einweisung in die Strukturen des Instituts und im Besonderen für ihre moralische und emotionale Unterstützung und ihr offenes Ohr bei jeglicher Angelegenheit.

Für die Einarbeitung zur Durchführung der *qPCR* und der DNA-Extraktion möchte ich mich noch ganz herzlich bei **Gédéon Prince Manouana** sowie bei **Jutta Kun** für die Unterstützung und Einweisung in die technischen Geräte, die ich im Laufe meiner Laborarbeit zu nutzen hatte, bedanken.

**Annette Knoblich** danke ich speziell für die Unterstützung und dem Teilen ihrer Expertise bei der Herstellung der Standardverdünnungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch herzlich bei **Miriam Rodi**, meiner Vorgängerin, bedanken für die erste Einweisung in die Thematik und die Bereitschaft für jegliche Rückfragen stets zur Verfügung zu stehen

## 10 Anhang

### 10.1 NanoDrop Messung der einzelnen Isolate

Tab. 10-1: Gesamte NanoDrop-Messung mit Konzentrationen und Wellenlängen-Quotient der einzelnen DNA-Extraktionen der Isolate.

Isolat	Stamm	Konz. [ng/µl]	Aliquot																Pool	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1	PfDd2	Konz. [ng/µl]	38,6	30,4	35,5	35,0	38,7	33,5	37,4	34,8	37,0	25,9	33,2	28,3	27,7	29,5	31,3	28,3	35,1	
		260/280	1,77	1,82	1,90	1,90	2,00	1,84	1,82	1,86	1,84	1,86	1,91	1,91	1,84	1,81	1,79	1,86	1,99	
2	PfHB3	Konz. [ng/µl]	28,2	29,0	27,9	34,3	25,7	27,7	19,8	26,5	29,2	28,4	23,1	29,6	28,4	24,0	21,4	23,0	26,0	
		260/280	1,72	1,83	1,82	1,68	1,80	1,74	1,90	1,77	1,60	1,71	1,71	1,82	1,70	1,71	1,77	1,77	1,83	
3	Pf3D7	Konz. [ng/µl]	40,2	40,5	31,8	34,7	34,7	34,1	39,4	31,8	29,7	31,7	35,1	33,1	34,8	35,1	34,1	22,7	33,0	
		260/280	1,79	1,93	1,99	1,72	1,82	1,90	1,83	1,92	1,86	1,93	1,82	1,89	1,98	1,99	1,90	1,99	1,98	
4	Pf3D7	Konz. [ng/µl]	14,8	19,3	17,8	14,3	16,2													
		260/280	1,80	1,93	1,85	1,87	1,60													
Vollblut		Konz. [ng/µl]	26,7	30,2	33,9	27,9	25,6	30,1	22,5	27,1										
		260/280	1,80	1,94	1,64	1,88	1,78	1,85	1,81	1,80										
uninf. RBC		Konz. [ng/µl]	10,8	6,6																
		260/280	1,44	1,48																

## 10.2 Gensequenzen

ATGGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAGTATTATCCGCTGCCGTTTTTGCCCTCCGTACT  
 TTTGTTAGATAACGTAAGCATTFTAATGCAAATAGAAAATAAATATATCATTCAA  
 TTATAAAAAATACATATAATAATAATATATATATATATATATATATATTTATATATTGT  
 ATATATATAAAATTTTTTCATTTTTAAATGCTTTTTTATTTTTATATAGAATAAATCC  
 GCATTTAATAAATAACTTGTGTAGCAAAAATGCAAAAAGGACTTAATTTAAATAAGA  
 GATTATTACACGAAACTCAAGCACATGTAGATGATGCCATCATGCTCATCATGT  
 AGCCGATGCCATCATGCTCATCATGTAGCCGATGCCATCATGCTCATCATGTA  
 GCCGATGCCATCATGCTCATCATGCAGCCGATGCCATCATGCTCATCATGCAG  
 CCGATGCCATCATGCTCATCATGCAGCCGATGCCATCATGCTCATCATGCTCAC  
 CATGCAGCCGATGCCATCACGCTCATCATGCAGCCGATGCCATCATGCTCAC  
 ATGCAGCTGATGCTCATCACGCTCATCATGCAGCCGATGCCATCATGCTCACCA|  
 TGCAGCTGATGCTCATCACGCTCATCATGCATCCGATGCCATCATGCTCATCATG  
 CAGCCTATGCCATCATGCTCATCATGCATCCGATGCTCATCATGCAGCTGATGCT  
 CACCATGCAGCTTATGCCATCACGCTCATCATGCAGCTGATGCTCATCATGCAG  
 CCGATGCTCACCATGCAACCGATGCTCATCATGCAGCCGATGCTCATCATGCAGC  
 CGATGCTCACCATGCAGCCGATGCTCACCATGCAACCGATGCTCATCACGCTCAC  
 CATGCAGCCGATGCTCACCATGCAACCGATGCTCATCACGCTCACCATGCAGCCG  
 ATGCTCATCATGCAGCCGCACACCATGCAACTGATGCTCACCATGCAGCCGCACA  
 CCATGCAACCGATGCTCACCATGCAGCCGCACACCACGAAGCCGCCACACATTGC  
 CTACGCCATTAA

Abb. 10-1: Gensequenz des hrp2 Gens in 5'3' Richtung und Lokalisation der Bindungsstellen der Primer und Sonden. Die Introns des Gens sind durchgestrichen dargestellt.

Forward Primer in 5'3' Richtung	grüne Schrift	qPCR neu	TTCCGCATTTAATAAATAACTTGTG
	grün unterstrichen	qPCR alt	AGGACTTAATTTAAATAAGAGATTA
	grün hinterlegt	k. PCR	GGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAG
Reverse Primer in 5' 3' Richtung des nicht ab- gebildeten komplementären Strangs.	Rote Schrift	qPCR neu	CGGCTACATGATGAGCATG
	rot unterstrichen	qPCR alt	GCTACATGATGAGCATGA
	rot hinterlegt	k. PCR	TTAATGGCGTAGGCAATGTGTGG
Sonde	blaue Schrift	qPCR neu	ACTCAAGCACATGTAGATGATGCC
	blau unterstrichen	qPCR alt	TACACGAAACTCAAGCACA

(Seeger et al., 2002)

ATGGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAA TATTATCCGCTGCCGTTTTTGCTTCCGTA  
 TTTGTTAGATAACGTAAGTATTTTAAATTGCAAAATATAAAATAAATATAACACTTACT  
 TATAAAAAATACATATAATAATATTATATATATATATATATATATATATATATATATAT  
 ATATATATATGTACATTTTTTACATTTTTTAAATGATTTTTTCATTTTTATAGAATAACT  
 CCGAATTTAACAATAACTTGTTTAGCAAAAATGCAAAAGGACTTAATTCAAATAA  
 GAGATTATTACACGAAAGTCAAGCACATGCAGGTGATGCCATCATGCACATCAT  
 GTAGCTGATGCCATCATGCACATCATGTAGCTGATGCCATCATGCACATCATG  
 TAGCTGATGCCATCATGCACATCATGTAGCTGATGCCATCATGCACATCATGC  
 TCACCATGCAGCTAATGCTCACCATGCAGCTAATGCTCACCATGCAGCTAATGCT  
 CACCATGCAGCTAATGCTCATCATGCAGCTAATGCTCACCATGCAGCTAATGCTC  
 ACCATGCAGCTAATGCTCATCATGCAGCTAATGCTCACCATGCAGCTAATGCTCA  
 CCATGCAGCTAATGCTCACCATGCAGCTAATGCTCACCATGCAGCTGATGCTAAT  
 CACGGATTTCATTTTAACCTTCACGATAACAATCCCATACTTTACATCATGCAA  
 AGCTAATGCTTGTTTTGATGATTCTCACCATGACGATGCCACCATGATGGAGCA  
 CACCACGACGATGCCACCATGATGGAGCACACCACGACGATGCCACCATGAT  
 GGAGCACACCACGACGATGCCACCATGATGGAGCACACCACGACGATGCCAC  
 CATGATGGAGCACACCACGATGGAGCACACCACGATGGAGCACACCATGATGGA  
 GCACACCATAATGCCACTACGCATCACTTACACCA TTA

Abb. 10-2: Gensequenz des hrp3 Gens in 5'3' Richtung und Lokalisation der Bindungsstellen der Primer und Sonden. Die Introns des Gens sind durchgestrichen dargestellt.

	grüne Schrift	qPCR neu	CTCCGAATTTAACAATAACTTGTTTA
Forward Primer in 5'3' Richtung	grün unterstrichen	qPCR alt	AGGACTTAATTCAAATAAGAGATTA
	grün hinterlegt	k. PCR	GGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAA
Reverse Primer in 5'3' Richtung des nicht abgebildeten komplementären Strangs.	Rote Schrift	qPCR neu	CAGCTACATGATGTGCATG
	rot unterstrichen	qPCR alt	AGCTACATGATGTGCATGA
	rot hinterlegt	k. PCR	ACTACGCATCACTTACACCA
Sonde in 5'3' Richtung	blaue Schrift	qPCR neu	AGTCAAGCACATGCAGGTGATGCC
	blau unterstrichen	qPCR alt	GAAAGTCAAGCACATGCAG

(Harris et al., 2002)

ATGAGAGAAATTGTTTCATATTCAAGCTGGCCAATGTGGAAATCAAATAGGTGCAA  
 AGTTTTGGGAAGTCATTCTGATGAGCATGGAATAGATCCAGTAAGTTTAAAAAA  
 AAAATATATTTTATTATATGAATCTGTAAACATATGTATATATATATATATATA  
 TATATATATATGGAAGAATAATTTGTGTGTATAATTTGGGGTCCTTCCCCTTTAT  
 TGTATTCTATAAATGCCTCCTTTATATTGATAATAATTTATATATGTAAACCTTTA  
 ATGCCGAGGCTTATATATAAAAACCTTAGATATTATAAAATAAATGTATATTATGT  
 ACATATGACGATATCGCTCTCTATATATATATATATATATATATATATATTTATTTAT  
 TTATATATTTATTTATTTATTTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAG  
 TGGTACCTATTGTGGGGACAGTGACTTACAGTTAGAAAGAGTTGACGTTTTTTAC  
 AACGAAGCAACAGGAGGTAGATATGTTCCAAGAGCTATATTGATGGACTTGGAA  
 CCTGGTACTATGGATAGTGTTCGTGCTGGCCCCCTTTGGTCAATTATTTTCGTCCAGA  
 TAATTTTGTGTTTGGTCAAACAGGTGCAGGAAATAATTGGGCTAAAGGACATTAT  
 ACTGAAGGTGCTGAATTGATAGATGCAGTTTTAGATGTCGTTAGAAAAGAAGCAG  
 AAGGTTGTGATTGTTACAAGGATTTAGATTACTCATTATTAGGTGGTGGTACA  
 GGTAGTGGTATGGGTACTTTGTTGATTAGTAAAATAAGAGAGGAGTATCCTGATC  
 GTATTATGGAAACATTTTCTGTATTTCCATCACCAAAAGTTTCTGATACTGTTGTT  
 GAACCATATAATGCTACATTATCAGTTCATCAGTTGGTTGAAAATGCTGATGAAG  
 TTCAAGTTATCGATAATGAAGCTTTATATGACATATGTTTTAGGACTCTTAAATTA  
 ACAACACCAACATATGGAGATTTAAATCACCTTGATCAGCTGCAATGTCAGGTG  
 TAACCTGTTTCGTTAAGATTTCTGGTCAACTAACAGTGACTTAAGAAAATTAG  
 CTGTTAATTTGATCCCATTCCCACGTTTACATTTCTTTATGATCGGGTTTGCTCCTT  
 TAACTAGTAGAGGCAGTCAACAATACAGAGCCTTAACTGTGCCGGAGTTAACAC  
 AACAAATGTTTCGACGCAAAAAATATGATGTGCGCAAGTGATCCAAGACATGGAA  
GATATTTAACGGCATGTGCTATGTTTAGAGGAAGAATGTCCACAAAGGAAGTTGA  
 CGAACAAATGTTAAACGTTCAAATAAAAACCTCATCTTATTTTGTGCAATGGATT  
 CCTCACAAACAAAGTAAGAAGGAACAATTGATACTAGTATGCATGTTTTTTTTGT  
 TTATATGTATTTATATATATATATATATATATATATATATATATGTTATTCATTATATATTTTGA  
 AATATACATTTTACATATAAATTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGTT  
 TTTTTCTTTAGATCAAGTGTTTGTGATATCCACCTAAGGGATTAAAAATGGCTGT  
 TACTTTTGTAGGAAACTCAACCGCCATTCAAGAAATGTTTAAAAGAGTTTCTGAT  
 CAATTTACTGCTATGTTTAGAAGAAAAGCCTTTTTGCACTGGTACACCGGAGAAG  
 GTATGGACGAGATGGAATTTACAGAAGCTGAATCAAATATGAATGATTTAGTTTC  
 AGAATATCAACAATATCAAGATGCTACAGCAGAAGAGGAAGGAGAATTTGAAG  
 AAGAAGAAGGAGACGTAGAAGCCTAA

Abb. 10-3: Gensequenz des  $\beta$ -tubulin Gens in 5'3' Richtung und Lokalisation der Bindungsstellen der Primer und Sonden. Die Introns des Gens sind durchgestrichen dargestellt.

Forward Primer in 5'3' Richtung	grün unterstrichen	qPCR alt	TGATGTGCGCAAGTGATCC
Reverse Primer in 5' 3' Richtung des nicht abgebildeten komplementären Strangs.	Rot unterstrichen	qPCR alt	TCCTTTGTGGACATTCTTCTC
Sonde in 5' 3' Richtung des nicht abgebildeten komplementären Strangs.	Blau unterstrichen	qPCR alt	TAGCACATGCCGTTAAATATCTT-CCATGTCT

(Gardner et al., 2002)

ATGAACTTTTACTCTATTAATTTAGTTAAAGCACACTTAATAAAATTACCCATGTCC  
 ATTGAACATAAACTTTTTATGGAATTACGGATTCCTTTTAGGAATAATATTTTTTA  
 TTCAAATTATAACAGGTGTATTTTTAGCAAGTCGATATACACCAGATGTTTCATAT  
 GCATATTATAGTATAACAACACATTTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTA  
 GATACATGCACGCAACAGGTGCTTCTCTTGTATTTTTATTAACATATCTTCATATT  
 TTAAGAGGATTAATAACTCATATATGTATTTACCATTATCATGGATATCTGGATT  
 GATTTTATTTATGATATTTATTGTAAGTCTTTCGTTGGTTATGTCTTACCATGGGG  
 TCAAATGAGTTATTGGGGTGCAACTGTAATTACTAACTTGTTATCCTCTATTCCAG  
TAGCAGTAATTTGGATATGTGGAGGATATACTGTGAGTGATCCTACAATAAAACG  
ATTTTTGTACTACATTTTATCTTACCATTATTGGATTATGTATTGTATTATACA  
 TATATTTTTCTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCAT  
 TAAAAATACCCTTTTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTTAAAGGATTTAATAAT  
 GTTATAATTTTTATTTCTAATACAAAGTTTATTTGGAATTATACCTTTATCACATCCT  
 GATAATGCTATCGTAGTAAATACATATGTTACTCCATCTCAAATTGTACCTGAATG  
 GACTTTCTACCATTTTATGCAATGTTAAAACTGTTCCAAGTAAACCAGCTGGT  
 TTAGTAATTGTATTATTATCATTACAATTATTATTCTTATTAGCAGAACAAAGAAG  
 TTTAACAACATAAATTCAATTTAAAATGATTTTTGGTGCTAGAGATTATTCTGTTC  
 CTATTATATGGTTTATGTGTGCATTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTA  
 CCACAAGATATATTCATTTTATATGGTCGATTATTTATTGTATTATTTTTCTGTAGT  
 GGTTTATTTGTACTTGTTTCATTATAGACGAACACATTATGATTACAGCTCCCAAG  
 CAAACATATAA

Abb. 10-4: Gensequenz des cytochrom b Gens in 5'3' Richtung und Lokalisation der Bindungsstellen der Primer und Sonden.

Forward Primer in 5'3' Richtung	grün unterstrichen	qPCR alt	TACTAACTTGTTATCCTCTATTCCAGTAGC
Reverse Primer in 5'3' Richtung des nicht abgebildeten komplementären Strangs.	rot unterstrichen	qPCR alt	CCTTTAACATCAAGACTTAATAGATTGGA
Reverse Primer in 5'3' Richtung des nicht abgebildeten komplementären Strangs.	blau unterstrichen	qPCR alt	GTGCTACCATGTAAATGTAA

(Conway et al., 2000)

### 10.3 Darstellung der Fehlpaarungen der Primer und Sonden

hrp2 T T C C G C A T T T A A T A A T A A C T T G T G T A  
 hrp3 C T C C G A A T T T A A C A A T A A C T T G T T T A

Abb. 10-5: Fehlpaarungen der neuen qPCR-Forward-Primer für hrp2 und hrp3. Darstellung der Nukleotidsequenzen in 5'3' Richtung. Die Nukleotide, die bei einer Kreuzamplifikation zu einer Fehlpaarung führen würden, sind rot hinterlegt. Da die Primer nicht identisch lang sind, ist beim hrp2-Primer in tiefgestellten Buchstaben die Nukleotid-Sequenz dargestellt, die nicht mehr Teil des hrp2 Primer ist, aber bei einer Kreuzamplifikation durch den hrp3 Primer noch von Bedeutung wäre.

Hrp2 A G G A C T T A A T T T A A A T A A G A G A T T A  
 hrp3 A G G A C T T A A T T C A A A T A A G A G A T T A

Abb. 10-6: Fehlpaarungen der alten qPCR-Forward-Primer für hrp2 und hrp3. Darstellung der Nukleotidsequenzen in 5'3' Richtung. Die Nukleotide, die bei einer Kreuzamplifikation zu einer Fehlpaarung führen würden, sind rot hinterlegt.

Hrp2 C A T G C T C A T C A T G T A G C C G  
 hrp3 C A T G C A C A T C A T G T A G C T G

Abb. 10-7: Fehlpaarungen der neuen qPCR-Reverse-Primer für hrp2 und hrp3. Darstellung der Nukleotidsequenzen in 5'3' Richtung. Die Nukleotide, die bei einer Kreuzamplifikation zu einer Fehlpaarung führen würden, sind rot hinterlegt.

Hrp2 T C A T G C T C A T C A T G T A G C c  
 hrp3 T C A T G C A C A T C A T C T A G C T

Abb. 10-8: Fehlpaarungen der alten qPCR-Reverse-Primer für hrp2 und hrp3. Darstellung der Nukleotidsequenzen in 5'3' Richtung. Die Nukleotide, die bei einer Kreuzamplifikation zu einer Fehlpaarung führen würden, sind rot hinterlegt. Da der hrp2 Primer eine Nukleotid kürzer ist als der hrp3 Primer, ist der Buchstabe des entsprechenden Nukleotids, welches nicht mehr Teil des Primers ist, aber bei einer Kreuzamplifikation der hrp3 Primers an das hrp2 Gen von Bedeutung wäre, in tiefgestelltem Buchstaben gezeigt.

Hrp2 A C T C A A G C A C A T G T A G A T G A T G C C  
 hrp3 A G T C A A G C A C A T G C A G G T G A T G C C

Abb. 10-9: Fehlpaarungen der neuen Sonden für hrp2 und hrp3. Darstellung der Nukleotidsequenzen in 5'3' Richtung. Die Nukleotide, die bei einer Kreuzamplifikation zu einer Fehlpaarung führen würden, sind rot hinterlegt.

hrp2 T A C A C G A A A C T C A A G C A C A T G T A G  
 hrp3 T A C A C G A A A G T C A A G C A C A T G C A G

Abb. 10-10: Fehlpaarungen der alten Sonden für hrp2 und hrp3. Darstellung der Nukleotidsequenzen in 5'3' Richtung. Die Nukleotide, die bei einer Kreuzamplifikation zu einer Fehlpaarung führen würden, sind rot hinterlegt. Da die jeweiligen Sonden nicht an die identische Lokation binden, sind die Nukleotid-Sequenzen, die nicht mehr Teil der jeweiligen Sonde sind, aber bei einer Kreuzamplifikation durch die jeweils andere Sonde von Bedeutung wäre, in tiefgestellten Buchstaben dargestellt.

hrp2 G G T T T C C T T C T C A A A A A A T A A A G  
 hrp3 G G T T T C C T T C T C A A A A A A T A A A A

Abb. 10-11: Fehlpaarungen der Forward-Primer für hrp2 und hrp3 der normalen PCR. Darstellung der Nukleotidsequenzen in 5'3' Richtung. Die Nukleotide, die bei einer Kreuzamplifikation zu einer Fehlpaarung führen würden, sind rot hinterlegt.

hrp2 C G A A A C T C A A G C A C A T G T A G A  
 hrp3 C G A A A G T C A A G C A C A T G C A G G  
 hrp2 G C C A C A C A T T G C C T A C G C C A  
 hrp3 A C T A G G C A T C A C T T A C A C C A

Abb. 10-12: Fehlpaarungen der Reverse-Primer für hrp2 und hrp3 der normalen PCR. Darstellung der Nukleotidsequenzen in 5'3' Richtung. Die Nukleotide, die bei einer Kreuzamplifikation zu einer Fehlpaarung führen würden, sind rot hinterlegt. Da die jeweiligen Primer an jeweils komplett unterschiedlichen Lokationen binden, ist in der oberen Zeile der hrp2 Primer sowie die Nukleotid-Folge des hrp3 Gens, die bei einer Kreuzamplifikation entscheidend wäre, dargestellt und in der unteren Zeile der hrp3 Primer mit der entsprechenden Nukleotid-Folge auf dem hrp2 Gen. Nukleotid-Folgen die entsprechend nicht Teil eines Primers sind, kennzeichnen sich in der Abbildung durch tiefgestellte Buchstaben dargestellt.