

**Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff**

**Experimentelle Untersuchung des pathogenen
Adhäsionsvorganges der Malaria tropica mit
Schwingquarzsensoren**

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

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

**vorgelegt von
Stefani Franziska Kleiner
aus
Sigmaringen**

2011

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Northoff
2. Berichterstatter:	Professor Dr. P.G. Kremsner

Diese Dissertation entstand in der Zeit von März 2009 bis Januar 2011 innerhalb der Biosensorik-Gruppe (AG Gehring) des Instituts für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin unter der Leitung von Dr. rer. nat. Frank K. Gehring. Die Begutachtung wurde von Professor Dr. H. Northoff, Universität Tübingen und Professor Dr. P.G. Kremsner übernommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines zur Malaria.....	1
1.2 <i>Plasmodium falciparum</i> – der Erreger und sein Lebenszyklus	4
1.3 Pathogenese der Malaria tropica	7
1.4 Schwingquarzsensork	10
1.5 Stand der Wissenschaft.....	12
1.6 Ziel der Arbeit	12
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Tabelle 1: Labormaterialien und Geräte	15
2.1.2 Tabelle 2: Software	18
2.1.3 Tabelle 3: Chemikalien.....	18
2.1.4 Tabelle 4: Lösungen.....	22
2.1.5 Tabelle 5: Zellkultur	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Schichtentwicklung.....	25
2.2.1.1 Reinigung der Sensoroberfläche	25
2.2.1.2 Präparation der Schwingquarze.....	25
2.2.1.3 Beschichtung der Sensoroberfläche	25
2.2.1.4 Immobilisierung von CD36 auf dem Quarz	26
2.2.1.5 Immobilisierung von CSA auf dem Quarz	27
2.2.2 Kultivierung der amelanotischen Melanomzellen	27
2.2.2.1 C32-Zellen	27

2.2.2.2 Auftauen und Ansetzen der Kultur	28
2.2.2.3 Splitten der Kultur	28
2.2.2.4 Zellaufschluss durch fraktionelle Zentrifugation	29
2.2.3 Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i>	29
2.2.3.1 Parasiten	29
2.2.3.2 Auftauen von Parasiten und Ansetzen der Kultur	30
2.2.3.3 Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i>	30
2.2.3.4 Giemsa-Färbung zur Bestimmung der Parasitämie	30
2.2.3.5 Synchronisierung der Kultur	31
2.2.3.6 Akkumulation später asexueller Stadien über magnetic cell sorting (MACS)	32
2.2.3.7 Selektion des CD36-bindenden Phänotyps	32
2.2.3.8 Selektion des CSA-bindenden Phänotyps	33
2.2.3.9 Einfrieren der Parasitenkultur	33
2.2.4 QCM-Messungen zur Überprüfung der Schichten	34
2.2.4.1 Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze	34
2.2.4.2 Langzeitankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze.....	34
2.2.4.3 Messungen zur Überprüfung der Ankopplung des biotinylierten CSA auf NAV	35
2.2.5 Ankopplungsmessungen mit Parasiten	36
2.2.5.1 Vorbereitung des Mediums	36
2.2.5.2 Vorbereitung der Messanlage.....	37
2.2.5.3 Vorbereitung der Proben	37
2.2.5.4 Start der Messung	37
2.2.5.5 Ende der Messung.....	38
2.2.5.6 Auswertung und Dokumentation.....	38

3. Ergebnisse	40
3.1 Immobilisierung von Erythrozyten auf den Poly-L-Lysin beschichteten Quarz	40
3.1.1 Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze	41
3.1.1.1 Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze ohne „stop flow“	42
3.1.1.2 Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze mit „stop flow“	43
3.2 Langzeitankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze	46
3.3 Nachweis der Immobilisierung von CSA auf den Quarz	51
3.3.1 Messungen zur Überprüfung der Ankopplung des biotinylierten CSA auf NAV	51
3.3.1.1 Ankopplungsmessungen von nicht biotinyliertem CSA an NAV-Quarze	52
3.3.1.2 Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze	54
3.3.1.3 Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze mit anschließender Ankopplung von NAV	57
3.3.1.4 Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze mit anschließender erneuter Ankopplung von biotinyliertem CSA	60
3.3.1.5 Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze mit anschließender Ankopplung von biotinyliertem BSA	60
3.4 Ankopplungsmessungen von <i>Plasmodium falciparum</i> -infizierten Erythrozyten bzw. Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen	63
3.4.1 Negativkontrollen und Positivkontrolle zu den Ankopplungsmessungen von <i>Plasmodium falciparum</i> -infizierten Erythrozyten bzw. Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen	63
3.4.1.1 Externe Ankopplungen	63
3.4.1.2 Ankopplungsmessungen zur Negativkontrolle	71
3.4.2 Nachweis der Zytoadhäsion von 3D7 und FCR3-CD36 an CD36	83
3.4.2.1 Ergebnisse der Langzeitankopplungsmessungen	88

3.4.3 Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten an einen PLL/C32-Membranen beschichteten Quarz in der Mikrofluidik	94
4. Diskussion	98
4.1 Immobilisierung von Erythrozyten auf den beschichteten Quarz	98
4.2 Langzeitankopplungsmessungen von Blut an PLL-Quarze	98
4.3 Nachweis der Immobilisierung der Rezeptoren auf den Quarz.....	98
4.4 Ankopplungsmessungen von Plasmodium falciparum-infizierten Erythrozyten bzw. Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen.....	98
5. Zusammenfassung.....	113
6. Literaturverzeichnis	115
7. Danksagung	121
8. Lebenslauf	123

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bCSA	biotinyliertes CSA
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CSA	Chondroitin-Sulfat A
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindolylactate
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii (lat. = und andere)
FBS	fötales Kälberserum
g	Gramm
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hz	Hertz
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IKET	Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
m	Meter
MACS	Magnetic Cell Sorting
N ₂	Stickstoff

NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NAV	NeutrAvidin
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PfEMP 1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PLL	Poly-L-Lysin
QCM	Quarzmikrowaage (Quartz Crystal Microbalance)
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
SEM	Rasterelektronenmikroskop (Scanning Electron Microscope)
SiO ₂	Siliziumdioxid
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tris HCl	Trizma Hydrochlorid
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden zunächst die zum Verständnis dieser Arbeit benötigten theoretischen Grundlagen erläutert. Auf eine allgemeine Übersicht über Erkrankungsbild und Epidemiologie folgt eine Erläuterung der biologischen Grundlagen der Malaria. Hierbei wird detaillierter auf den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* und die Pathogenese der Malaria tropica eingegangen. Das letzte Unterkapitel gibt eine Übersicht über die Schwingquarzsensoren.

1.1 Allgemeines zur Malaria

Die Malaria – auch als Sumpf- oder Wechselfieber bekannt – ist eine durch Plasmodien verursachte Protozoeninfektion [26]. Der Begriff stammt aus dem Italienischen („mala aria“ = „schlechte Luft“) und geht auf die lange bestehende Vorstellung zurück, die Krankheit würde durch die Ausdünstungen (Miasmen) der Sümpfe hervorgerufen [14]. Die natürliche Übertragung der Plasmodien von Mensch zu Mensch erfolgt tatsächlich durch blut saugende, weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles*, deren bevorzugte Brutgebiete sonnige Dauergewässer sind [23]. Die nachtaktiven Weibchen stechen in der Regel während der Dämmerung oder nachts. Sie benötigen diese Blutmahlzeit zur Entwicklung der Eier. Tagsüber halten sie sich meist in ihrer typischen Ruhestellung in menschlichen Unterkünften auf [26]. Eine Infektion auf direktem parenteralem Wege ist aber auch durch Transfusion oder Transplantation möglich. Sehr selten kann es bei Laborunfällen (z.B. Nadelstichverletzungen) durch Injektion parasitenhaltigen Blutes zur Ansteckung kommen. Zur kongenitalen Malaria kommt es durch diaplazentare Übertragung von der Mutter auf das ungeborene Kind. Außerhalb ihrer Verbreitungsgebiete lösen gelegentlich durch Flugreisen eingeschleppte Moskitos die so genannte Flughafenmalaria aus [29]. Die geographische Verbreitung der Malaria entspricht der Verteilung der als Vektor geeigneten Anophelesarten [26]. Es ist allerdings zu befürchten, dass es als Folge des Klimawandels zur weiteren geographischen Ausbreitung kommen könnte. Die Endemiegebiete der Malaria sind in der unten stehenden Weltkarte (s. Abbildung 1) dargestellt.

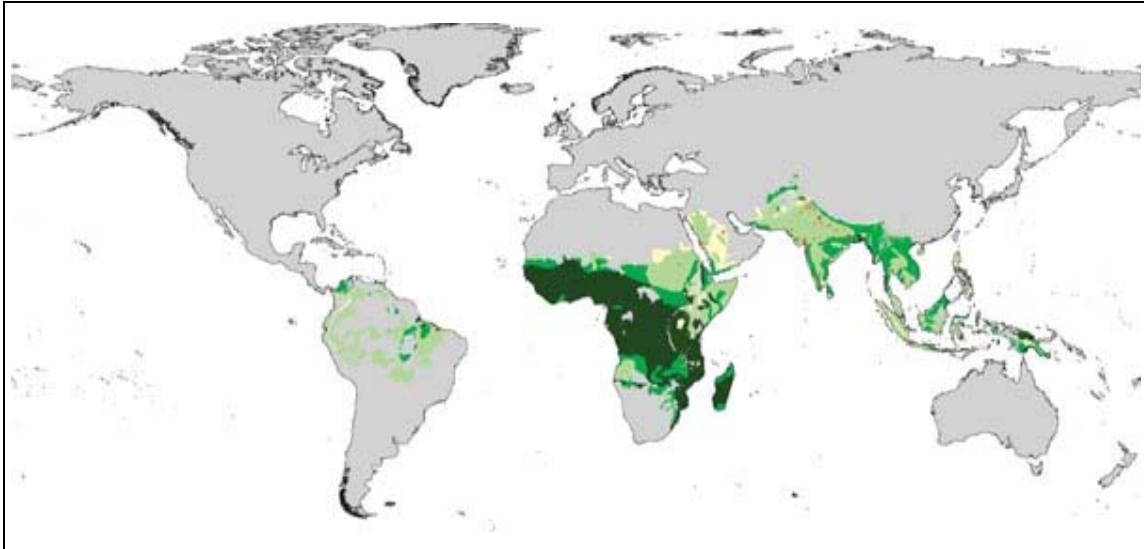


Abbildung 1: Weltweite Verbreitung von *Plasmodium falciparum*: hellgrün: hypoendemische Malariagebiete (Infektionsrate < 10%), mittelgrün: mesoendemische Malariagebiete (Infektionsrate 11% - 50%), dunkelgrün: hyper- und holoendemische Malariagebiete (Infektionsrate \geq 50%), gelb: nicht klassifiziert, grau: Gebiete ohne Übertragungsrisiko [44].

Die Malaria ist weltweit eine der häufigsten parasitären Erkrankungen. Sie tritt in tropischen und subtropischen Regionen aller Kontinente mit Ausnahme Australiens in etwa 100 Ländern endemisch auf. Etwa 40% der Weltbevölkerung lebt in Gebieten, in denen die Malaria übertragen wird. Dort erkranken nach Schätzungen der WHO 300 bis 500 Millionen Menschen pro Jahr. Weltweit sterben jährlich 1,5 bis 2,7 Millionen Menschen an der Tropenkrankheit, vorwiegend betroffen sind Kinder [23, 29]. 80 bis 90% der Krankheits- und Todesfälle durch Malaria auf der Erde finden sich in den tropischen Gebieten von Afrika [23]. In Deutschland wurden im Jahr 2004 entsprechend der Meldepflicht nach IfSG dem Robert-Koch-Institut 707 Malaria-Erkrankungen gemeldet, dies sind 113 Fälle weniger als im Vorjahr. Der größte Teil davon (87%) wurde aus afrikanischen Ländern eingeschleppt. *Plasmodium falciparum* wurde dabei mit einem Anteil von 77% am häufigsten diagnostiziert [23]. In der Bundesrepublik sterben etwa 20 Menschen pro Jahr an Malaria [29].

Die vier humanpathogenen Plasmodienarten verursachen verschiedenste klinische Manifestationen und weisen auch wesentliche epidemiologische Unterschiede auf [26]. Die durch *Plasmodium falciparum* verursachte Malaria

tropica ist aufgrund des häufig tödlichen Verlaufs die gefährlichste Malariaform und deshalb eine der am meisten gefürchteten Tropenkrankheiten überhaupt [29]. Die Letalität der unbehandelten Malaria tropica schwankt je nach Immunitätslage und Lebensalter zwischen weniger als 1% bis über 20% und steigt bei einer Parasitämie von mehr als 10% auf 60% an [28]. Das klinische Krankheitsbild der Malaria tropica ist vielgestaltig. Erste Anzeichen einer unkomplizierten Malaria tropica sind unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit, Kopf- und Gliederschmerzen, gelegentlich auch Husten sowie unregelmäßige fieberhafte Temperaturen. Der Fiebertyp kann nicht als diagnostisches Kriterium herangezogen werden, da nur selten ein rhythmisches Wechselfieber auftritt. Ferner kann es zu einer Splenomegalie mit akuter Gefahr der Milzruptur, einer Hepatomegalie und zu Durchfällen kommen. Setzt nicht rasch eine antiparasitäre Therapie ein, kann sich das klinische Bild jederzeit verschlechtern – es kommt zur komplizierten Malaria tropica. Dies ist nach Definition der WHO der Fall, wenn eines oder mehrere der im Folgenden genannten Symptome auftreten. Die zerebrale Malaria geht als bedrohlichste Komplikation der Malaria tropica mit Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma einher. Sie ist oft mit anderen neurologischen Komplikationen wie z.B. Krampfanfällen verbunden und kann in jedem Stadium akut auftreten. Vor allem bei Schwangeren und Kindern zeigt sich schon frühzeitig eine Hypoglykämie, die auch per se zum Koma führen kann. Die schwere hämolytische Anämie ist eine weitere lebensbedrohliche Komplikation. Ferner kann es zu Funktionsstörungen der Niere – beispielsweise zur als „Schwarzwasserfieber“ bezeichneten Hämoglobinurie – bis hin zum akuten Nierenversagen, zum Lungenödem oder auch zu schweren, gastroenterologischen Verlaufsformen kommen. Des Weiteren bedrohen Elektrolyt- und Blutgasverschiebungen, Dehydratation und Hypovolämie als häufige Ursache des Kreislaufschocks, disseminierte intravasale Gerinnung, Hyperpyrexie von mehr als 40°C und Hyperparasitämie von mehr als 5% parasitenbefallener Erythrozyten das Leben der Patienten. Besonders in der Schwangerschaft führt die Malaria tropica zu einer deutlich erhöhten maternalen und fetalen Morbidität und Letalität [22, 23, 26, 29].

1.2 *Plasmodium falciparum* – der Erreger und sein Lebenszyklus

Unter den Protozoen der Gattung *Plasmodium* stellt *Plasmodium falciparum* als Erreger der Malaria tropica neben *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* (beide Erreger der Malaria tertiana) und *Plasmodium malariae* (Erreger der Malaria quartana) den klinisch bedeutsamsten und bedrohlichsten der vier humanpathogenen Malariaerreger dar. Im Laufe des Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* vollzieht sich ein Wirtswechsel vom Zwischenwirt Mensch zum Endwirt, einer Stechmücke der Gattung *Anopheles*. Im menschlichen Organismus findet die Vermehrung der Plasmodien (Schizogonie) statt. Sie umfasst die ungeschlechtliche Vermehrung in den Hepatozyten (exoerythrozytäre Phase) und in den Erythrozyten (erythrozytäre Phase). Sowohl die sexuelle Vermehrung der Erreger (Gamogonie) als auch die ungeschlechtliche Sporogonie findet in den blutsaugenden Mücken der Familie Culicidae statt [14]. Dieser Entwicklungszyklus ist streng wirtsspezifisch, mit Ausnahme weniger Affenarten gibt es kein tierisches Erregerreservoir [32].

Die Illustration (s. Abbildung 2) gibt einen Überblick über den recht komplexen Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*. Die asexuelle Phase des Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* beginnt mit dem Stich der weiblichen Anophelesmücke. Mit ihrem Speichel, der Gerinnungshemmer enthält, sondert sie bei ihrer Blutmahlzeit zwischen 10 und 100 Sporozoiten in die menschliche Blutbahn ab [32]. Nach spätestens 70 Minuten verlassen die Sporozoiten die Blutbahn um in Leberparenchymzellen einzudringen, wo sie sich zu Trophozoiten weiterentwickeln [13]. In den Hepatozyten wachsen sie in einer parasitophoren Vakuole heran und durchlaufen dabei die so genannte exoerythrozytäre Schizogonie, die zur Bildung von etwa 30.000 Merozoiten führt. Bei *Plasmodium falciparum* beträgt die Dauer der exoerythrozytären Schizogonie zwischen 6 und 16 Tagen, danach werden die Merozoiten durch Ruptur der Leberzellen in die Blutbahn freigesetzt. Durch Einbuchtung der Erythrozytenmembran, unterstützt durch lytische Fermente, kommt es zum Eindringen der Merozoiten in die Erythrozyten [14]. In den befallenen

Erythrozyten entwickeln sich die Parasiten zunächst zu Siegelringstadien, die zu Trophozoiten heranreifen, aus welchen schließlich die Schizonten als letzte erythrozytäre Entwicklungsstufe hervorgehen. Eine Besonderheit von *Plasmodium falciparum* ist, dass diese Art in der Lage ist, Erythrozyten aller Altersstufen zu befallen, weswegen nahezu 50 Prozent der Blutkörperchen parasitiert sein können. Dies kann zu einer ausgeprägten Hämolyse (Zerfall von Erythrozyten) führen [29]. Jede Schizogonie bringt 8 bis 16 Merozoiten hervor, die neue Erythrozyten befallen können. Ein weiteres Charakteristikum dieser Plasmodienart ist zudem, dass die erythrozytäre Schizogonie wiederholt, aber nicht synchronisiert wird. Lediglich eine geringe Anzahl Merozoiten entwickeln sich zu Geschlechtsformen (Gametozyten). Im Blut des Infizierten finden sich dann sowohl Schizogoniestadien als auch Gametozyten. Die sichelartig gebogene Form der Gametozyten gibt dieser Form ihren Namen (falx/falcis = Sichel, parere = hervorbringen, gebären) [14].

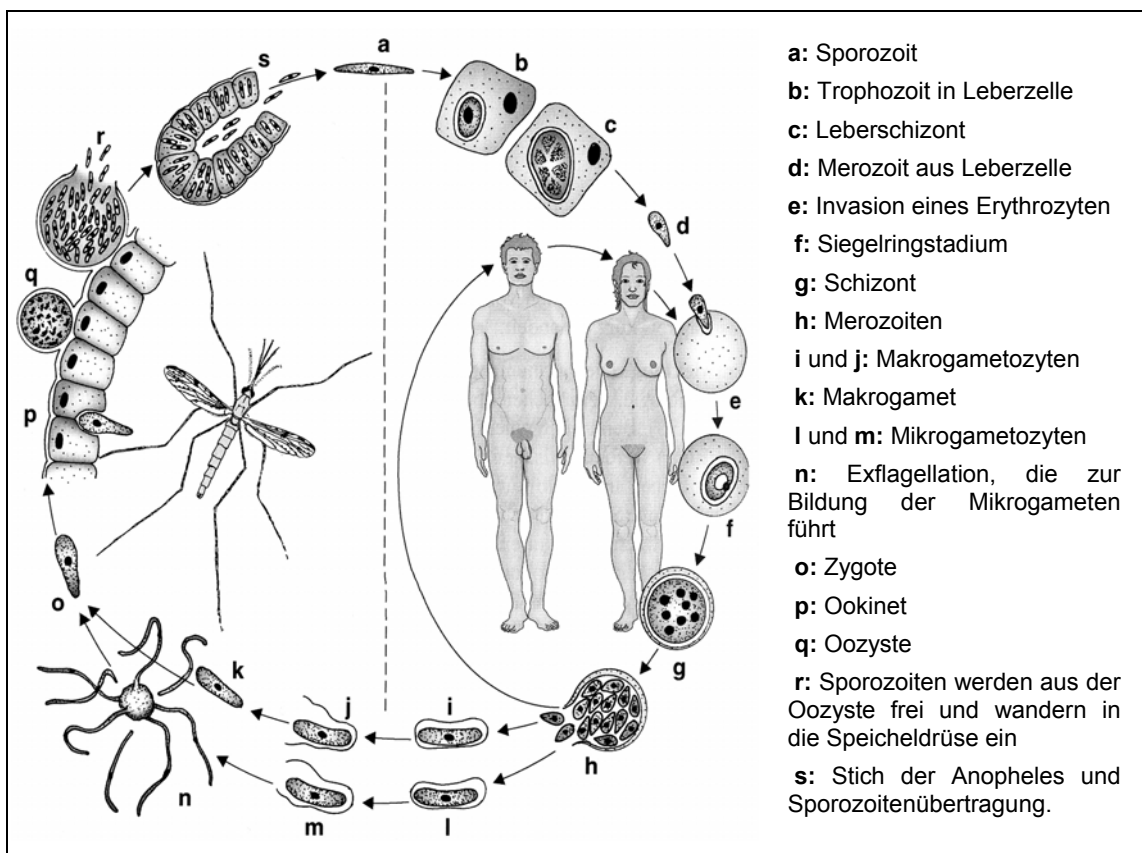


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* [30].

An dieser Stelle des Lebenszyklus findet der Wirtswechsel vom Menschen auf die Stechmücke statt. Die sexuelle Phase beginnt mit der Aufnahme der Gametozyten durch die Überträgermücke bei ihrer Blutmahlzeit. Im Darm der Anopheles entwickeln sich diese zu Gameten. Beim männlichen Mikrogametozyten läuft dieser als „Exflagellation“ bezeichnete Prozess innerhalb weniger Minuten ab: Jeder Mikrogametozyt bildet acht Plasmaprotuberanzen aus, in die je ein Kern einwandert. Danach schnüren sich Mikrogametozyten ab und befruchten die weiblichen Makrogametozyten. Bei *Plasmodium falciparum* beträgt das Zahlenverhältnis Mikrogametozyten zu Makrogametozyten 4:1 [13]. Die aus der Befruchtung entstandene Zygote nimmt eine längliche Form an, wird beweglich und wird nun als Ookinet bezeichnet [13]. Der Ookinet durchdringt das Darmepithel der Mücke und reift zwischen Basallamina und Epithel zur Oozyste, in der sich durch asexuelle Vermehrung tausende von Sporozoiten entwickeln [19]. Die als ungeschlechtliche Sporogonie bezeichnete Entwicklung der Sporozoiten wird durch höhere Umgebungstemperaturen begünstigt, sie dauert eine bis mehrere Wochen [29]. Platzt die so entstandene Sporozyste, gelangen die Sporozoiten in die Haemolymphe, über die sie zur Speicheldrüse wandern und in die Speicheldrüsenzellen eindringen. Bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke werden die Sporozoiten mit dem Speichel auf den Wirt übertragen, der Kreislauf schließt sich [14]. Der Speichel kann eine enorm hohe Anzahl Sporozoiten enthalten, da eine Anopheles gut mit einer zweistelligen Zahl von Plasmodium-Oozysten belastet sein kann. Die Sporozoiten überleben 40 Tage im Mückenspeichel. Ein einziges Anopheles-Weibchen kann somit mit ihrem Stich mehrere Menschen infizieren [13].

Den Befall eines Erythrozyten sowie die verschiedenen Entwicklungsstadien von *Plasmodium falciparum*, wie sie mikroskopisch in einem dünnen Blutaussstrich gesehen werden können, zeigt Abbildung 3.

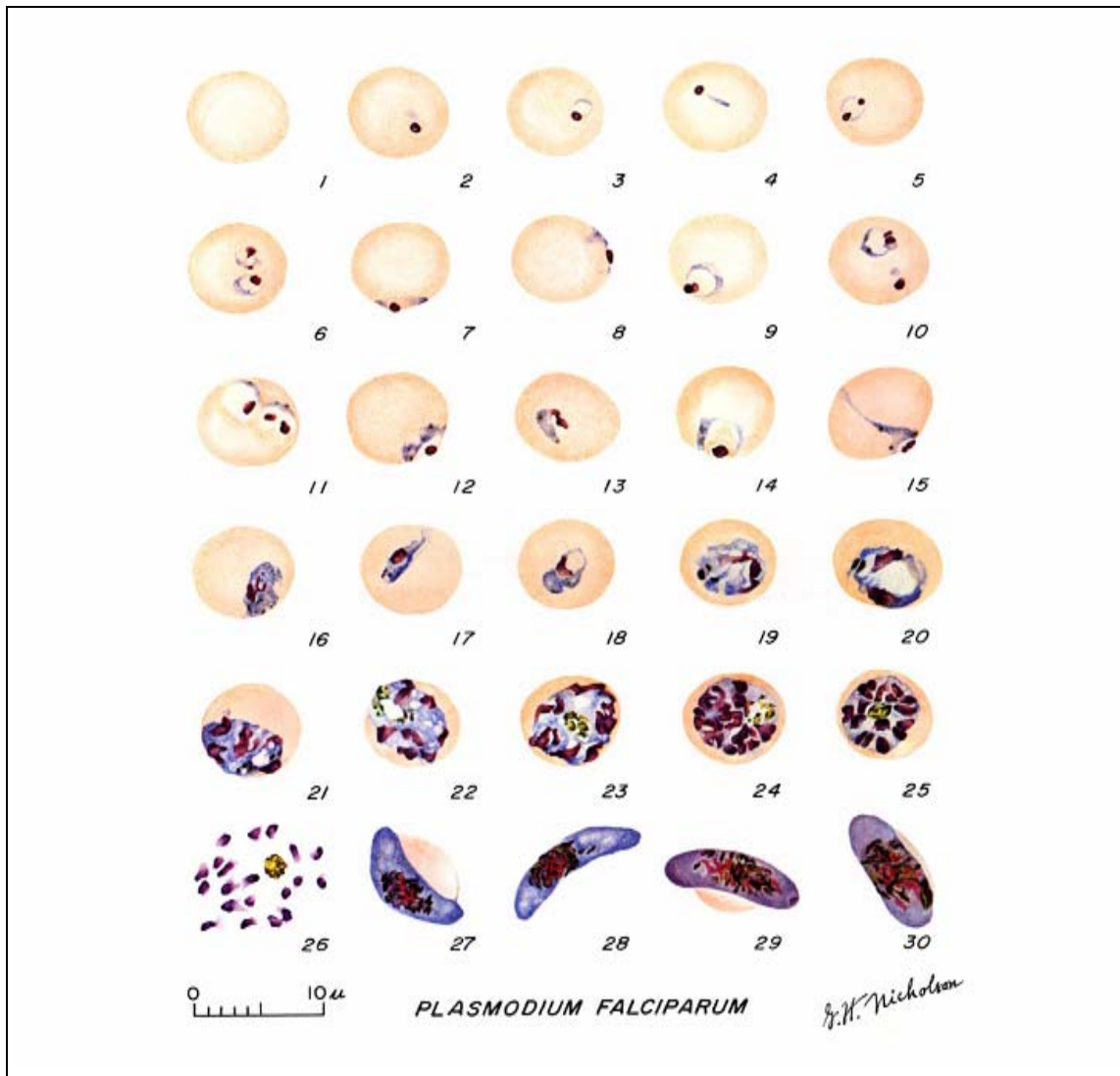


Abbildung 3: Parasitenstadien von *Plasmodium falciparum* im Blut: Bild 1: Erythrozyt, Bilder 2-18: Trophozoiten (Bilder 2-10 entsprechen Siegelringstadien), Bilder 19-26: Schizonten (Bild 26 ist ein rupturierter Schizont), Bilder 27,28: Makrogametozyten, Bilder 29,30: Mikrogametozyten [9].

1.3 Pathogenese der Malaria tropica

Der wesentliche pathogenetische Unterschied zwischen der Malaria tropica und den übrigen Malariaformen ist die Fähigkeit, *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an vaskuläres Endothel zu adhären [4, 40]. Diese Arbeit befasst sich mit dem Phänomen der über das *Plasmodium-falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP 1) vermittelten Zytoadhäsion später asexueller Blutstadien von *Plasmodium falciparum*. Die mit heranreifenden späten

Trophozoiten und Schizonten parasitierten Erythrozyten binden über Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen an das Endothel von Kapillaren und postkapillären Venolen [12]. Dieses Phänomen, bei dem die infizierten Erythrozyten erst an der Kapillarwand entlang rollen, um sich dann ans Endothel anzuhängen, wird als Sequestration bezeichnet [10, 18]. Bei Malaria tropica-Infizierten findet man daher auch bei hoher Parasitämie nur Ringformen im peripheren Blut, reife Stadien sind nicht nachweisbar [17, 36, 39, 47]. Befallene Erythrozyten binden auch an nicht-infizierte Erythrozyten, dadurch kommt es zur Rosettenbildung [2, 46]. Sowohl Sequestration als auch Rosettenbildung sind wesentliche Pathogenitätsfaktoren, die zu mikrovaskulären Obstruktionen führen (s. Abbildung 4). Folge sind Durchblutungsstörungen und damit einhergehend eine mangelnde Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, insbesondere im Gehirn, aber auch in allen anderen Organen, welche ursächlich für schwerwiegende Komplikationen der Malaria tropica sind [18, 26].

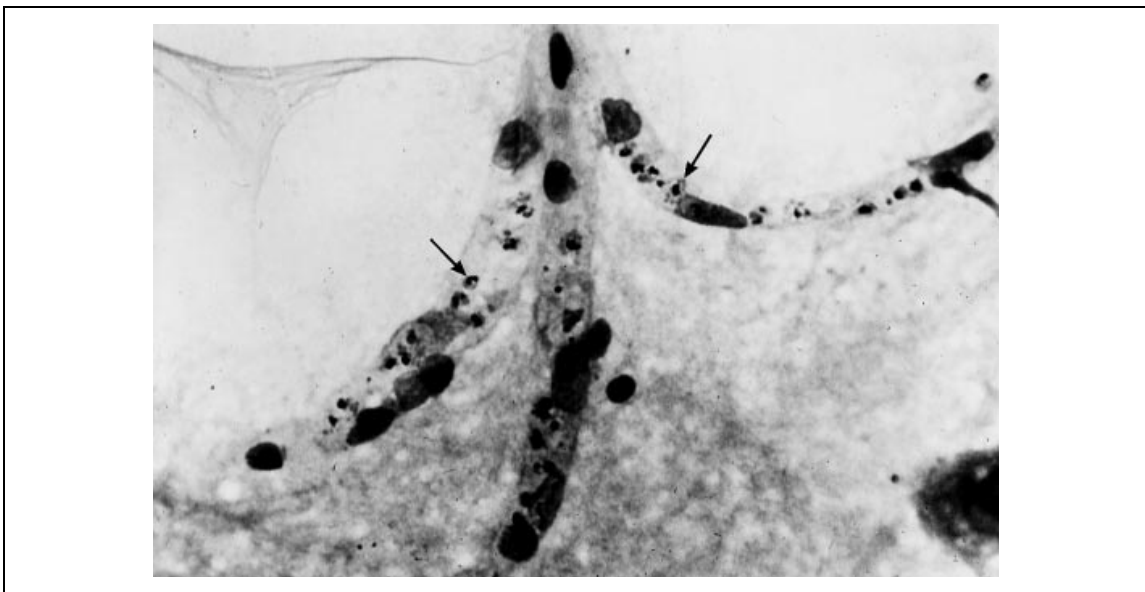


Abbildung 4: Hirnkapillaren mit Sequestration *Plasmodium falciparum*-parasitierter Erythrozyten (Pfeile) [18].

Plasmodium falciparum induziert die Expression von *Plasmodium-falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP 1) an der Oberfläche parasitierter Erythrozyten [7, 15]. PfEMP 1 ist eine Familie von Adhäsionsproteinen von 200 bis 350kDa, die als Liganden im Zytoadhäsionsprozess fungieren. Sie liegen bei den späten Blutstadien als kleine, knopfähnliche Vorwölbungen (engl.:

knobs) in der Wirtszellmembran [20, 47]. Die 30 bis 40nm hohen und 90 bis 100nm langen knobs (s. Abbildung 5) stechen in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen als elektronendichte Strukturen hervor und verteilen sich ebenemäßig über die Erythrozytenmembran [1, 31].

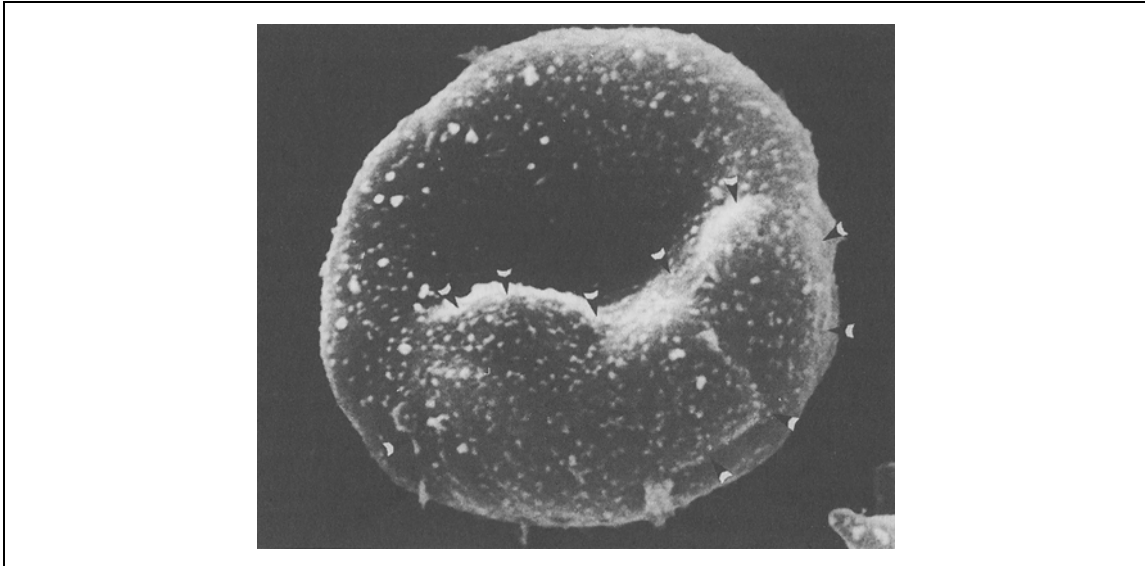


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische (SEM) Aufnahme eines roten Blutkörperchens, das einen Schizonten von *Plasmodium falciparum* enthält. Auf der Oberfläche dieses befallenen Erythrozyten erscheinen zahlreiche „knobs“ als weiße Pusteln. Vergrößerung 7000x [32].

Der Rückzug aus dem zirkulierenden Blut bietet den Parasiten zwei Überlebensvorteile. Zum einen können sie sich in der mikroaerophilen venösen Umgebung besser entwickeln, zum anderen müssen befallene, veränderte Erythrozyten die Milz nicht passieren und entkommen so einer Elimination und damit ihrer eigenen Zerstörung [18, 47]. Allerdings wird der Parasit nun vom Immunsystem des Wirts erkannt, was in der Folge eine Immunantwort gegen PfEMP 1 auslöst. Die Fähigkeit zur Variation der Adhäsionsproteine ermöglicht den Parasiten jedoch, der Vernichtung durch das Immunsystem zu entgehen und eine persistierende Infektion im Wirtsorganismus aufrecht zu erhalten. *Plasmodium falciparum* besitzt etwa 60 verschiedene Gene der var-Familie, die für verschiedene Varianten des PfEMP 1 kodieren. Der Parasit kann nach erneuter Erythrozyteninvasion spontan auf eine andere antigene Variante umschalten [41, 44]. Diese hohe Variabilität von PfEMP 1 ermöglicht die Zytoadhärenz von parasitierten Erythrozyten an verschiedenste Rezeptoren der

Endothelzellen. Als Hauptrezeptor ist CD36 zu nennen [[17, 34], ein 88kDa großes Glykoprotein, welches auf Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, einigen Endothelzelltypen und bestimmten Melanomzellen, darunter auch die C32-Melanomzelllinie, exprimiert wird. Chondroitin-Sulfat A (CSA) gilt als spezifischer Rezeptor für die Sequestration in der Plazenta [4]. Als Hauptvirulenzfaktor der plazentaren Malaria führt der durch den Rezeptor CSA vermittelte, pathogene Adhäsionsvorgang durch gravierende mikrovaskuläre Obstruktionen zu erheblicher kindlicher und mütterlicher Morbidität und Mortalität [33]. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Interaktion von PfEMP1 mit den Rezeptoren CD36 und CSA untersucht. Weitere Adhäsionsrezeptoren sind beispielsweise Thrombospondin, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) [3], VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) [11], E-Selektin und P-Selektin [33].

1.4 Schwingquarzsensork

Schwingquarze bestehen aus piezoelektrischem Material, genauer aus einkristallinem alpha-Quarz (SiO_2). Der piezoelektrische Effekt wurde 1880 durch die Gebrüder Curie entdeckt und beschreibt das Phänomen bei piezoelektrischen Materialien, bei denen durch Ausübung von Zug, Druck oder Torsion an deren Oberfläche elektrische Ladung erzeugt wird. Der reziproke piezoelektrische Effekt beschreibt im Gegenzug das Auftreten einer mechanischen Deformation des Kristalls durch eine aufgebrachte elektrische Ladung bzw. ein an den Kristall gelegtes elektrisches Feld. Durch den piezoelektrischen Charakter der Quarze können diese durch hochfrequente elektrische Wechselspannungen zu mechanischen Schwingungen im Ultraschallbereich angeregt werden [16, 21].

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Schwingquarzen, die aus einer alpha-Quarzplatte und zwei an den Stirnflächen angebrachten Elektroden bestehen, wird durch eine elektrische Wechselspannung eine elastische Volumenwelle angeregt. Die elektrische Wechselspannungsfrequenz wird mittels einer Oszillatorschaltung der mechanischen Resonanzfrequenz nachgeführt und über

einen Frequenzzähler ausgelesen. Dabei macht man sich den linearen Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung und der Massenbeladung zu Nutze. Bei der Anlagerung kleinster Massen an die Schwingquarzoberfläche ändert sich also die Resonanzfrequenz der Schwingung deutlich. Dadurch wird es möglich, Massen im Nanogramm-Bereich zu erfassen, weshalb der Schwingquarz auch „Mikro-Waage“ (Quartz Crystal Microbalance = QCM) genannt wird. Ebenso können verschiedenste molekulare Interaktionen untersucht werden [16, 21, 43].

Das vollautomatisierte Analysegerät *Fidget Type Fg T1* (s. Abbildung 6) arbeitet nach dem Prinzip der QCM-Technik. Es besteht aus einer Sensorplattform, die zwei massensensitive Schwingquarzsensoren umfasst, an die ein Steuergerät und ein Computer angeschlossen sind. Die aus Aluminium gefertigte Sensoreinheit ist über Peltier-Elemente vollständig thermostatisierbar, somit können die Messungen auch unter physiologischen Bedingungen bei 37°C durchgeführt werden. Die Anlage besitzt zwei Durchflusszellen aus biokompatiblen Teflon, was die parallele Analyse zweier Proben ermöglicht. Die aus einem 2- und einem 8-Wege-Ventil sowie einem 2-Wege-Hahn und zwei Peristaltikpumpen bestehende Fließ-Injektions-Anlage gewährleistet einen kontinuierlichen Probendurchfluss. Über einen Bajonettverschluss lassen sich die Quarze leicht in die Messkammer einbauen, wo sie in einer speziellen Halterung in Position gebracht werden. Die Elektronik versetzt die Quarze in Schwingung, ein eigens entwickeltes Computerprogramm zeichnet die Frequenzänderungen des Schwingquarzes auf und stellt den Kurvenverlauf graphisch dar. Über das Computerprogramm werden die Fließ-Injektions-Anlage sowie die Ansteuerung des Schwingquarzes und die Thermostatisierung automatisch gesteuert [16].

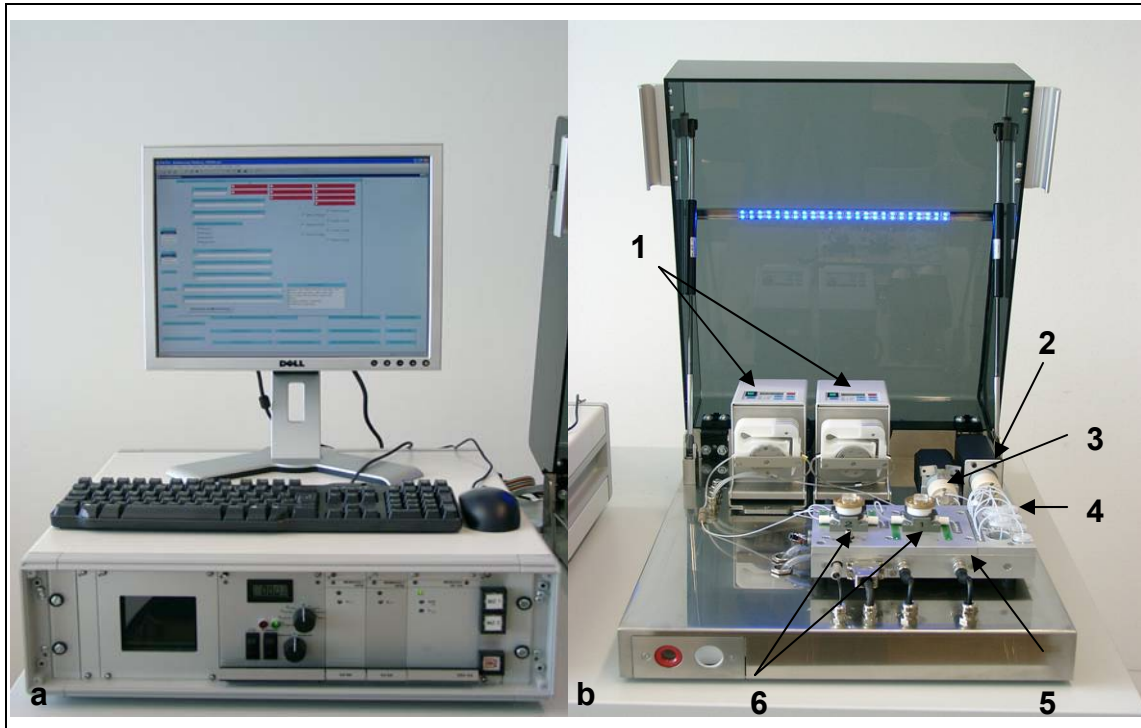


Abbildung 6: Fidget Type Fg T1: a: Steuereinheit und Computer b: sensorischer Teil der Messanlage: Peristaltikpumpen (1), 2-Wege- (2), 8-Wege-Ventil (3), Halterungen für Probengefäße (4), thermostatisierbarer Sensorblock (5), zwei fluidische Messzellen (6).

1.5 Stand der Wissenschaft

Auf dem Gebiet der Malariaforschung war seit längerem bekannt, dass die Pathogenese der *Malaria tropica* und die besondere Gefahr der damit verbundenen Krankheitserscheinungen auf der Fähigkeit *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten beruhte, über Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen an vaskuläres Endothel zu adhären [12]. *Plasmodium falciparum* induziert die Expression von PfEMP 1 an der Oberfläche parasitierter Erythrozyten [15]. Die hohe genetische Variabilität dieses Adhäsionsproteins ermöglicht die Anheftung an verschiedenste Rezeptoren der Endothelzellen. Als Hauptrezeptor für die Adhärenz gilt der in dieser Arbeit für die Ankopplungsmessungen von *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten verwendete Rezeptor CD36 [17]. Sowohl die Bindungsstärke, als auch der Zeitpunkt der Bindung infizierter Erythrozyten an die Endothelien konnten jedoch bislang nicht hinreichend erforscht werden. Der Einsatz der Schwingquarzsensoren verschaffte auf diesem Gebiet völlig neuartige

Möglichkeiten. Die innovative QCM-Technologie wurde innerhalb der Biosensorikgruppe des IKET bereits für verschiedene Anwendungen in der Blutanalytik etabliert. Der entscheidende Vorteil des Analysegerätes *Fidget Type Fg T1* war die „Online-Messung“, welche Massenänderungen über den Schwingquarzsensordirekt detektierte, so dass die Messdaten eine quantitative Aussage in Echtzeit über die Adhäsionsvorgänge auf dem Schwingquarz lieferten. In der Arbeitsgruppe für Biosensorik des IKET Tübingen wurde die QCM-Technologie nun weltweit erstmals für die Malariaforschung eingesetzt. Die Nutzung der QCM-Technologie zur Erforschung des pathogenen Zytoadhäsionsvorganges der *Malaria tropica* war somit gleichermaßen innovativ und zukunftsweisend. Durch die präzise Aufklärung dieser Adhärenzvorgänge, die als Hauptvirulenzfaktor aller *Plasmodium falciparum*-Infektionen angesehen werden, eröffnete sich eine Reihe von Angriffspunkten für den Einsatz von Medikamenten und die Entwicklung neuer Therapien. Besonders im Hinblick auf die erheblichen Resistenzbildungen von *Plasmodium falciparum* könnte sich daraus eine völlig neue Dimension in der Forschung gegen die tödliche Tropenkrankheit entwickeln.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung des pathogenen Adhäsionsvorganges der *Malaria tropica*. Mittels der in der Arbeitsgruppe für Biosensorik für Vollblut etablierten Schwingquarzsensordik (QCM) sollte die Zytoadhäsion *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an Endothelien untersucht werden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei die Interaktion von PfEMP 1 mit den Rezeptoren CD36 und CSA. In einem ersten Schritt erfolgte die Entwicklung geeigneter Schichtsysteme zur Immobilisierung der Rezeptoren CD36 und CSA auf dem Schwingquarzsensord. Im nächsten Schritt erfolgte die Prüfung der Spezifität der Bindung über geeignete Kontrollversuche. Ferner wurden die Kulturbedingungen für mehrstündige Experimente in der sensorischen Messzelle optimiert. Unter Einsatz der Sensorplattform *Fidget Type Fg T1* wurden anschließend Messungen zur Untersuchung der Bindung infizierter Erythrozyten an Endothelzellen

durchgeführt. Dazu wurden *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrozyten in die Messzelle geleitet, was bewirken sollte, dass bei Bindung an den auf dem Quarz immobilisierten Rezeptoren ein Abfall der Resonanzfrequenz detektiert wird. Das Experiment konnte erstmals Aufschluss darüber geben, zu welchem Zeitpunkt infizierte Erythrozyten an ihrer Oberfläche das *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP 1) exprimieren. In der Etablierung der Messtechnik für dieses Schlüsselereignis der Pathogenese der Malaria tropica liegt großes Potential zur Erforschung der Zytoadhäsionsvorgänge als Angriffspunkt im Kampf gegen Malaria.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind die für diese Arbeit verwendeten Labormaterialien und Geräte, die Software sowie Chemikalien und Lösungen aufgelistet.

2.1.1 Tabelle 1: Labormaterialien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
AT-cut Quarze	KVG, Neckarbischofsheim/D
Auflichtmikroskop Axioskop 2 MAT	Carl Zeiss AG, Jena/D
BD Falcon 15ml Polystyrene Conical Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes/USA
Biotin Labeling Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D
Brutschrank HeraCell 150	Heraeus Instruments, Hanau/D
Chamber slides	Thermo Fisher Scientific Nunc GmbH & Co.KG, Langenselbold/D
Costar Disposable Serological Pipette	Corning Incorporated, New York/USA
CO ₂ -Inkubator MCO-18AIC	Sanyo E&E EuropeBV, Etten Leur/NL
Cryos	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen/D
Deckgläser, 18x18mm #1	Menzel-Gläser, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig/D
Desalting column, HiTrap TM Desalting	GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire/UK

Digitalkamera Casio QV 5700 für Mikroskop Axioskop 2 MAT	Casio Europe GmbH, Hamburg/D
Einmalspritze Injekt 20ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen/D
Falcon Blue Max, 50ml Polypropylene Conical Tube	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes/USA
Feinwaage AS200	OHAUS, Pine Brook/USA
Feinwaage Kern ABJ	Kern und Sohn GmbH, Balingen/D
Filterpapiere	Macherey–Nagel GmbH & Co.KG, Düren/D
Inkubator Incucell	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Gräfelfing/D
Inkubator Steri-cult 200	Forma Scientific Inc., Marietta/USA
Lötkolben WS 80	Weller GmbH, Besigheim/D
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach/D
MACS Separation Columns, 25 LD Columns	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach/D
Magnetrührer Variomag	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim/D
Mikroskop Leica DM1000	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar/D
Mikroskop Axio Imager	Carl Zeiss AG, Jena/D

Millex GS Syringe Driven Filter Unit	Millipore, Carrigtwohill/IE
Objektträger	R. Langenbrink, Emmendingen/D
pH-Meter, pH 111	Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein/D
Pinzette, Dumont # 5	World Precision Instruments Inc., Sarasota/USA
Pinzette 103ACA	Cooper Tools GmbH, Besigheim/D
Pipetten, Eppendorf research	Eppendorf AG, Hamburg/D
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt/D
Präzisionswischtücher Kimtech Science	Kimberley-Clark, Surrey/UK
QCM-Messanlage Fidget Type Fg T1	Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. F.K. Gehring, IKET Tübingen/D
Quarzhalterung: Haltering aus Teflon, Innendurchmesser: 9 mm, Außendurchmesser: 16 mm	Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. F.K. Gehring, IKET Tübingen/D
Sterilbank HERA-safe	Heraeus Instruments, Hanau/D
Ultrazentrifuge, Servall Discovery 90SE	Kendro Laboratory Products, Langenselbold/D
Vortex VM4 CAT	neo-Lab, Heidelberg/D
Zellhomogenisator	Sartorius AG, Göttingen/D

Zellkulturflaschen CELLSTAR Tissue Culture Flasks	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen/D
Zentrifuge ROTINA 46R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus Instruments, Hanau/D

2.1.2 Tabelle 2: Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems GmbH, München/D
Axio Vision	Carl Zeiss AG, Jena/D
Origin SRO	Origin Lab Coporation, Northampton/USA

2.1.3 Tabelle 3: Chemikalien

Artikel	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Albumax II-Pulver	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
BupH MES-Buffered saline packs	Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford/USA
Chondroitin-4-sulfat A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
4',6-Diamidino-2-phenyindolilactate (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

	Steinheim/D
Dulbecco`s modified eagle medium (DMEM, 1x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Dulbecco-PBS++	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford/USA
Ethylendinitrioltetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt/D
EZ-Link Biotin-LC-Hydrazide	Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford/USA
Fluorescent Mounting Medium (Fluoromount)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg/D
Foetal Bovine Serum (FBS)	„GOLD“, EU approved PAA Laboratories GmbH, Cölbe/D
Gentamicin (50mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
Giemsa	Merck KGaA, Darmstadt/D
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
HEPES (1M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

	Steinheim/D
HEPES-Buffer (1M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Immersionsöl	Carl Zeiss AG, Jena/D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm/D
L-Glutamin (200µM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe/D
MEM-NEAA-Solution (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Monoklonaler anti-CD36-Antikörper (aus Maus IgG)	Abcam Inc., Cambridge/USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Natriumhypochlorit (NaOCl, 4 %)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim/D
NeutrAvidin (NAV)	Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford/USA
Paraformaldehyd (PFA, 95%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Perform	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt/D
Phosphate buffered saline (PBS,	Oxoid Ltd., Cambridge/UK

Dulbecco A-Tablets)	
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Poly-L-Lysin (PLL, 70-150kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
RPMI 1640-Lösung (mit NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
RPMI 1640-Lösung (ohne NaHCO ₃ , mit L-Glutamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , 98 %)	Merck KGaA, Darmstadt/D
Sheep anti-mouse IgG (FITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Stickstoff (N ₂) , 4.0	stationäre Laborversorgung
Trishydroxymethylaminomethan (Tris, 99,8 %)	Merck KGaA, Darmstadt/D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Trizma hydrochloride (Tris HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Tween	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm/D
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ ,30 %)	Merck GmbH, Darmstadt/D

2.1.4 Tabelle 4: Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Albumax II (10x):	5,20g RPMI-Pulver 500µl Gentamicin 2,98g HEPES 1,67g NaHCO ₃ 1,00g Glucose 0,10g Hypoxanthin 25g Albumax II-Pulver Die Chemikalien in 500ml H ₂ O _{bidest} unter Rühren für mehrere Stunden lösen. Dann den pH-Wert zwischen 7,0 und 7,4 einstellen. Die Lösung steril filtrieren und 50ml Aliquots einfrieren.
Binding-Medium:	500ml RPMI 1640 (mit Glutamin, ohne NaHCO ₃) 12ml HEPES-Puffer 50ml Humanserum (10%). Den pH-Wert auf 6,8 einstellen und das Medium steril filtrieren.
EDTA/Tris-Puffer:	9g NaCl (154mM) 0,5g Tris (4mM) 1g EDTA (3,4mM) in 1l H ₂ O _{bidest} lösen, dann Zugabe von 0,1ml Tween. Durch Rühren gut mischen und den pH-Wert auf 7,9 einstellen
Einfriermedium <i>P. falciparum</i> :	0,325g NaCl mit

	1,5g D-Sorbitol in 30ml H ₂ O _{bidest} lösen, dann 14ml Glycerol dazugeben und mit H ₂ O _{dest} auf 50ml auffüllen. Die Lösung steril filtrieren und im Kühlschrank aufbewahren.
Fraktionierungspuffer:	7,88g Tris/HCl (50mM) 8,766g NaCl (150mM) 0,37224g EDTA (1mM) Mit H ₂ O _{bidest} auf 1 Liter auffüllen, pH- Wert auf 8,0 einstellen.
Giemsa-Färbelösung:	5ml Giemsa mit 45ml 1 X Phosphatpuffer verdünnen und filtrieren.
Kulturmedium C32-Zellen:	500ml DMEM 50ml/10ml FBS (10%/2%) 5ml NEAA (1%) 5ml L-Glutamin (200µM) 500µl Gentamicin
Kulturmedium <i>P. falciparum</i> :	500ml RPMI 1640 (mit NaHCO ₃ , ohne L-glutamine) 500µl Gentamicin 5ml L-Glutamin (eingefroren) 200mM 12ml HEPES-Buffer (1M) 50ml Albumax II (gefroren 10x) Lagerung bei 4°C.
PBS-Puffer:	10 Tabletten in 1 l H ₂ O _{bidest} lösen.
Phosphatpuffer für Giemsa (10x):	4,1g KH ₂ PO ₄

	6,5g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O Mit H ₂ O _{bidest} auf 1l auffüllen und den pH-Wert auf 7,1 einstellen. Für den Ansatz einer Giemsa-Lösung wurde stets 1X Puffer verwendet, weshalb dieser 10X-Puffer immer 1:10 mit H ₂ O _{dest} verdünnt wurde.
Piranha-Reinigungslösung:	5ml H ₂ O ₂ vorlegen, 15ml H ₂ SO ₄ zugeben.

2.1.5 Tabelle 5: Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
C32	ATCC/USA
Erythrozytenkonzentrat	Blutbank des Zentrums für klinische Transfusionsmedizin Tübingen/D
3D7	Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen/D
FCR3	Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen/D

2.2 Methoden

In den folgenden Kapiteln werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Entwicklung geeigneter Beschichtungssysteme dargestellt, welche die Basis zur Immobilisation der Rezeptoren CD36 und CSA auf den Schwingquarz-Sensor bilden. Des Weiteren folgen die Erläuterung der Methoden zur Zellkultur sowie eine ausführliche Darstellung der QCM-Messungen.

2.2.1 Schichtentwicklung

2.2.1.1 Reinigung der Sensoroberfläche

Vor der Beschichtung wurde die Oberfläche der Schwingquarze zur Entfettung für eine Minute in Aceton getaucht, anschließend gründlich mit bidestilliertem Wasser (H_2O_{bidest}) abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Im Anschluss wurde der Quarz für eine Minute in frisch hergestellte Piranha-Lösung getaucht, um eine hydrophile Sensoroberfläche zu erhalten. Diese wurde ebenfalls sorgfältig mit bidestilliertem Wasser abgespült und der Schwingquarz im Stickstoffstrom getrocknet.

2.2.1.2 Präparation der Schwingquarze

Die so gereinigten Schwingquarze wurden in ein eigens von Dr. rer. nat. F.K. Gehring entwickeltes Halterungssystem eingebracht. Dazu wurden sie zunächst mit der Goldoberfläche nach oben auf die zuvor mit Aceton gereinigte Arbeitsfläche gelegt und die ringförmige Klebefolie aus Polyethylen aufgebracht.

2.2.1.3 Beschichtung der Sensoroberfläche

Im Folgenden werden die beiden Schichtsysteme beschrieben, welche es ermöglichen, über bestimmte Wechselwirkungen die Rezeptoren CD36 und CSA auf dem Schwingquarz zu immobilisieren.

a) Beschichtung der Sensoroberfläche mit Poly-L-Lysin (PLL)

Die Beschichtung der Sensoroberfläche mit Poly-L-Lysin wurde gewählt, da diese aufgrund des polykationischen Charakters die Bindung negativ geladener

Moleküle und Zellen über elektrostatische Wechselwirkungen ermöglichte. Auf einen zuvor gereinigten und präparierten Quarz wurden 20µl Poly-L-Lysin-Lösung mit einer Konzentration von 0,5mg/ml in H₂O_{bidest} pipettiert und im Stickstoffstrom kreisförmig eingetrocknet. Zur vollständigen Trocknung wurde der so beschichtete Quarz im Inkubator für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Quarz im starken Wasserstrahl mit H₂O_{bidest} abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

b) Beschichtung der Sensoroberfläche mit NeutrAvidin (NAV)

Aufgrund der starken Affinität zu Biotin wurde die Beschichtung der Sensoroberfläche mit NeutrAvidin gewählt, um eine Basisschicht zur Bindung biotinylierter Moleküle zu erhalten. Auf den gereinigten und präparierten Quarz wurden 50µl einer NeutrAvidin-Lösung mit einer Konzentration von 100µg/ml in PBS-Puffer pipettiert, die eine Stunde in Wasserdampf-atmosphäre bei Raumtemperatur physisorbierte. Danach wurde die Sensoroberfläche mit H₂O_{bidest} gespült und nicht getrocknet.

2.2.1.4 Immobilisierung von CD36 auf dem Quarz

Zur Immobilisierung des Rezeptors CD36 auf dem Quarz wurden die CD36-tragenden Membranen amelanotischer Melanomzellen (C32-Zellen) gewonnen und – wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben – aufbereitet. Um die Membranen der C32-Zellen auf der Goldoberfläche des Schwingquarzsensors immobilisieren zu können, musste dieser zuvor wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben mit Poly-L-Lysin funktionalisiert werden. Zunächst wurden 120µl der Membransuspension 5 Minuten vor Verwendung 120µl PBS-Tween-20 beigegeben. 60µl der Membransuspension wurden auf einen frisch gereinigten und mit Poly-L-Lysin beschichteten Quarz pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Quarz wurde mit PBS-Puffer gespült und die gebundenen Membranen mit 60µl einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für 7 Minuten auf Eis fixiert. Anschließend wurde der Quarz wieder mit PBS-Puffer gespült und die unspezifischen Bindungsstellen durch Aufpipettieren von 60µl 2%-igem BSA in PBS-Puffer blockiert, dazu wurde eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Beschichtung mit C32-Membranen wurde am Auflichtmikroskop überprüft.

2.2.1.5 Immobilisierung von CSA auf dem Quarz

Im Rahmen dieser Arbeit wurde – in Anlehnung an [5] – ein System zur Bindung biotinylierten Chondroitin-Sulfats A über NeutrAvidin entwickelt. Um das Chondroitin-Sulfat A auf dem Quarz immobilisieren zu können, musste es zunächst mit einem Biotinylierungs-Kit biotinyliert werden, um eine Bindung an die NeutrAvidinschicht auf dem Quarz zu erreichen. Zunächst wurden 50mg Chondroitin-Sulfat A in 5ml MES-Puffer (0,1M) gelöst. Anschließend wurden 125µl einer 50mM Biotin-Hydrazid-Lösung in DMSO hinzugegeben und gut vermischt. Im nächsten Schritt wurden 62,5µl einer frisch hergestellten EDC-Lösung zugegeben und wiederum gut vermischt. Die Lösung wurde vier Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert, danach war der Biotinylierungsprozess abgeschlossen. Das biotinylierte CSA (bCSA) konnte anschließend durch eine Gelfiltration unter Verwendung einer HiTrap Desalting-Säule vom nicht-biotinylierten CSA abgetrennt werden. Hierfür wurde die Säule mit 25ml MES-Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 5ml/min äquilibriert, der Durchfluss aufgefangen und verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 1,5ml bCSA beladen, die Fließgeschwindigkeit betrug hierbei 1-10ml/min. Die ersten 1,5ml des eluieren Puffers wurden verworfen, anschließend konnten 3ml bCSA in einer Konzentration von 3mg/ml gewonnen werden. Die Ankopplung des biotinylierten Chondroitin-Sulfats A an den noch feuchten, mit NeutrAvidin beschichteten Quarz erfolgte wahlweise extern durch Auftropfen von 50µl bCSA-Lösung mit einer Konzentration von 100µg/ml in PBS-Puffer mit einer Pipette oder in der Messkammer selbst, indem die Lösung über die Quarzoberfläche gepumpt wurde (s. Kap. 2.2.4.3).

2.2.2 Kultivierung der amelanotischen Melanomzellen

2.2.2.1 C32-Zellen

Die Kultivierung der CD36-tragenden Membranen amelanotischer Melanomzellen (C32-Zellen) wurde von Frau Dipl. Biol. Daniela Kömpf

durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die C32-Zellen zum einen wie in Kapitel 2.1.1.4 beschrieben auf die Schwingquarzsensoren immobilisiert, wo sie als Rezeptoren für den PfEMP1-vermittelten Zytoadhäsionsprozess *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten dienten, zum anderen kamen sie wie in Kapitel 2.2.3.7 beschrieben zur Selektion des CD36-bindenden Phänotyps zum Einsatz. Die C32-Kultur wurde in Zellkulturflaschen in ihrem entsprechenden Medium im Inkubator bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit unter Begasung mit 5%CO₂ kultiviert. Das Medium wurde ein- bis zweimal pro Woche gewechselt. Da es sich um eine adhärenzte Zellkultur handelt, konnte das Medium einfach abgenommen werden und durch dieselbe Menge frisches, vorgewärmtes DMEM mit 10% FBS ersetzt werden. Das Wachstum der Kultur wurde unter dem inversen Mikroskop beurteilt.

2.2.2.2 Auftauen und Ansetzen der Kultur

Die bei -80°C gelagerten C32-Zellen wurden zunächst in 37°C warmem Kulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) aufgetaut, in 30ml Medium aufgenommen und bei 1200rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nun wurde das Medium abgenommen, das Pellet durch sog. „ratschen“ gelöst und in 10ml Medium aufgenommen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 1200rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Wiederum wurde das Medium abgenommen, das Pellet durch „ratschen“ gelöst und diesmal in 6ml Medium mit 10% FBS aufgenommen. Die aufgetauten C32-Zellen konnten nun auf große Zellkulturflaschen verteilt und wie gewohnt kultiviert werden.

2.2.2.3 Splitten der Kultur

War der Boden der Zellkulturflasche nahezu vollständig mit Zellen bewachsen, musste die Kultur gesplittet werden. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen, 10ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Zellkulturflasche für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, damit sich die Zellen ablösen konnten. Die abgelösten Zellen wurden in 20ml Medium gegeben, um das Trypsin zu inaktivieren und bei 1200rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet durch „ratschen“ gelöst, erneut

20ml Medium zugegeben und bei 1200rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde erneut der Überstand abgenommen, das Pellet durch „ratschen“ gelöst und mit 10% FBS-Medium auf 5ml aufgefüllt. Nun konnten die Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt und wie gewohnt kultiviert werden.

2.2.2.4 Zellaufschluss durch fraktionelle Zentrifugation

Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Fraktionierungspuffer von der Flasche geschabt und in einem Falcon-Tube gesammelt. Es folgte die Zentrifugation bei 1200rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Als nächstes wurden die Zellen in Fraktionierungspuffer aufgenommen und das Pellet durch Resuspendieren gelöst. Die Zellen wurden durch Pottern im Zellhomogenisator auf Eis aufgeschlossen. Zum Abtrennen ganzer Zellen und Zellkerne wurde bei 540xg für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 2500xg für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und bei 100.000xg für 1h bei 4°C zentrifugiert, um das Cytosol/Cytoplasma von den Membranen abzutrennen. Nun konnte das Pellet in Fraktionierungspuffer aufgenommen werden. Bis zur Verwendung für die Quarzbeschichtung wurden Aliquots von je 120µl bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

2.2.3.1 Parasiten

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Parasitenstämme verwendet, 3D7 und FCR3. Diese wurden freundlicherweise vom Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt. Bei 3D7 handelt es sich um einen Laborstamm ohne spezifisches Adhäsionsverhalten gegen einzelne Rezeptoren. Im Falle von FCR3 wurden die auf CSA- bzw. CD36-Adhäsion selektierten Stämme FCR3-CSA und FCR3-CD36 verwendet.

2.2.3.2 Auftauen von Parasiten und Ansetzen der Kultur

Das Cryoröhrchen mit 1ml tiefgefrorener (-150°C) Parasitenkultur wurde im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und in ein 50 ml Tube überführt. Tropfenweise wurden unter ständigem Schütteln erst 0,2ml sterile 12%-ige NaCl-Lösung zugegeben, nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten 10ml 1,6%-ige NaCl-Lösung zugegeben. Die Suspension wurde bei 1800rpm für 5 Minuten bei 21°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, 10ml vorgewärmtes Medium zugegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang diente zur Wiederherstellung physiologischer osmotischer Verhältnisse. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet bestimmt. Nun konnten die Zellen mit der entsprechenden Menge Erythrozytenkonzentrat und 9,5ml Medium in Kultur genommen werden und im Inkubator bei 37°C und einer Gaszusammensetzung von 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ kultiviert werden. Dabei wurde der Hämatokrit (prozentualer Anteil der Erythrozyten in der Lösung) stets mit Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ auf 5% eingestellt.

2.2.3.3 Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

Die Parasitenkulturen wurden in Zellkulturflaschen in ihrem entsprechenden Medium bei einem Hämatokrit von 5% im Inkubator bei 37°C und einer Gaszusammensetzung von 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ kultiviert. Die Parasitämie der Kultur wurde täglich mittels Giemsa-gefärbter Blutausstriche (s. Kapitel 2.2.3.4) bestimmt. Dementsprechend wurden die Kulturen auf eine Parasitämie von 1% verdünnt oder lediglich das Medium gewechselt. Zum Mediumwechsel wurde die Kultur bei 1800rpm für 5 Minuten bei 21°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und durch frisches, im Wasserbad auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt. Zur Verdünnung der Kultur wurde die überschüssige Menge verworfen und der entsprechenden Menge Kultur frisches Erythrozytenkonzentrat (Blutgruppe 0+) und Medium zugegeben.

2.2.3.4 Giemsafärbung zur Bestimmung der Parasitämie

Zur Darstellung von *Plasmodium falciparum* wurden die Blutausstriche mit Giemsa-Lösung gefärbt. Da Erythrozyten keinen Zellkern enthalten war es mittels Giemsa-Farbstoff möglich, die DNA der in den Erythrozyten liegenden

Parasiten violett anzufärben, das Zytoplasma der Erythrozyten wurde rot gefärbt. Für den Ausstrich wurden infizierte Erythrozyten vom Boden der Zellkulturflasche mithilfe einer sterilen Pipette entnommen, auf einen Objektträger getropft und mit einem zweiten Objektträger darauf ausgestrichen. Der Ausstrich wurde luftgetrocknet oder trockengeföhnt und anschließend für etwa 30 Sekunden in Methanol fixiert. Nach erneutem Lufttrocknen wurde der Ausstrich in frisch angesetzter 10%-iger Giemsa-Lösung für 20 Minuten gefärbt. Die gefärbten Ausstriche wurden mit Leitungswasser abgespült, getrocknet und bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersions-Objektiv unter dem Mikroskop ausgewertet. Die Parasitämie gibt den prozentualen Anteil *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten im Bezug zur Gesamtmenge der Erythrozyten an. Zur Bestimmung wurden 300 Erythrozyten ausgezählt, dabei wurden Mehrfachbefälle einfach gewertet und anschließend die Parasitämie berechnet [27].

2.2.3.5 Synchronisierung der Kultur

Da die Kultur von *Plasmodium falciparum* im Laufe der Zeit zu asynchronem Wachstum der Parasiten neigte, musste die Kultur von Zeit zu Zeit mit 5%-iger Sorbitol-Lösung synchronisiert werden. Dazu sollten hauptsächlich Ringstadien vorliegen, die Erythrozyteninvasion nicht länger als zehn bis zwölf Stunden zurückliegen und die Parasitämie sollte mindestens 3 bis 5% betragen. Die Kultur wurde dazu bei 1800rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet durch tropfenweise Zugabe in 10ml 5%-igem Sorbitol unter ständigem Schütteln gelöst. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Sorbitol inkubiert, die Lösung gelegentlich geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation bei 1800rpm für 5 Minuten wurden sie ein- bis zweimal mit Kulturmedium gewaschen. Danach konnten die Zellen bei einem Hämatokrit von 5% in Kultur genommen werden und im Inkubator bei 37°C und einer Gaszusammensetzung von 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ kultiviert werden [27].

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

Für die Untersuchungen mit Schwingquarz-Sensoren wurden reine späte Blutstadien benötigt, um deutliche Signale zu erhalten. Die MACS-Isolation diente zur magnetischen Trennung von späten Trophozoiten und Schizonten von frühen Blutstadien. Dabei macht man sich die Eigenschaft der Parasiten zu nutze, in den späten Stadien Hämозoin zu akkumulieren. Dieses eisenhaltige Abbauprodukt des Hämoglobins bewirkt, dass späte Trophozoiten und Schizonten in einem Magnetfeld auf der MACS-Säule festgehalten und so von den frühen Stadien getrennt werden [38]. Dazu wurde zunächst die MACS-Säule im Magnetfeld befestigt und mit 5ml vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen. Die zu isolierende Kultur wurde bei 1800rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet auf die Säule aufgebracht. Anschließend wurde die Säule mit Medium gespült bis der Durchfluss wieder die Farbe des Mediums hatte. Die Säule wurde dann aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein 15ml Tube aufgesetzt. Nun konnten die in der Säule gebundenen späten Blutstadien mit ausreichend Medium aus der Säule eluiert werden.

2.2.3.7 Selektion des CD36-bindenden Phänotyps

Da die Parasiten von Zeit zu Zeit ihren Phänotyp wechseln, mussten sie regelmäßig erneut auf ihren spezifischen Phänotyp selektioniert werden. Die Selektion erfolgte über die in Kapitel 2.2.2 beschriebenen C32-Zellen, die CD36 in großen Mengen exprimieren. Hierzu wurde eine Kultur verwendet, die mehrheitlich im Trophozoiten- oder Schizonten-Stadium vorlag und in der die Parasitämie mindestens 8% betrug. Vorbereitend wurde die Kultur in ein 15ml Falcon Tube überführt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert. Anschließend wurde die Kultur dreimal mit Bindungsmedium gewaschen, wobei stets bei 500xg zentrifugiert wurde, danach in Bindungsmedium resuspendiert und der Hämatokrit auf 2 bis 3% eingestellt. Zur Selektionierung sollte eine 25cm² Kulturflasche verwendet werden, in der die Konfluenz der Melanomzellen annähernd 80% erreicht. Zunächst wurde das

Kulturmedium entfernt und die C32-Zellen einmal mit Bindungsmedium gewaschen. Danach wurden die C32-Zellen mit der in Bindungsmedium gelösten Parasitenkultur bedeckt und bei 37°C im Inkubator ohne Begasung für etwa eine Stunde inkubiert. Währenddessen wurde die Kultur alle 15 Minuten durch leichtes Schütteln der Flasche resuspendiert. Um ungebundene Erythrozyten zu entfernen wurde die Flasche vorsichtig dreimal mit Bindungsmedium gewaschen. Abschließend konnte das Bindungsmedium entfernt und die Zellen bei einem Hämatokrit von 5% in Kultur genommen werden. Im Inkubator bei 37°C und einer Gaszusammensetzung von 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ erfolgte die weitere Kultivierung. Am nächsten Tag, nachdem die Merozoiten der selektierten späten Blutstadien neue Erythrozyten befallen hatten, wurde die Kultur in eine neue Flasche umgesetzt und die Kultivierung wie gewohnt fortgesetzt [27].

2.2.3.8 Selektion des CSA-bindenden Phänotyps

Zur Selektion der Parasiten auf CSA wurden 6-well Polystyrol-Platten mit je 1ml CSA-Lösung der Konzentration 100µg/ml in PBS-Puffer pro well über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Überschüssiges CSA wurde am nächsten Tag zweimal mit PBS-Puffer abgewaschen. Hierzu wurde ebenfalls eine Kultur verwendet, die mehrheitlich im Trophozoiten- oder Schizonten-Stadium vorlag und eine Parasitämie von etwa 4% aufwies. Die Kultur wurde bei 1800rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Pellet in 12ml Adhäsionsmedium aufgenommen und mit je 2ml pro well auf die Platte verteilt. Die ungebundenen Zellen wurden nach einer Inkubationsszeit von 30 Minuten bei 37°C durch viermaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Die adhärenierten Zellen wurden mit 9,5ml Kulturmedium von den wells abgespült und zusammen mit 0,5ml Erythrozytenkonzentrat wieder in Kultur genommen [27].

2.2.3.9 Einfrieren der Parasitenkultur

Befinden sich die Parasiten im Ringstadium und beträgt die Parasitämie zwischen 3% und 5%, so können sie eingefroren werden. Dazu wurde die Kultur (20ml) bei 1800rpm für 5 Minuten bei 21°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden erst 0,2ml, dann 1ml

der Einfrierlösung unter ständigem, kräftigem Schütteln tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde die Kultur in einem Cryoröhrchen erst bei -80°C , nach einigen Tagen dann bei -150°C zur endgültigen Lagerung eingefroren.

2.2.4 QCM-Messungen zur Überprüfung der Schichten

Um die entwickelten Beschichtungen der Schwingquarzsensoren zu testen, wurden QCM-Messungen durchgeführt. Die entsprechenden Messprotokolle werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

2.2.4.1 Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze

Über Ankopplungsmessungen von Blut an mit PLL beschichtete Quarze wurde – wie in Kapitel 3.1 ausführlich erläutert – getestet, ob die erhaltene Schicht dünn genug war. Ist die PLL-Schicht zu dick, kann der Schwingquarzsensoren aufgrund der begrenzten Eindringtiefe keine an der Oberfläche gebundenen infizierten Erythrozyten mehr erkennen. Für die Messungen wurden Pumpschläuche mit einem Innendurchmesser von 1,25mm und lange Zulaufschläuche mit zwischengeschalteter Probenschleife verwendet. Der frisch gereinigte, geklebte und mit PLL beschichtete Quarz wurde in die dafür vorgesehene Halterung eingelegt und das Gehäuse mit dem Bajonettverschluss verschraubt, so dass eine flüssigkeitsdichte Messzelle entstand. Anschließend wurde die Oszillatorschaltung eingeschaltet, damit der Quarz einschwingen konnte. Währenddessen wurde die Anlage bei einer Fließgeschwindigkeit von $100\mu\text{l}/\text{min}$ mit RPMI gespült. Die Probe bestand aus EDTA-Blut 1:10 in EDTA-Tris-Puffer-Puffer verdünnt. War der Messquarz eingeschwungen und die Frequenz stabil, wurden $50\mu\text{l}$ der Probe in die Probenschleife aufgezogen und mit einer Fließgeschwindigkeit von $100\mu\text{l}/\text{min}$ über den Quarz geleitet. Als der Quarz sichtbar bedeckt war und der Frequenzabfall beendet, wurden die Pumpen für 10 Minuten angehalten („stop flow“).

2.2.4.2 Langzeitankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze

Für die Messungen wurden Pumpschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,25mm und lange Zulaufschläuche mit zwischengeschalteter Probenschleife

verwendet. Um eine eventuelle Bildung von Luftblasen in der Messkammer zu vermeiden, war es nötig, das als Spüllösung verwendete Medium (RPMI) zu entgasen. Dazu wurden 100ml Medium steril entnommen und in einen Glaskolben gefüllt. Unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer wurde das Medium unter Vakuum für etwa 4 Stunden entgast. Auf der Sterilwerkbank wurde das Medium in zwei 50ml Falcon Tubes pipettiert und mit Hilfe eines spritzenbetriebenen Sterilfilters steril filtriert. Die Anlage wurde für die Messung auf 37°C thermostatisiert. Der gereinigte, geklebte und mit PLL beschichtete Quarz wurde in die dafür vorgesehene Halterung eingelegt und das Gehäuse mit dem Bajonettverschluss verschraubt, so dass eine flüssigkeitsdichte Messzelle entstand. Anschließend wurde die Oszillatorschaltung eingeschaltet, damit der Quarz einschwingen konnte. Währenddessen wurde die Anlage bei einer Fließgeschwindigkeit von 100µl/min mit RPMI gespült. Die Probe bestand aus EDTA-Blut 1:10 in EDTA-Tris-Puffer verdünnt. War der Messquarz eingeschwungen und die Basislinie stabil, wurden 50µl der Probe in die Probenschleife aufgezogen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 100µl/min über den Quarz geleitet. Die Bedeckung des Quarzes konnte in der Messkammer beobachtet werden. Sobald die Frequenz ein stabiles Niveau erreicht hatte und die Probe größtenteils weggespült war, wurde die Fließgeschwindigkeit auf 4µl/min reduziert. Die Frequenz wurde über Nacht weiter aufgezeichnet, um beurteilen zu können, ob die Messbedingungen über diesen Zeitraum konstant bleiben.

2.2.4.3 Messungen zur Überprüfung der Ankopplung des biotinylierten CSA auf NAV

Die Messungen sollten zeigen, ob die Bindungen zwischen biotinyliertem CSA und NeutrAvidin spezifisch sind, oder die gesamte Sensoroberfläche mit biotinyliertem CSA beschichtet war (s. Kapitel 3.2). Für die Messungen wurden Pumpschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,25mm und lange Zulaufschläuche mit zwischengeschalteter Probenschleife verwendet. Die Anlage wurde gut mit PBS-Puffer gespült. Die gereinigten, geklebten und mit NeutrAvidin beschichteten Quarze wurde in die dafür vorgesehene Halterung eingelegt und das Gehäuse mit dem Bajonettverschluss verschraubt, so dass

die Messzelle abgedichtet wurde. Anschließend wurde die Oszillatorschaltung eingeschaltet, damit der Quarz einschwingen konnte. Währenddessen wurde die Anlage bei einer Fließgeschwindigkeit von 20µl/min mit PBS-Puffer gespült. Für die Negativkontrollen wurde als Probe CSA in MES-Puffer (10mg/ml) gelöst und 1:10 in PBS-Puffer verdünnt verwendet. Nach Einstellung einer stabilen Basislinie, wurden 50µl der Probe in die Probenschleife aufgezogen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 20µl/min über den Quarz geleitet. Für die Ankopplungsmessung wurde als Probe biotinyliertes CSA 1:10 in PBS-Puffer verdünnt verwendet. War der Messquarz eingeschwingen und die Frequenz stabil, wurden ebenfalls 50µl der Probe in die Probenschleife aufgezogen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 20µl/min über den Quarz geleitet.

2.2.5 Ankopplungsmessungen mit Parasiten

In den folgenden Unterkapiteln werden die vorbereitenden Maßnahmen und Messabläufe zu den Ankopplungsmessungen mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten erläutert (s. Kapitel 3.4).

2.2.5.1 Vorbereitung des Mediums

Um eine eventuelle Bildung von Luftblasen in der Messkammer zu vermeiden, war es notwendig, das als Spüllösung verwendete Medium (RPMI) zu entgasen. Dazu wurden 100ml Medium steril entnommen und in einen Glaskolben gefüllt. Unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer wurde das Medium unter Vakuum für etwa vier Stunden entgast. Da dies nur unter unsterilen Bedingungen durchgeführt werden konnte, musste das Medium auf der Sterilwerkbank in zwei 50ml Falcon Tubes pipettiert und mit Hilfe eines spritzenbetriebenen Sterilfilters steril filtriert werden. Anschließend wurden für einige Messungen je 50µl Gentamicin zur Vermeidung von Kontaminationen zugegeben. Das so filtrierte Medium konnte nun in autoklavierte Schnappdeckelgläschen umgefüllt und in der entsprechenden Haltevorrichtung der Messanlage auf 37°C thermostatisiert werden.

2.2.5.2 Vorbereitung der Messanlage

Für die Messungen wurden Pumpschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,25mm und kurze Zulaufschläuche ohne zwischengeschaltete Probenschleife verwendet. Die Anlage wurde einige Stunden vor der Messung auf 37°C thermostatisiert und die mit RPMI befüllten Schnappdeckelgläschen in den vorgesehenen Halterungen unter Begasung mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ ebenfalls erwärmt. Als erstes wurde die Fließ-Injektions-Anlage unter Verwendung von Spülquarzen zur Desinfektion gut mit einer 1%-igen Natriumhypochlorit-Lösung gespült, welche für 10 Minuten im Schlauchsystem einwirkte. Anschließend wurde diese mit 10ml sterilem H₂O_{bidest} aus dem System gespült. Nun wurde die Anlage mit dem vorgewärmten RPMI ebenfalls gründlich gespült.

2.2.5.3 Vorbereitung der Proben

Die mittels MACS-Isolation aufgereinigte Kultur (s. Kapitel 2.2.3.6), bestehend aus späten Trophozoiten und Schizonten und einer Parasitämie von etwa 90%, wurde bei 1800rpm für 5 Minuten bei 21°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet bestimmt und anschließend in 10ml entgastem und steril filtrierte RPMI in einem Schnappdeckelglas resuspendiert. Zusätzlich wurde ein Ausstrich angefertigt, fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt, um das Stadium der Parasiten zu Beginn der Messung zu dokumentieren. Dieselbe Menge Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ wurde als Kontrolle ebenfalls in 10ml entgastem und steril filtrierte RPMI in einem Schnappdeckelglas resuspendiert. Die Proben wurden in den dafür vorgesehenen Halterungen konstant unter Begasung auf 37°C thermostatisiert.

2.2.5.4 Start der Messung

Die gereinigten, geklebten und mit auf PLL-immobilisierten C32-Membranen beschichteten Quarze wurde in die dafür vorgesehene Halterung eingelegt und das Gehäuse mit dem Bajonettverschluss verschraubt, so dass die Messzelle abgedichtet wurde. Anschließend wurde die Oszillatorschaltung eingeschaltet, damit der Quarz einschwingen konnte. Währenddessen wurde die Anlage bei einer Fließgeschwindigkeit von 100µl/min mit RPMI gespült. War der

Messquarz eingeschwungen und die Frequenz stabil, wurden die Pumpen gestoppt und die Probe mit infizierten Erythrozyten an den Zulaufschlauch der einen Messkammer, die Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat an den Zulaufschlauch der anderen Messkammer angeschlossen. Die Pumpen wurden dann mit einer Fließgeschwindigkeit von 100µl/min gestartet. Hatte sich die Frequenz stabilisiert, beziehungsweise war die Messkammer gut mit der Probe befüllt, wurde die Fließgeschwindigkeit auf 4µl/min reduziert. Die jeweiligen Umschaltzeiten wurden notiert.

2.2.5.5 Ende der Messung

Nach Beendigung der Messungen durch Stoppen der Datenerfassung und Sicherung der Messdaten wurden die Quarze aus den Messkammern ausgebaut. Sie wurden mit RPMI gespült, für ca. 30 Sekunden in Methanol fixiert, getrocknet und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Einige Quarze wurden zur besseren Darstellung der DNA der Parasiten mittels Fluoreszenz mit DAPI gefärbt. Dazu wurden 60µl der 1:30000 verdünnten DAPI-Lösung auf den Quarz aufgebracht und für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert, anschließend zweimal mit PBS-Tween für je 5 Minuten gewaschen und mit einem Tropfen Einbettmedium eingebettet. Die übrige Probe der Parasiten wurde in ein Falcon-Tube umgefüllt, bei 1800rpm für 5 Minuten bei 21°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und aus dem Pellet ein zweiter Ausstrich zur Dokumentation des Parasitenstadiums am Ende der Messung angefertigt. Die Messkammern wurden mit Spülquarzen versehen und mit Natriumhypochlorit gespült, das wiederum 10 Minuten im Schlauchsystem einwirkte. Anschließend wurde mit 10ml sterilem H₂O_{bidest} gespült und danach das Schlauchsystem völlig entleert. Alle Materialien die mit Parasiten in Kontakt gekommen sind, wurden zur Desinfektion für 24 Stunden in Perform eingelegt.

2.2.5.6 Auswertung und Dokumentation

Mit der an das Mikroskop Axioskop2Mat angeschlossenen Digitalkamera wurden die Ausstriche und die Oberfläche der Quarze über ein 100fach Öl-Immersion-Objektiv fotografiert und ausgewertet. Die Bilder wurden mittels USB-Kabel auf den PC übertragen und mit Hilfe des

Bildbearbeitungsprogramms Photoshop bearbeitet und mit Messbalken versehen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm Origin.

3. Ergebnisse

3.1 Immobilisierung von Erythrozyten auf den Poly-L-Lysin beschichteten Quarz

Zum Nachweis der erfolgreichen Beschichtung der Sensoroberfläche mittels QCM-Mesungen erfolgte die Immobilisierung von Erythrozyten auf den mit Poly-L-Lysin beschichteten Schwingquarz. Dazu wurden – wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben – Ankopplungsmessungen von Erythrozyten auf mit PLL beschichteten Schwingquarzsensoren im Analysegerät *Fidget Type Fg T1* durchgeführt. Ziel war es, zu testen, ob die auf den Schwingquarzsensoren aufgebraute PLL-Schicht ausreichend dünn war, um eine Anbindung von Erythrozyten zu erkennen, welche in diesem Falle exemplarisch anstelle der CD36-exprimierenden amelanotischen Melanomzellen eingesetzt wurden. Dieses Beschichtungssystem sollte im weiteren Verlauf als Grundlage zur Immobilisierung des Rezeptors CD36 auf den Quarz dienen. Nur eine homogene Schicht aus Poly-L-Lysin auf der Sensoroberfläche erlaubte dabei eine gleichmäßige und dichte Belegung mit Erythrozyten (s. Abbildung 7). Dies war die unbedingte Voraussetzung, um nach Immobilisation des Rezeptors CD36 ebenfalls eine homogene Quarzbeschichtung zu erreichen, an welche später eine reproduzierbare Anbindung infizierter Erythrozyten gemessen werden konnte. War die PLL-Schicht zu dick, konnten die C32-Membranen zwar binden, der Quarz konnte jedoch keine Anbindung von infizierten Erythrozyten an die Membranen mehr erkennen. Die unspezifische Ankopplung von Erythrozyten an die PLL-Schicht schlug sich in einem Frequenzabfall nieder. Dabei korrelierte der gemessene Frequenzabfall mit der Anzahl der auf dem Quarz gebundenen Erythrozyten. Ziel des beschriebenen Versuches war es folglich, durch einen möglichst großen Frequenzabfall und die anschließende Auswertung der Schwingquarzoberfläche unter dem Mikroskop, eine Anbindung von Erythrozyten in großer Zahl und möglichst gleichmäßiger Verteilung auf der Quarzoberfläche zu erreichen.

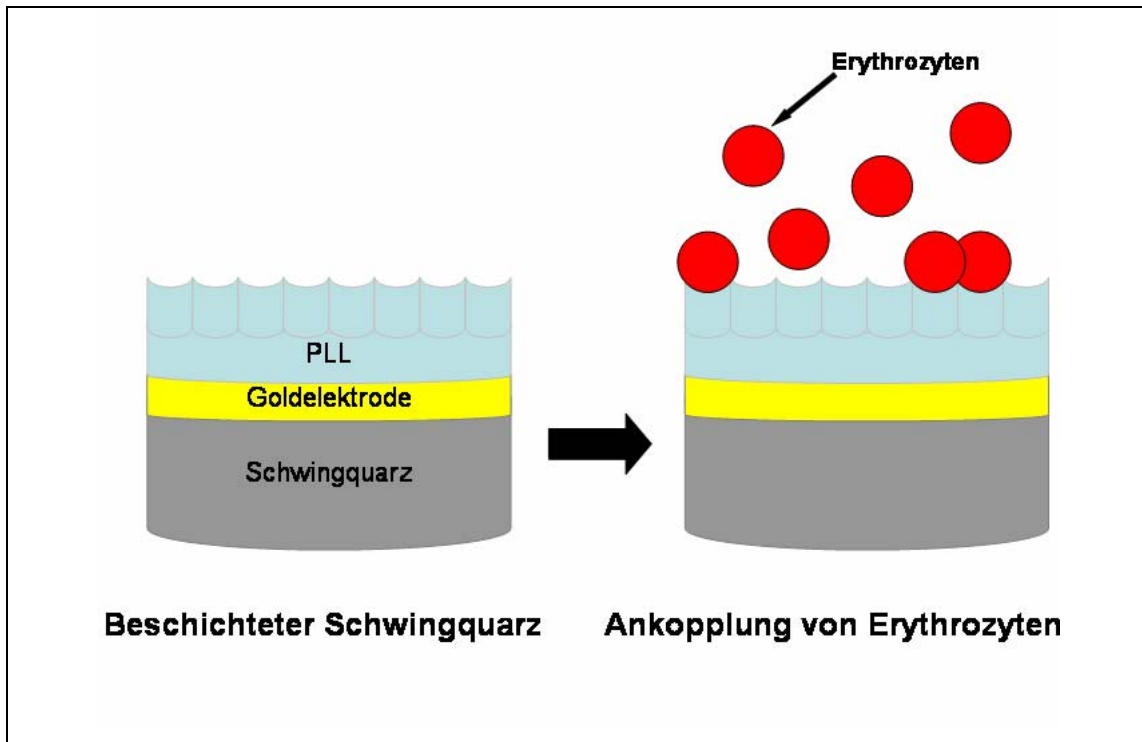


Abbildung 7: Ankopplung von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz.

3.1.1 Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze

Im folgenden Versuch wurden QCM-Messungen durchgeführt, um das Ankopplungsverhalten der Erythrozyten zu untersuchen. Es sollte ein Messprotokoll entwickelt werden, mit dem zuverlässig die optimale – sprich maximale – Quarzbelegung erreicht werden konnte. Dazu wurde eine Messung ohne „stop flow“ und eine weitere Messung mit „stop flow“ durchgeführt. Als „stop flow“ wird ein zeitlich definiertes Anhalten der Pumpen, die die Proben über den Schwingquarz leiteten, bezeichnet. Dies bewirkte, dass die Probenflüssigkeit für eine gewisse Zeit auf der Schwingquarzoberfläche sistierte. Dadurch sollte getestet werden, ob ein solcher „stop flow“ Einfluss auf die Anzahl der an das PLL gebundenen Erythrozyten haben würde. Das aus diesen Erkenntnissen resultierende, optimierte Messprotokoll kam für die weiteren Ankopplungsmessungen zur Anwendung.

3.1.1.1 Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze ohne „stop flow“

Der für die Ankopplungsmessung verwendete Schwingquarz war nach Standardschema wie in den Kapiteln 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben gereinigt, präpariert und mit Poly-L-Lysin beschichtet. Der so vorbereitete Quarz wurde wie in Kapitel 2.2.4.1 erläutert in die Messzelle eingebaut und durch Einschalten der Oszillatorschaltung zum Einschwingen gebracht. Währenddessen wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 μ l/min mit RPMI gespült. War das Frequenzsignal stabil, wurde die Probe, bestehend aus EDTA-Blut 1:10 in EDTA-Tris-Puffer verdünnt, mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 μ l/min über den Quarz geleitet. Anschließend wurde weiter mit RPMI gespült.

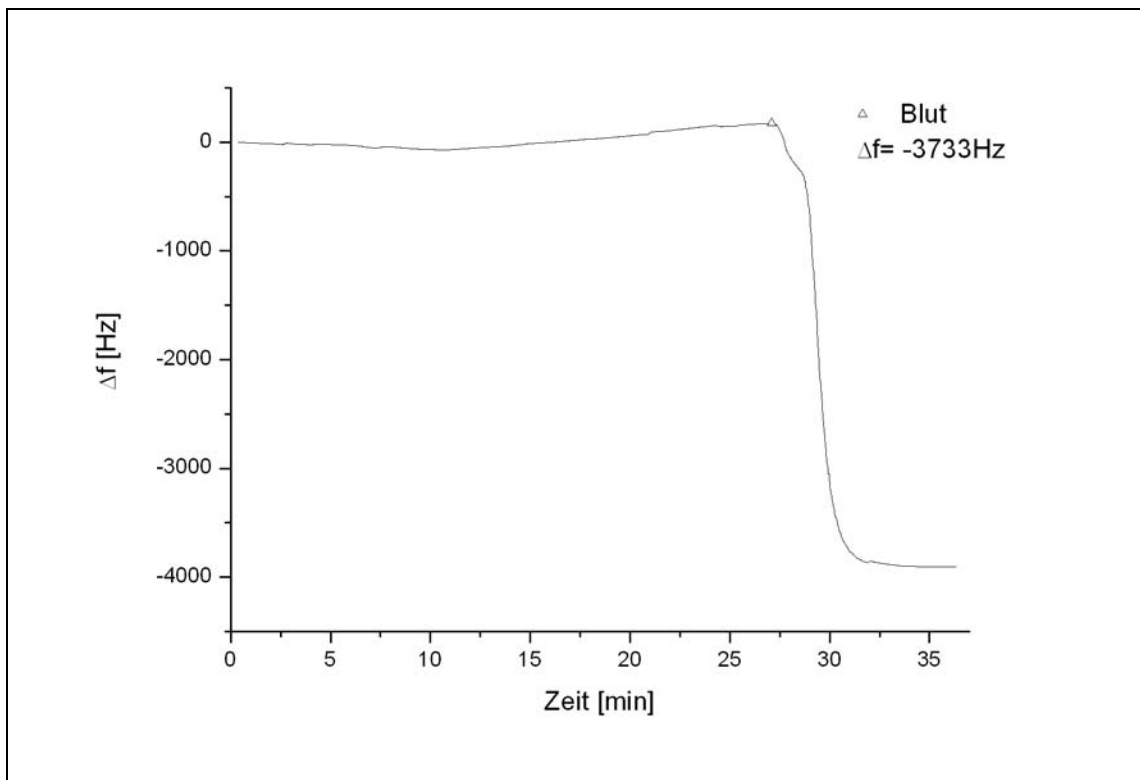


Abbildung 8: Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz ohne „stop flow“.

Der geradlinige Verlauf der Basislinie (s. Abbildung 8) zu Beginn der Messung zeigte, dass der Quarz gut eingeschwungen war, das heißt, es herrschten optimale Voraussetzungen für eine exakte Messung des Frequenzabfalls. Nach Einleitung der Probe in die Messkammer zeigte die Kurve rasch einen sehr

steilen Frequenzabfall. Die gemessene Frequenzänderung betrug -3733Hz . Der rasche Abfall der Frequenz korrelierte mit der Bindung der eingeleiteten Erythrozyten an die Quarzoberfläche und sprach somit für eine sehr dichte, regelmäßige Belegung der Quarzoberfläche mit Erythrozyten, wie sie dann auch mikroskopisch gesehen werden konnte (s. Abbildung 9). Im weiteren Kurvenverlauf stabilisierte sich die Frequenz rasch. Dies lässt vermuten, dass alle Bindungsstellen für Erythrozyten belegt waren. Zur weiteren Abklärung wurde ein zweiter Versuch (s. Kap. 3.1.1.2) durchgeführt.

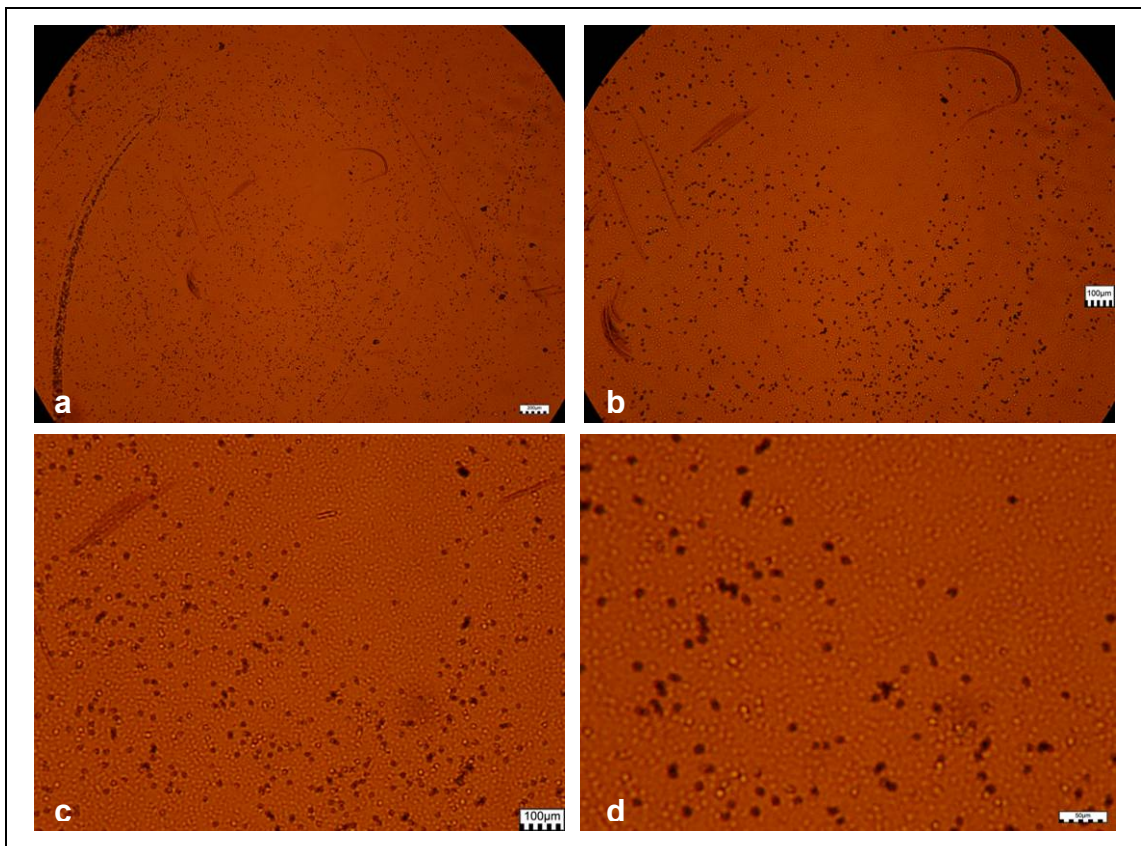


Abbildung 9: a-b: Ankopplung von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz, Vergrößerung: 500x. c-d: Vergrößerung: 1000x.

3.1.1.2 Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze mit „stop flow“

Die Ankopplungsmessung wurde unter gleichen Bedingungen wie im Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben durchgeführt. Im Unterschied zur ersten Ankopplungsmessung sollte nun geklärt werden, ob ein kurzzeitiges Abschalten der Pumpen („stop flow“) einen Einfluss auf das Ankopplungsverhalten der

Erythrozyten haben würde. Es sollte sich im Versuch zeigen, ob nach dem ersten großen Frequenzabfall bereits alle Bindungsstellen für Erythrozyten auf der Schwingquarzoberfläche belegt waren, oder ob ein vorübergehendes Abschalten der Pumpen erforderlich ist, um die maximale Ankopplung zu erzielen. Sollte durch das ständige Spülen der Messzelle mit Medium eine maximale Anbindung verhindert worden sein, müsste nach Abschalten der Pumpen ein weiterer Frequenzabfall messbar sein. Dazu wurden die Pumpen für 10 Minuten angehalten, nachdem der Quarz sichtbar mit Blut bedeckt und der erste Frequenzabfall abgeschlossen war. Falls es zu keinem weiteren Abfall der Frequenz kommen sollte, würde die Spülung der Messzelle mit Medium mit einer Fließgeschwindigkeit von $100\mu\text{l}/\text{min}$ fortgesetzt werden. Das Ausbleiben eines zweiten Frequenzabfalls würde folglich zeigen, dass die maximale Belegung aller Bindungsstellen ohne „stop flow“ erreicht werden konnte und dieser keine Optimierung des Ankopplungsverhaltens bewirkte.

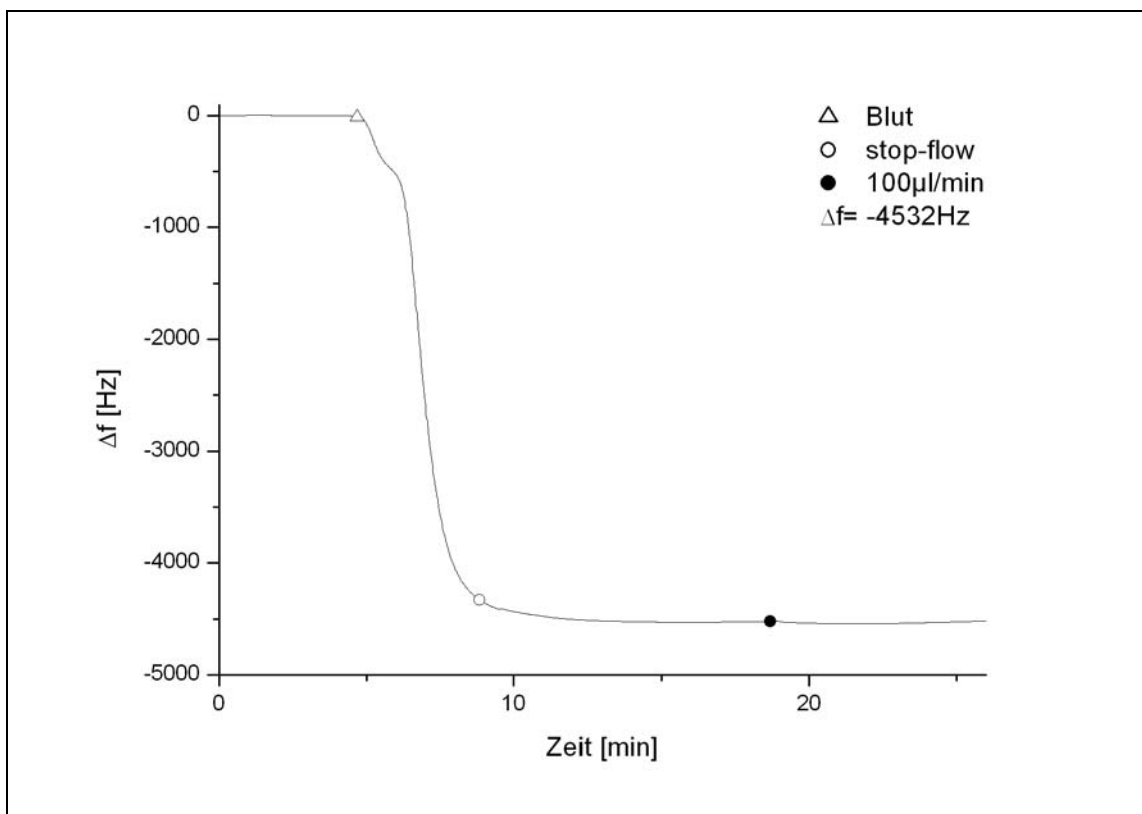


Abbildung 10: Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz mit „stop flow“.

Nach Einleitung der Probe in die Messkammer zeigte die Kurve (s. Abbildung 10) ebenfalls einen sehr steilen Frequenzabfall. Die Frequenzänderung betrug -4532Hz . Dieser Messwert überstieg den Wert der ersten Ankopplungsmessung noch um 799Hz . Die noch dichtere, regelmäßigere Belegung der Quarzoberfläche mit Erythrozyten konnte auch mikroskopisch gesehen werden (s. Abbildung 11). Im weiteren Kurvenverlauf stabilisierte sich die Frequenz rasch. Nun wurden die Pumpen für 10 Minuten angehalten, in Abbildung 10 mit „stop flow“ markiert. Der Kurvenverlauf zeigte, dass es dadurch zu keinem weiteren Frequenzabfall und damit auch zu keiner weiteren Belegung von Bindungsstellen mit Erythrozyten kam.

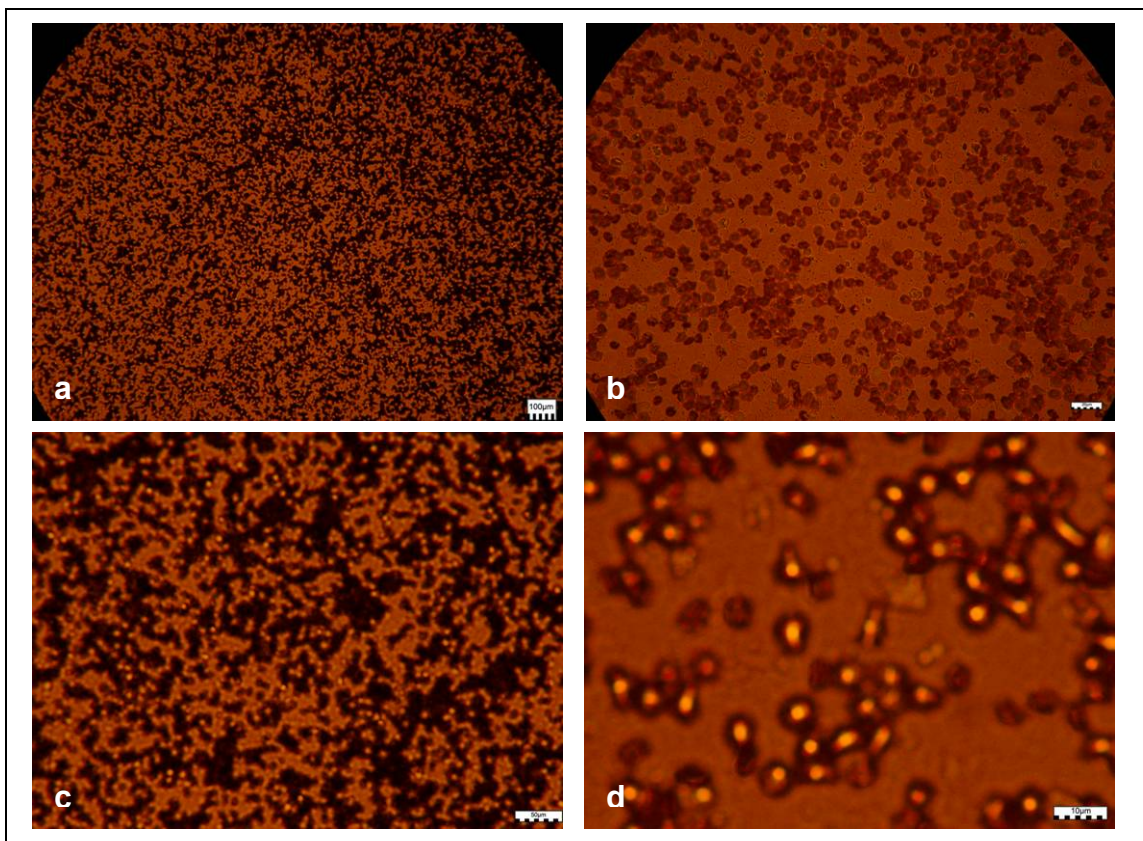


Abbildung 11: a-b: Ankopplung von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz, Vergrößerung: 500x. c-d: Vergrößerung: 1000x.

Diese Erkenntnis war grundlegend für die späteren Ankopplungsmessungen mit infizierten Erythrozyten. Im Vergleich der beiden Messprotokolle zeigte sich also keine Verbesserung des Endergebnisses durch die Einhaltung eines „stop

flow“. Das in Kap. 3.1.1.1 beschriebene Messprotokoll sollte nun für alle weiteren Ankopplungsmessungen Anwendung finden.

3.2 Langzeitankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze

Um in einem späteren Schritt den Ankopplungsvorgang infizierter Erythrozyten an CD36-exprimierende amelanotische Melanomzellen (C32-Zellen) mittels QCM-Messungen untersuchen zu können, musste zunächst das Verfahren der Ankopplungsmessung überprüft sowie die Kulturbedingungen für mehrstündige Experimente optimiert werden. Dazu wurden stellvertretend für die späteren Ankopplungsmessungen mit infizierten Erythrozyten Langzeitankopplungsmessungen von Erythrozyten an mit Poly-L-Lysin beschichteten Quarzen durchgeführt. Nur unter konstanten Bedingungen konnte es gelingen, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Um den pathogenen Adhäsionsvorgang biosensorisch in vollem Umfang nachvollziehen zu können, sollten die späteren Ankopplungsmessungen mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten über Nacht durchgeführt werden. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Langzeitankopplungsmessungen wurden ebenfalls durchgeführt, um zu überprüfen, ob es Faktoren gibt, die das Frequenzsignal dauerhaft beeinflussen und – falls ja – wie diese Einflüsse unter Erhalt der erforderlichen Kulturbedingungen eliminiert werden können. Die besondere Herausforderung dabei war es, die sensiblen Kulturbedingungen der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten herzustellen und aufrechtzuerhalten. Die in der Zellkultur erprobten Richtlinien bezüglich Kulturmedium, Temperatur und Begasung mussten näherungsweise so auf die Bedingungen im Analysegerät Fidget Type Fg T1 übertragen werden, dass die Vitalität der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten während der Messung garantiert blieb. Es sollte ein Messprotokoll entwickelt werden, mit dem es ebenso zuverlässig gelingt, das Frequenzsignal über den gesamten Zeitraum der Messung stabil zu halten. Ein konstantes Signal war die Grundvoraussetzung, um die Frequenzereignisse späterer Messungen eindeutig interpretieren zu können.

a) Langzeitankopplungsmessung von Erythrozyten an PLL-Quarze

Die Langzeitankopplungsmessungen wurden wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Die QCM-Messanlage wurde für die Messung auf 37°C thermostatisiert; dies entspricht eben der Temperatur, die bei den Ankopplungsmessungen mit Parasiten benötigt wurde, um deren Überleben zu gewährleisten. Das Medium wurde für diese Messungen steril filtriert, um die empfindlichen Kulturbedingungen der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten zu erhalten. War das Frequenzsignal stabil, wurde die Probe, bestehend aus EDTA-Blut 1:10 in EDTA-Tris-Puffer verdünnt, mit einer Fließgeschwindigkeit von 100µl/min über den Quarz geleitet. Anschließend wurde weiter mit RPMI gespült. War die Frequenz nach dem anlagerungsbedingten Frequenzabfall stabilisiert und die Probe größtenteils weggespült, wurde die Fließgeschwindigkeit auf 4µl/min reduziert. Das Frequenzsignal wurde über Nacht weiter aufgezeichnet, anschließend ausgewertet und auf Abweichungen untersucht.

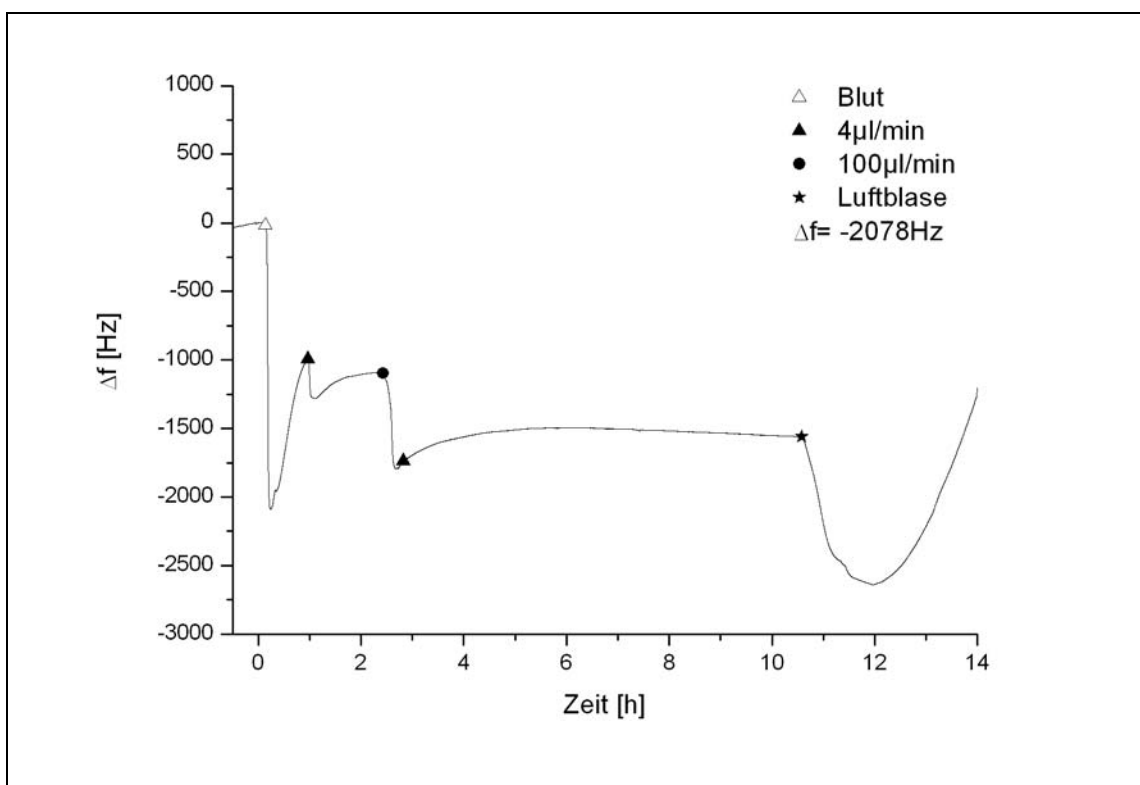


Abbildung 12: Langzeitankopplungsmessung von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz.

Der Kurvenverlauf (s. Abbildung 12) zeigte den erwarteten, typischen Frequenzabfall nach Einleiten der Probe in die Messzelle. Die Frequenzänderung betrug -2078Hz . In Abweichung vom Standardschema wurde nach 215 Minuten die Fließgeschwindigkeit kurzfristig erneut auf $100\mu\text{l}/\text{min}$ erhöht, um noch in der Messzelle befindliches Blut zügig auszuspülen. Anschließend wurde wieder auf $4\mu\text{l}/\text{min}$ Fließgeschwindigkeit reduziert. Wie in der Kurve ersichtlich, schlug sich diese Änderung der Pumpenleistung ebenfalls in einer kurzfristigen Frequenzänderung nieder, die sich jedoch rasch stabilisierte. Wie Abbildung 12 zu entnehmen, kam es circa zehn Stunden nach Beginn der Messung zu einer deutlichen Abweichung des bis dahin konstanten Frequenzsignals. Diese Abweichung korrelierte mit der Bildung einer Luftblase, die auch zu diesem Zeitpunkt in der Messkammer gesehen werden konnte. Es lag die Vermutung nahe, dass die Ursache dieses Einflusses der Phasengrenze zwischen Medium und Luft auf das Frequenzsignal durch ein temperaturbedingtes Ausgasen von Lufteingeschlüssen im Medium hervorgerufen wurde. Zur Abklärung wurde der Versuch im Folgenden, wie bereits erläutert, wiederholt (s. 3.2.b). Dabei wurde getestet, ob die Zeitspanne bis zum Auftreten einer Luftblase durch die optimierte Vorbereitung des Mediums verlängert werden kann.

b) Langzeitankopplungsmessung von Blut an PLL-Quarze

Die Langzeitankopplungsmessung wurde unter gleichen Bedingungen wie unter a) beschrieben durchgeführt. Zur Vermeidung der Luftblasenbildung wurde das Medium wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben unter Vakuum zunächst für vier Stunden bei Raumtemperatur entgast.

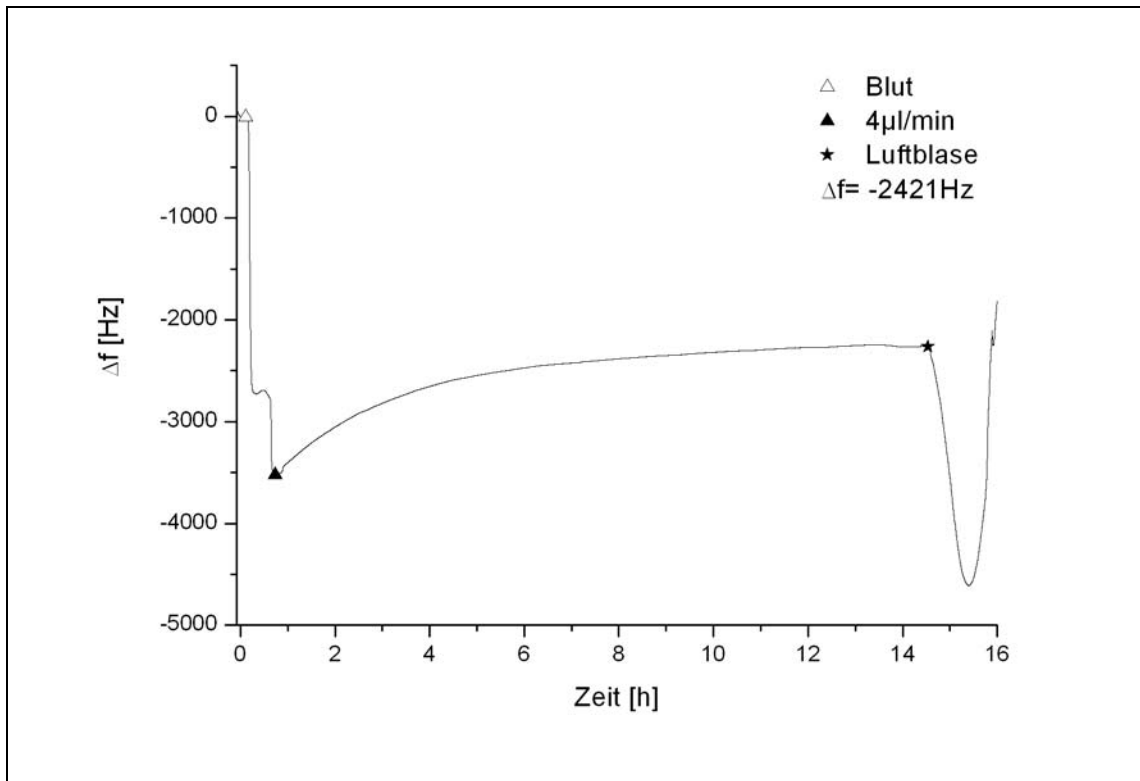


Abbildung 13: Langzeitankopplungsmessung von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz.

Der Kurvenverlauf (s. Abbildung 13) zeigte ebenfalls den erwarteten, typischen Frequenzabfall nach Einleiten der Probe in die Messkammer. Die Frequenzänderung betrug -2421Hz . Nach Reduzieren der Fließgeschwindigkeit auf $4\mu\text{l}/\text{min}$ zeigte sich ein Anstieg der Frequenz, der sich jedoch stabilisierte und zunächst konstant blieb. Etwa 14 Stunden nach Beginn der Messung kam es aber nun erneut zu einer deutlichen Entgleisung des Frequenzsignals. Ursache hierfür war wiederum die in der Messzelle sichtbare Entwicklung einer Luftblase. Dies bestätigte die Vermutung, dass die Blasenbildung durch Entgasen des Mediums unter Vakuum reduziert werden konnte, insofern, dass sich durch diese Maßnahme die Zeitspanne, in der das Frequenzsignal stabil blieb, verdoppelt hatte. In einer weiteren Messung (s. Abschnitt 3.2.2.3) sollte nun überprüft werden, ob durch längeres Entgasen das Zeitfenster, in dem das Frequenzsignal konstant bleibt, so erweitert werden konnte, dass das Verfahren für die Langzeitankopplungsmessungen mit Parasiten angewendet werden kann.

c) Langzeitankopplungsmessung von Blut an PLL-Quarze

Zur Vermeidung der Luftblasenbildung wurde das Medium wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben unter Vakuum nun doppelt so lange – also für acht Stunden – bei Raumtemperatur entgast.

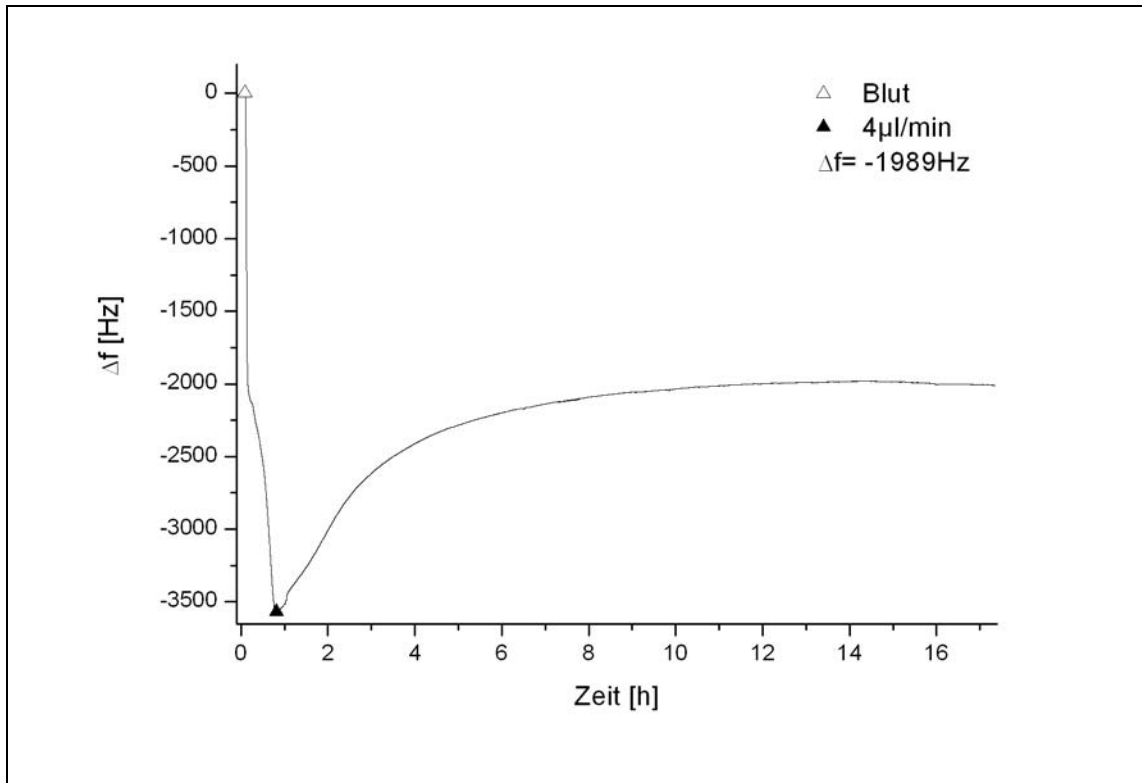


Abbildung 14: Langzeitankopplungsmessung von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz.

Der Kurvenverlauf (s. Abbildung 14) zeigte einen steilen Frequenzabfall nach Einleiten der Probe in die Messzelle, dessen Frequenzänderung -1989Hz betrug. Nach Reduzieren der Fließgeschwindigkeit auf 4 μ l/min zeigte sich wiederum ein Frequenzanstieg, der sich jedoch stabilisierte. Wie der Abbildung 14 zu entnehmen, blieb das Frequenzsignal nun über 18 Stunden nach Beginn der Messung konstant. Dies zeigte, dass durch achtstündiges Entgasen unter Vakuum das Medium optimal vorbereitet war. Um die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses zu sichern, wurde die Messung unter gleichen Bedingungen wiederholt.

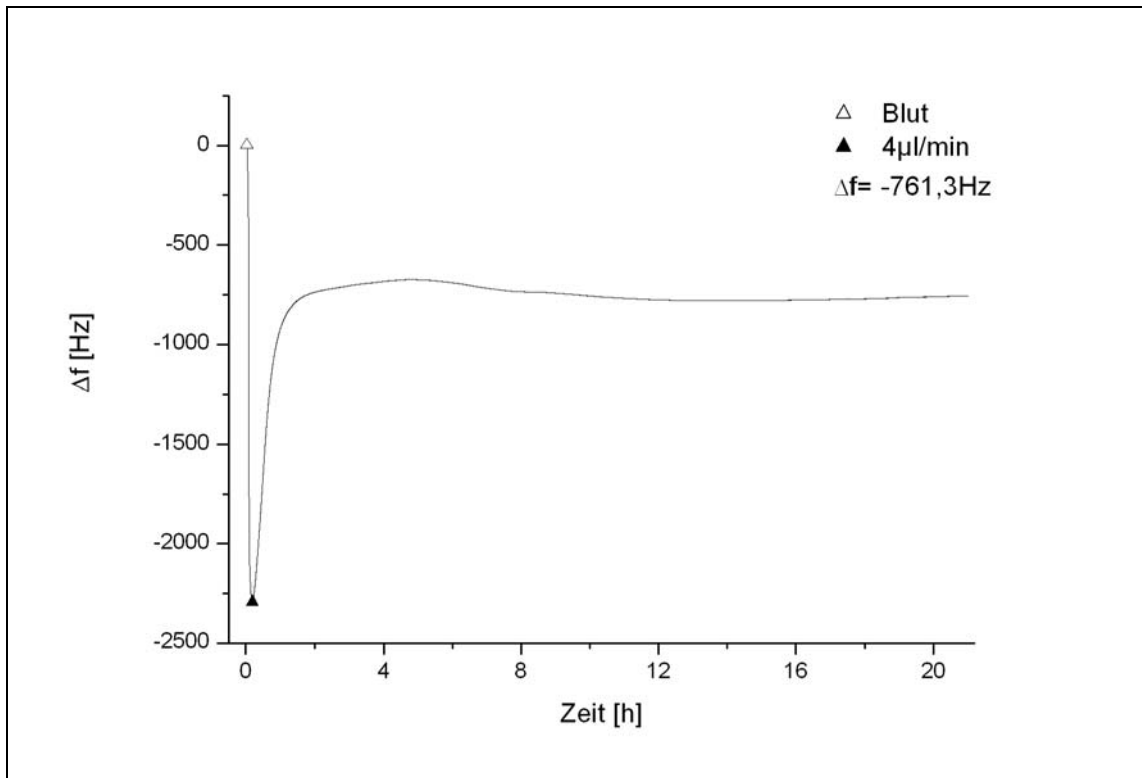


Abbildung 15: Langzeitankopplungsmessung von Erythrozyten an einen PLL-beschichteten Quarz.

Auch diese Messung zeigte ein stabiles Frequenzsignal, welches diesmal sogar über 22 Stunden konstant blieb. Damit war es gelungen, die Bedingungen für die Langzeitankopplungsmessungen so zu optimieren, dass keine störenden Einflüsse auf das Frequenzsignal mehr vorhanden waren.

3.3 Nachweis der Immobilisierung von CSA auf den Quarz

3.3.1 Messungen zur Überprüfung der Ankopplung des biotinylierten CSA auf NAV

Wie bereits im Kapitel 2.2.4.3 erläutert, wurden Ankopplungsmessungen von biotinyliertem CSA an die mit NeutrAvidin beschichtete Quarzoberfläche im Analysegerät Fidget Type Fg T1 durchgeführt, um zu zeigen, dass durch die Biotinylierung des Chondroitinsulfates die Immobilisierung des Rezeptors CSA auf dem Quarz möglich ist. Auf dieser Grundlage sollte es in einem weiteren Schritt gelingen, die Anbindung *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten zu messen.

3.3.1.1 Ankopplungsmessungen von nicht biotinyliertem CSA an NAV-Quarze

Es wurde zunächst eine Negativkontrolle durchgeführt, die zeigen sollte, dass eine Ankopplung von nicht-biotinyliertem CSA auf der NeutrAvidinoberfläche nicht möglich ist (s. Abbildung 16) und es sich bei den anschließenden Ankopplungsmessungen tatsächlich um spezifische Bindungen zwischen der NeutrAvidinschicht und dem biotinylierten CSA handelte. Die Negativkontrolle wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

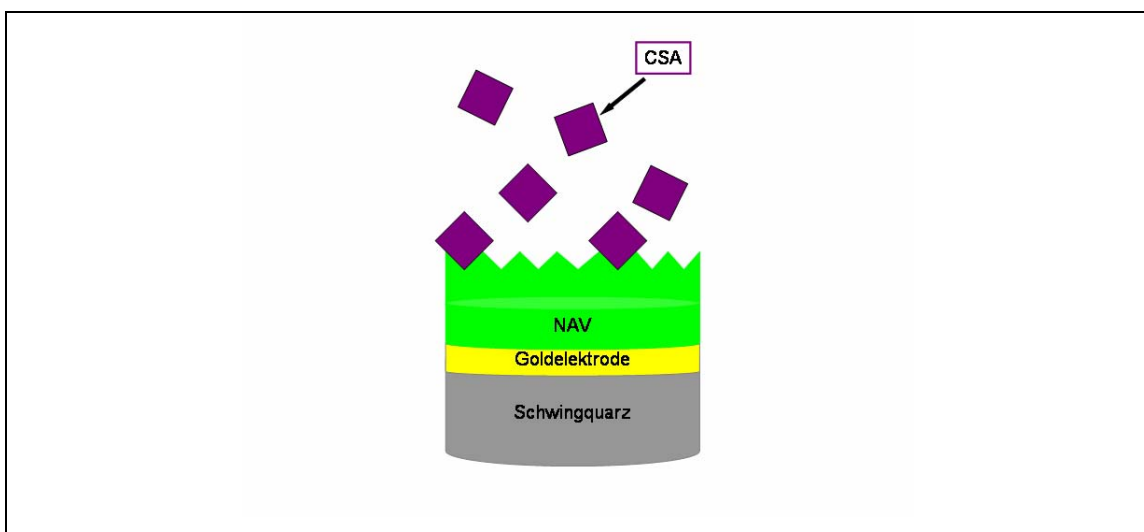


Abbildung 16: Ankopplung von CSA an einen NeutrAvidin-beschichteten Quarz.

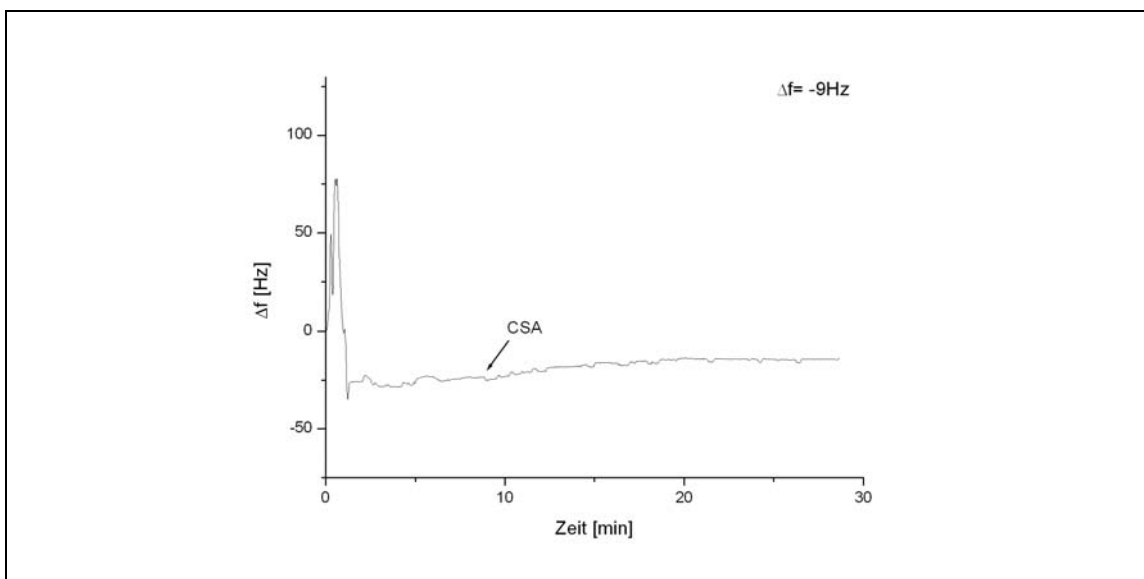


Abbildung 17: Ankopplungsmessung von nicht biotinyliertem CSA an einen NAV-Quarz.

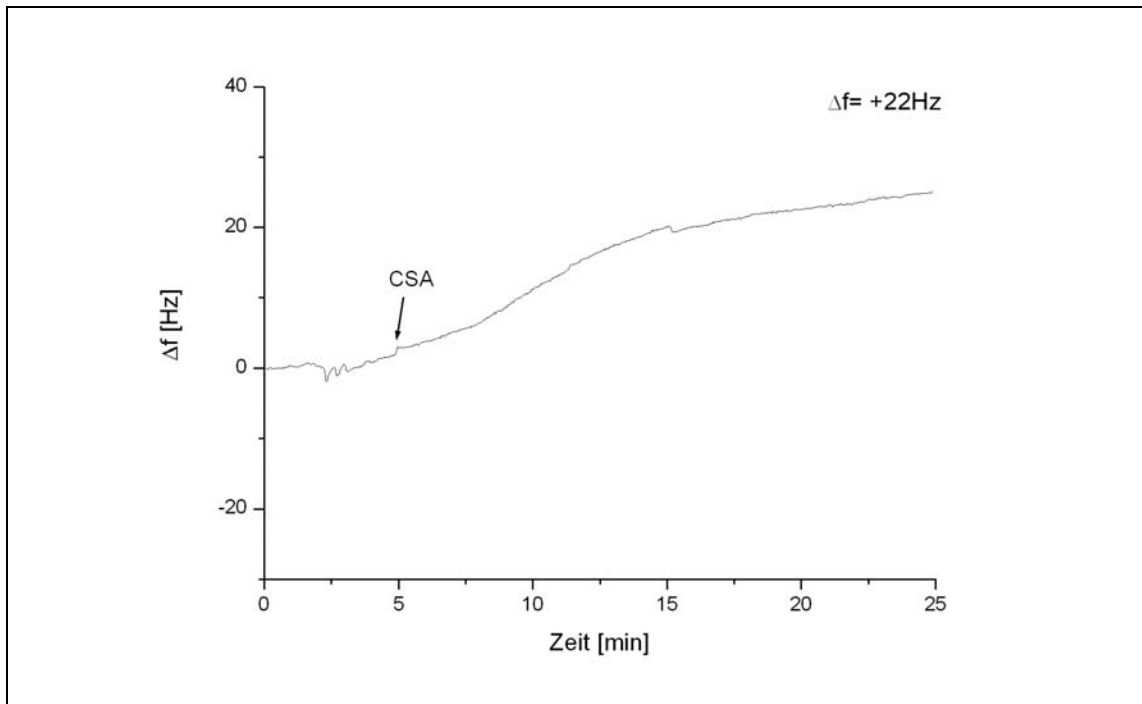


Abbildung 18: Ankopplungsmessung von nicht biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz zur Abklärung unspezifischer Bindungen.

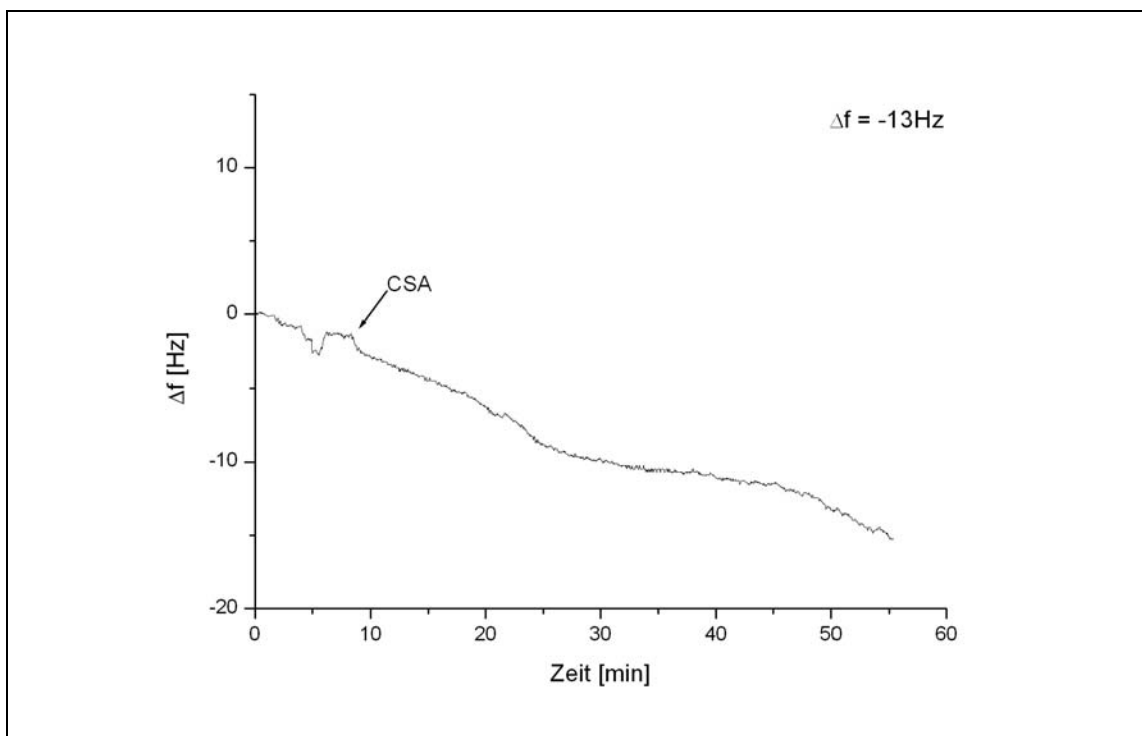


Abbildung 19: Ankopplungsmessung von nicht biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz zur Abklärung unspezifischer Bindungen.

Wie den Messkurven (s. Abbildungen 17-19) zu entnehmen, waren die Negativkontrollen erfolgreich. Die Kurvenverläufe zeigten nach Einleiten der Proben Frequenzänderungen (Δf) zwischen -9Hz und +22Hz. Da bekanntlich biosensorisch aller kleinste Massen erfasst werden können, waren die gemessenen Frequenzänderungen zum Teil durch das spezifische Gewicht ausgelöst, welches das CSA beim Durchfließen der Messzelle auf den Biosensor übertrug. Ebenso können die Frequenzänderungen durch Pumpeffekte ausgelöst worden sein. Diese Frequenzänderungen waren als so geringfügig einzustufen, dass davon ausgegangen werden konnte, dass keine Ankopplung stattgefunden hatte. Dies zeigte sich ebenfalls dadurch, dass nach Einleitung des nicht biotinylierten CSA in die Messkammer keine Bindung an die NeutrAvidinoberfläche zustande kam, was sich in einem Anstieg der Frequenz äußerte (s. Abbildung 18). Als Ursache für diesen Frequenzanstieg waren Viskositätseffekte anzusehen, die beim Übergang von der Spülflüssigkeit (PBS-Puffer) zum nicht biotinylierten CSA auftraten. Die Unterschiede der Kurvenformen kamen durch die zwar standardisierte, aber dennoch manuell durchgeführte Beschichtung der Sensoren mit NeutrAvidin zustande. Damit wurde also gezeigt, dass es zu keiner unspezifischen Bindung von CSA an die NeutrAvidinoberfläche kam.

3.3.1.2 Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze

Durch die Ankopplungsmessungen von biotinyliertem CSA an mit NeutrAvidin beschichteten Schwingquarzsensoren sollte nun die spezifische Ankopplung nachgewiesen werden (s. Abbildung 20). Diese sollte durch einen Frequenzabfall graphisch dargestellt werden. Der für die Ankopplungsmessung verwendete Schwingquarz war wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben vorbereitet. Der so beschichtete Quarz wurde in die Messzelle eingebaut und die Ankopplungsmessung wie in Kapitel 2.2.4.3 erläutert durchgeführt. Die Ankopplungsmessung wurde ebenfalls dreimal durchgeführt.

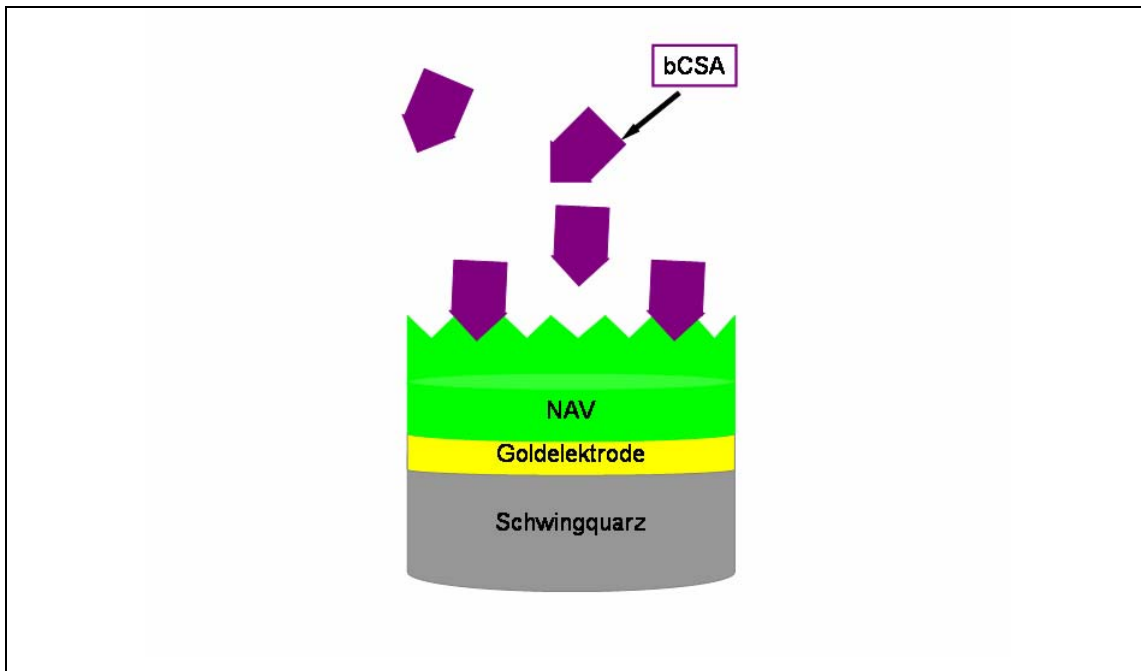


Abbildung 20: Ankopplung von biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz.

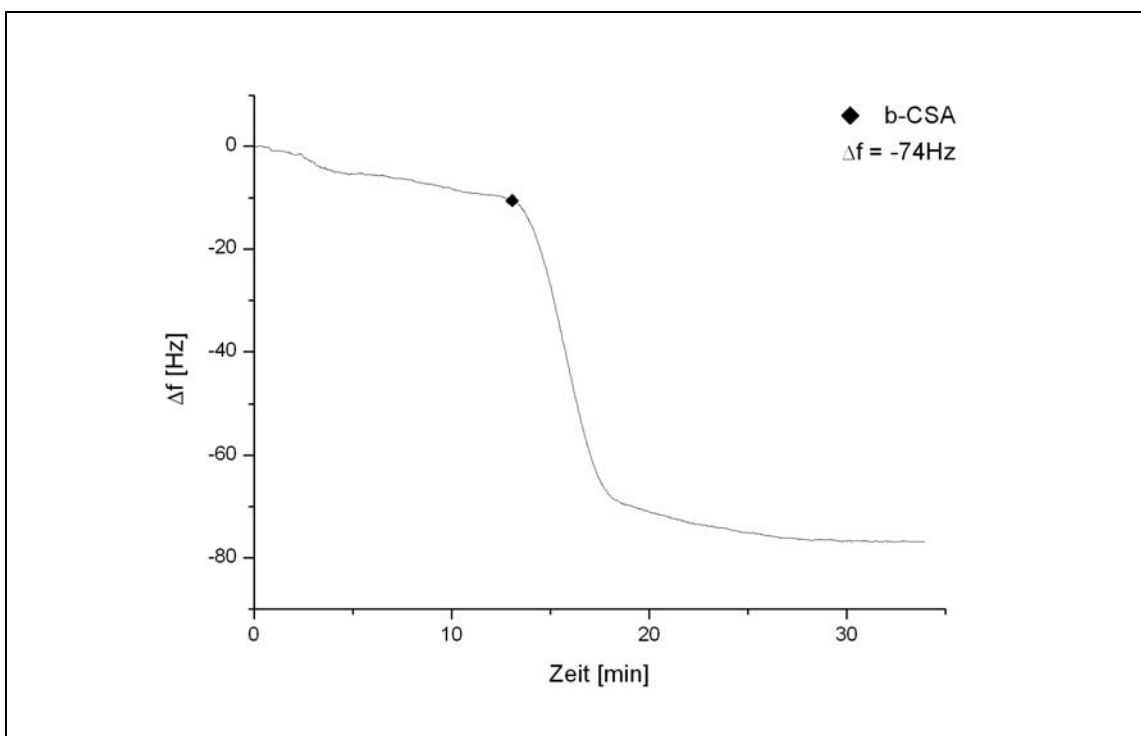


Abbildung 21: Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz zum Nachweis spezifischer Bindungen.

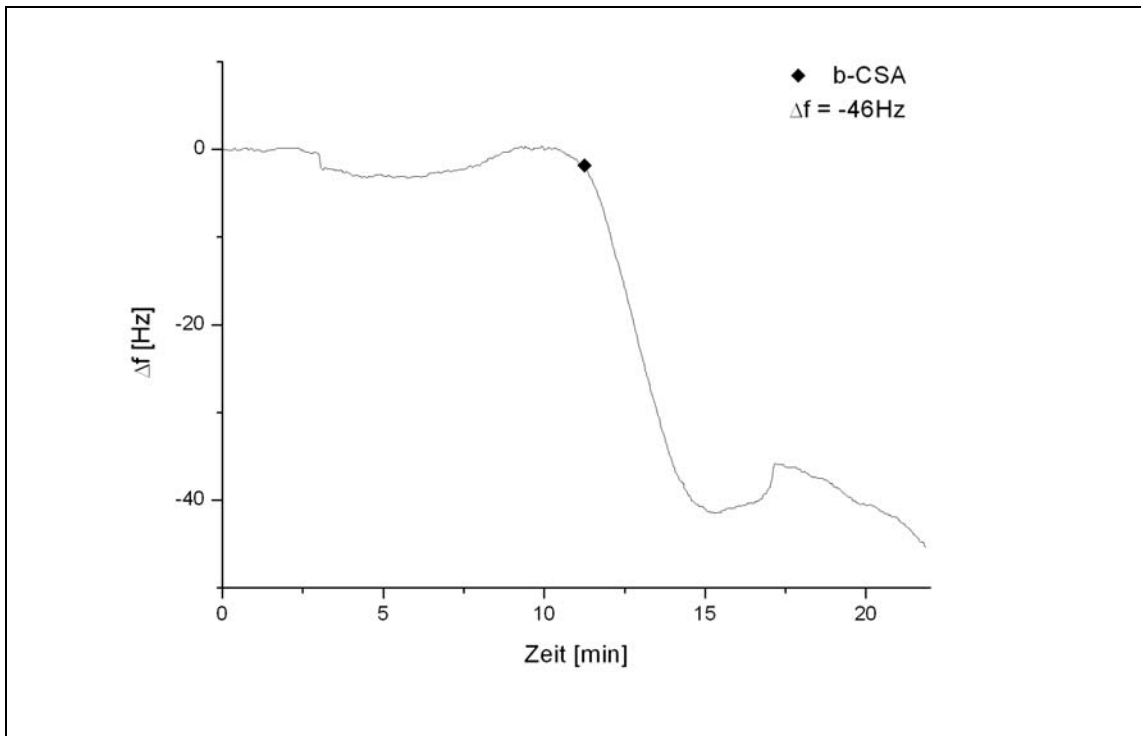


Abbildung 22: Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz zum Nachweis spezifischer Bindungen.

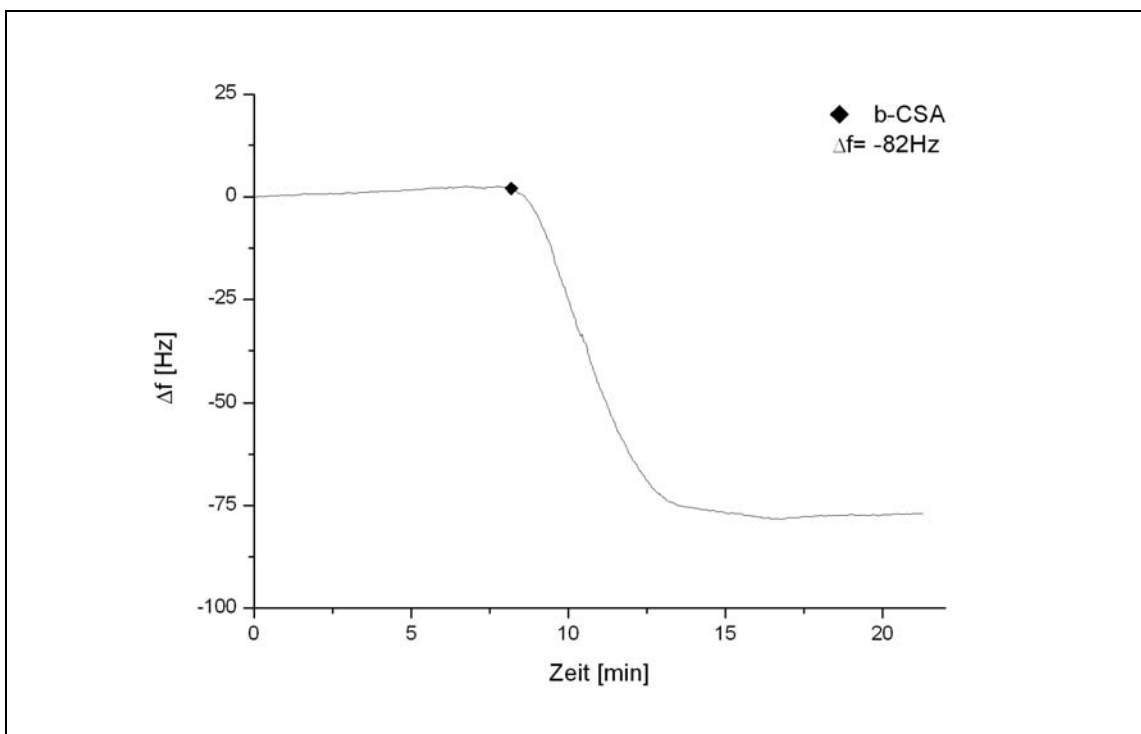


Abbildung 23: Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz zum Nachweis spezifischer Bindungen.

Die Ankopplungsmessungen von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze (s. Abbildungen 21-23) waren erfolgreich. Die Kurvenverläufe wiesen nach Einleiten der Proben Frequenzänderungen (Δf) zwischen -46Hz und -82Hz auf. Dies zeigte, dass es zwischen der NeutrAvidinschicht und dem biotinylierten CSA zu einer spezifischen Bindung gekommen war, die sich biosensorisch und damit auch graphisch in einer dauerhaften Änderung des Frequenzsignals niederschlug.

3.3.1.3 Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze mit anschließender Ankopplung von NAV

Die Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze mit anschließender Ankopplung von NAV im Analysegerät *Fidget Type Fg T1* sollte der Kontrolle dienen, ob der Schwingquarz durch die externe Beschichtung mit NeutrAvidin bereits voll belegt ist, oder ob es noch freie Bindungsstellen auf dem Quarz gibt (s. Abbildung 24). Die Ankopplungsmessung wurde wie in Kapitel 2.2.4.3 erklärt durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine Probe aus biotinyliertem CSA über den Quarz geleitet, um alle freien Bindungsstellen am NeutrAvidin zu blockieren. Wären jetzt noch freie Bindungsstellen für NeutrAvidin auf dem Schwingquarz vorhanden, würde es nach erneutem Einleiten von NeutrAvidin in die Messkammer zu einem weiteren Frequenzabfall kommen. Nach Einleitung der ersten Probe wurde also weiter mit PBS-Puffer gespült, bis sich das Signal nach dem erwarteten Frequenzabfall stabilisiert hatte. Nun wurde eine weitere Probe, bestehend aus NeutrAvidin 1:10 in PBS-Puffer verdünnt, ebenfalls mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 μ l/min über den Quarz geleitet.

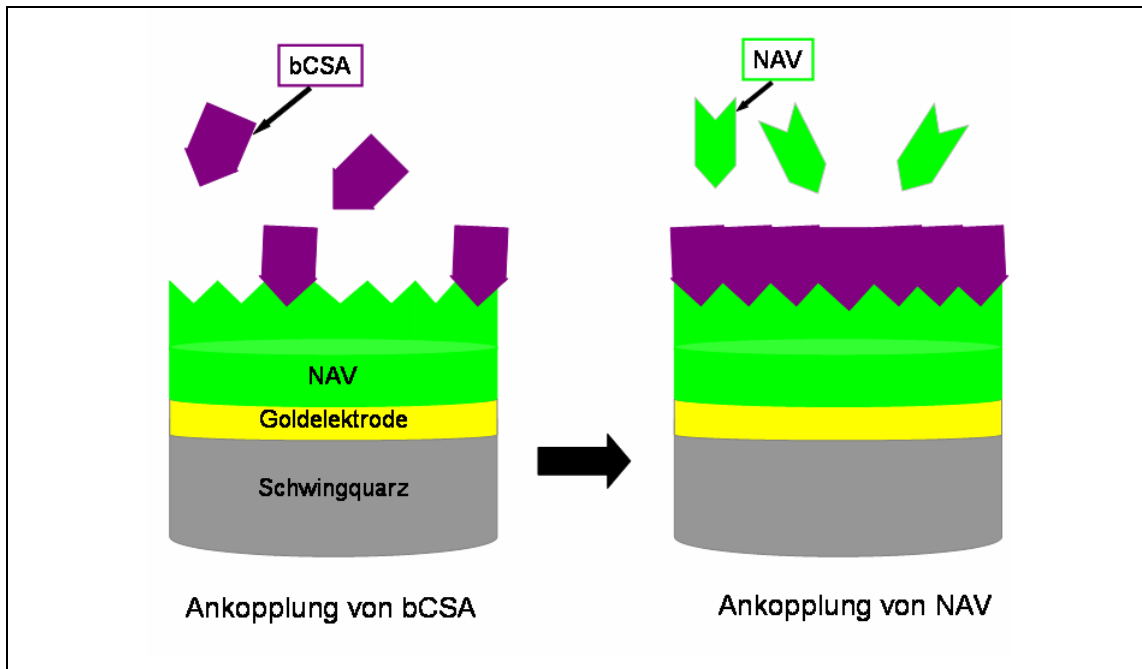


Abbildung 24: Ankopplung von biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz mit anschließender Ankopplung von NAV.

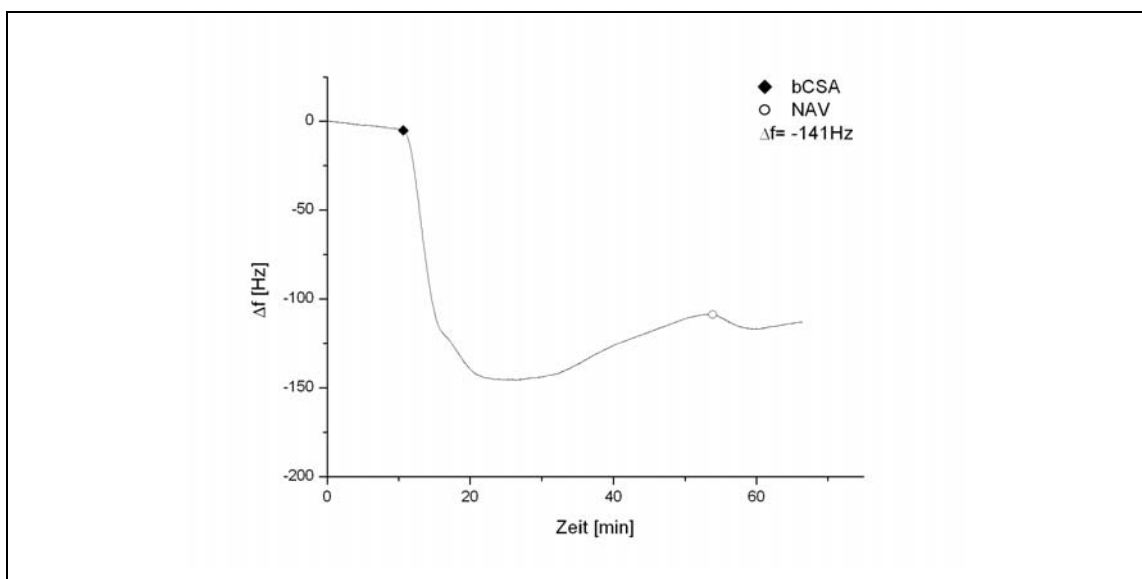


Abbildung 25: Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz mit anschließender Ankopplung von NAV.

Der Kurvenverlauf (s. Abbildung 25) zeigte nach Einleitung der ersten Probe aus biotinyliertem CSA wie erwartet einen Frequenzabfall um -141Hz. Nach Einleiten der NeutrAvidinprobe kam es zu einem geringen Abfall der Frequenz und gleich darauf zu einem Anstieg um den entsprechenden Betrag. Dies zeigte, dass keine weitere NeutrAvidinbindung auf der Quarzoberfläche möglich

war und bedeutete gleichermaßen, dass durch die externe Beschichtung des Schwingquarzes mit NeutrAvidin eine dicht belegte Quarzoberfläche erreicht worden war.

3.3.1.4 Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze mit anschließender erneuter Ankopplung von biotinyliertem CSA

Folgender Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die mit NeutrAvidin beschichtete Schwingquarzoberfläche durch die Ankopplung von biotinyliertem CSA in der Konzentration 1mg/ml bereits voll belegt war, oder ob es noch freie Bindungsstellen gab. Dazu wurde eine zweite Probe aus biotinyliertem CSA in der Konzentration 5mg/ml über den Quarz geleitet. Käme es dadurch zu einem erneuten Abfall der Frequenz, wären noch freie Bindungsstellen vorhanden. Die Ankopplungsmessung wurde entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.2.4.3 durchgeführt.

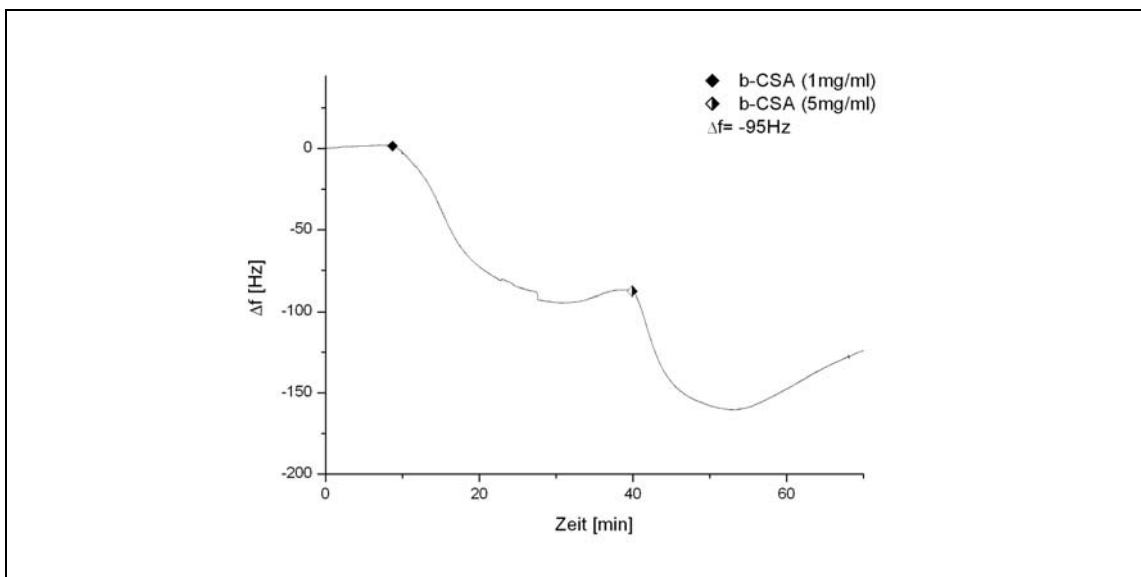


Abbildung 26: Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz mit anschließender erneuter Ankopplung von biotinyliertem CSA.

Die Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an den mit NeutrAvidin beschichteten Quarz (s. Abbildung 26) verlief erfolgreich. Der Kurvenverlauf wies nach Einleiten der ersten Proben eine erwartungsgemäße Frequenzänderung von -95Hz auf. Nach Einleitung der zweiten Probe fiel die Frequenz zunächst ab, um gleich darauf jedoch wieder anzusteigen. Der

Anstieg erreichte nicht die Ausgangsfrequenz, was wiederum bedeutete, dass die biotinylierten CSA-Moleküle der zweiten Probe zu einem ganz geringen Anteil freien Bindungsstellen vorfanden, größtenteils jedoch nur eine vorübergehende Massenänderung auf dem Schwingquarz verursachten. Die Tatsache, dass nur eine sehr geringe weitere Ankopplung erfolgen konnte, zeigte, dass eine einmalige Ankopplung von biotinyliertem CSA in der Konzentration 1mg/ml ausreichend war, um eine vollständige Belegung der Schwingquarzoberfläche zu erreichen.

3.3.1.5 Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an NAV-Quarze mit anschließender Ankopplung von biotinyliertem BSA

Eine weitere Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an einen mit NeutrAvidin beschichteten Schwingquarz wurde mit der Absicht durchgeführt, zu überprüfen, ob alle Bindungsstellen am NeutrAvidin mit biotinyliertem CSA belegt wurden, oder ob es noch freie Bindungsstellen gab. Dazu wurde biotinyliertes BSA in gleicher Konzentration als zweite Probe in die Messkammer geleitet, um zu sehen, ob eine weitere Ankopplung stattfinden würde (s. Abbildung 27).

Die Ankopplungsmessung wurde ebenfalls gemäß der Beschreibung in Kapitel 2.2.4.3 durchgeführt. Nach Stabilisierung des ersten Frequenzabfalls wurde die zweite Probe, bestehend aus biotinyliertem BSA 1:10 in PBS-Puffer verdünnt, ebenfalls mit einer Fließgeschwindigkeit von 100µl/min über den Quarz geleitet.

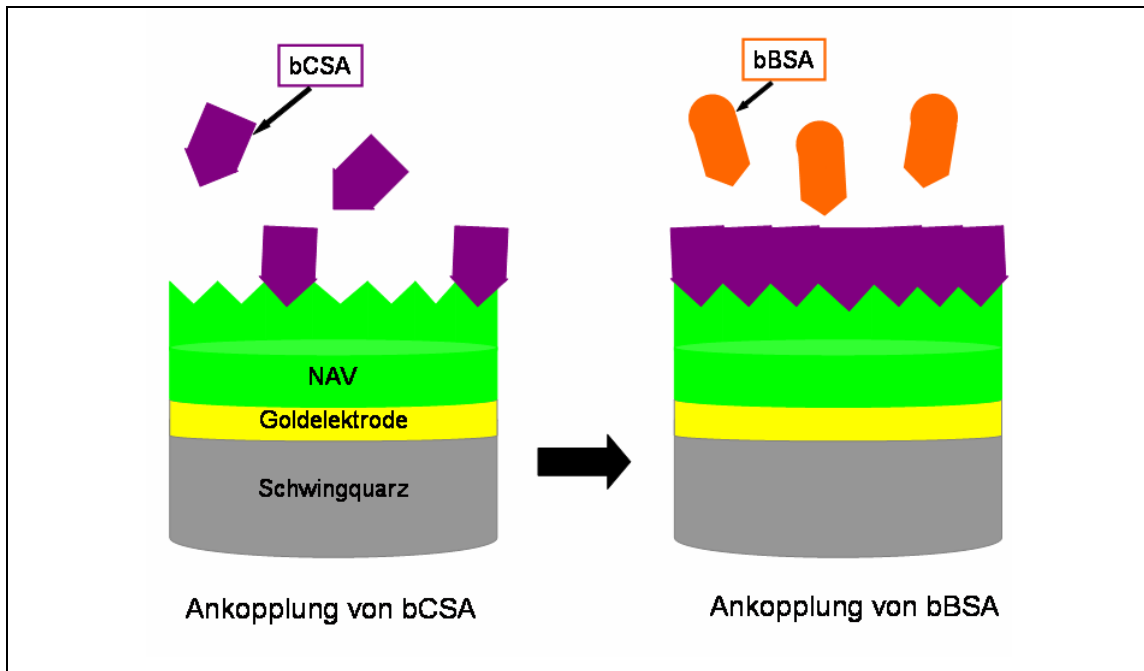


Abbildung 27: Ankopplung von biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz mit anschließender Ankopplung von biotinyliertem BSA.

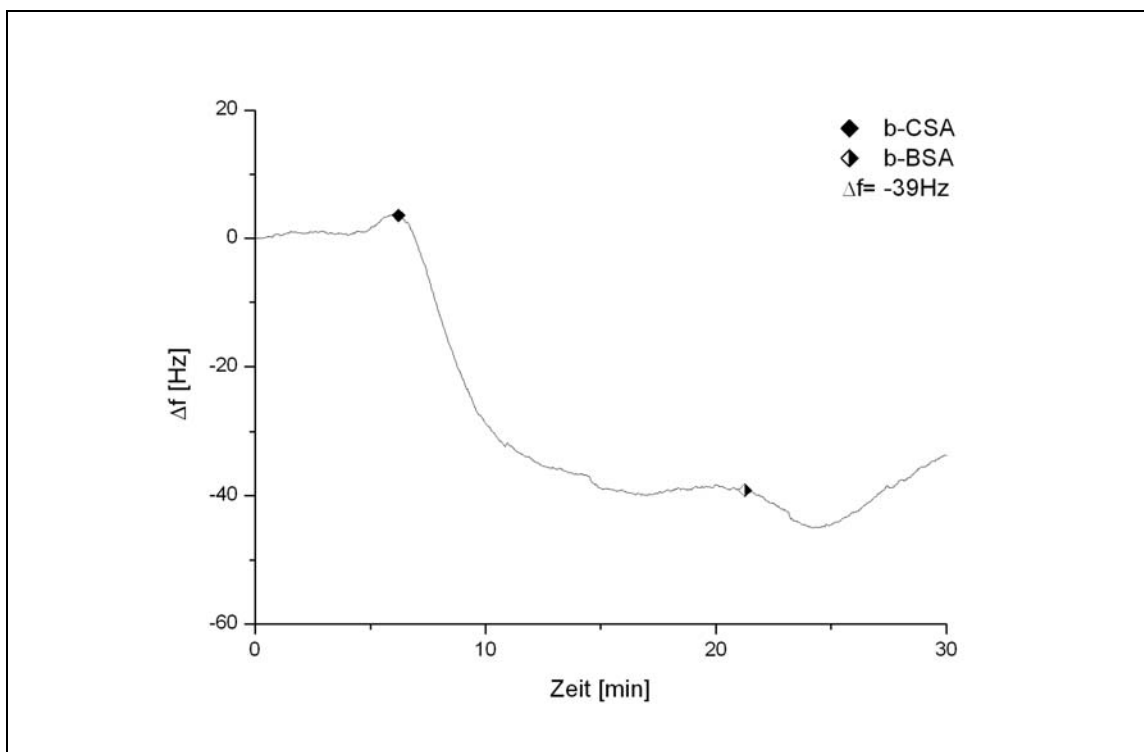


Abbildung 28: Ankopplungsmessung von biotinyliertem CSA an einen NAV-beschichteten Quarz mit anschließender Ankopplung von biotinyliertem BSA.

Abbildung 28 zeigte einen etwas geringer als erwarteten Frequenzabfall um -39Hz nach Einleitung der ersten Probe aus biotinyliertem CSA in die Messkammer. Nach Signalstabilisierung erfolgte die Einleitung des zweiten Analyten. Die Kurve zeigte den charakteristischen Verlauf, bei dem es zu keiner weiteren Ankopplung von biotinyliertem BSA kam. Folglich war die NeutrAvidinschicht bereits im ersten Schritt optimal belegt und wies somit keine freien Bindungsstellen mehr auf.

3.4 Ankopplungsmessungen von *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten bzw. Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen

In Teil 3.4 dieser Arbeit wurden die gewonnenen Ergebnisse der Schichtoptimierung, der Immobilisierung der Rezeptoren CD36 und CSA auf den Schwingquarz sowie der Optimierung der Bedingungen für Langzeitmessungen auf die Ankopplungsmessungen von *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten beziehungsweise von Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen angewendet.

3.4.1 Negativkontrollen und Positivkontrolle zu den Ankopplungsmessungen von *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten bzw. Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen

Um zu ermitteln, ob die Bindung der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten an den auf PLL immobilisierten C32-Membranen spezifisch ist, wurden Negativkontrollen unter Standardbedingungen durchgeführt. Um die Ergebnisse der folgenden Ankopplungsmessungen zu verifizieren, wurden zunächst Negativkontrollen als externe Ankopplungen mit verschiedenen Beschichtungen sowie eine Positivkontrolle angefertigt, die im Vergleich das Ankopplungsverhalten infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten veranschaulichten. In einem zweiten Schritt wurden Ankopplungsmessungen als Negativkontrollen durchgeführt.

3.4.1.1 Externe Ankopplungen

Für die externen Ankopplungen wurden *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrozyten und Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ in der Verdünnung 1:10 mit RPMI auf reine Goldquarze sowie auf Quarze mit unterschiedlichen Beschichtungen aufgebracht, für 2,5 Stunden inkubiert und anschließend mit Medium abgespült, mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. Die

Oberfläche des Quarzes wurde dabei auf anhaftende Erythrozyten untersucht und fotografiert.

Unmittelbar vor dem Auftragen der Probe auf die Quarze wurde zur Qualitätskontrolle ein Ausstrich angefertigt (s. Abbildung 29), der eine hohe Anzahl vitaler, *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten im Trophozoiten- und Schizontenstadium zeigte.

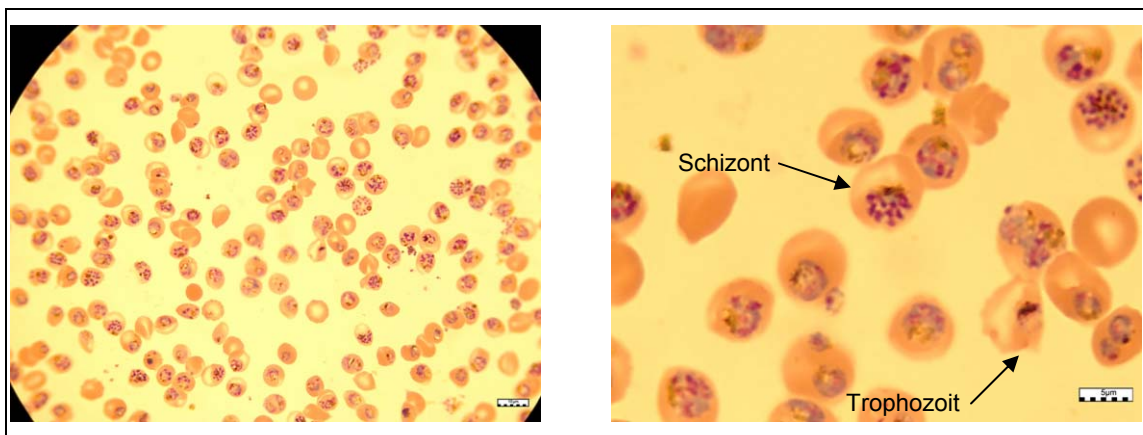


Abbildung 29: Blutausstrich, Vergrößerung: 1000x.

a) keine Beschichtung

Versuch der externen Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten im Vergleich zur Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat auf unbeschichteten Goldquarzen. Es kam zu einer sehr vereinzelt Anhaftung sowohl von infizierten als auch von nicht-infizierten Erythrozyten an der reinen Goldoberfläche (s. Abbildung 30).

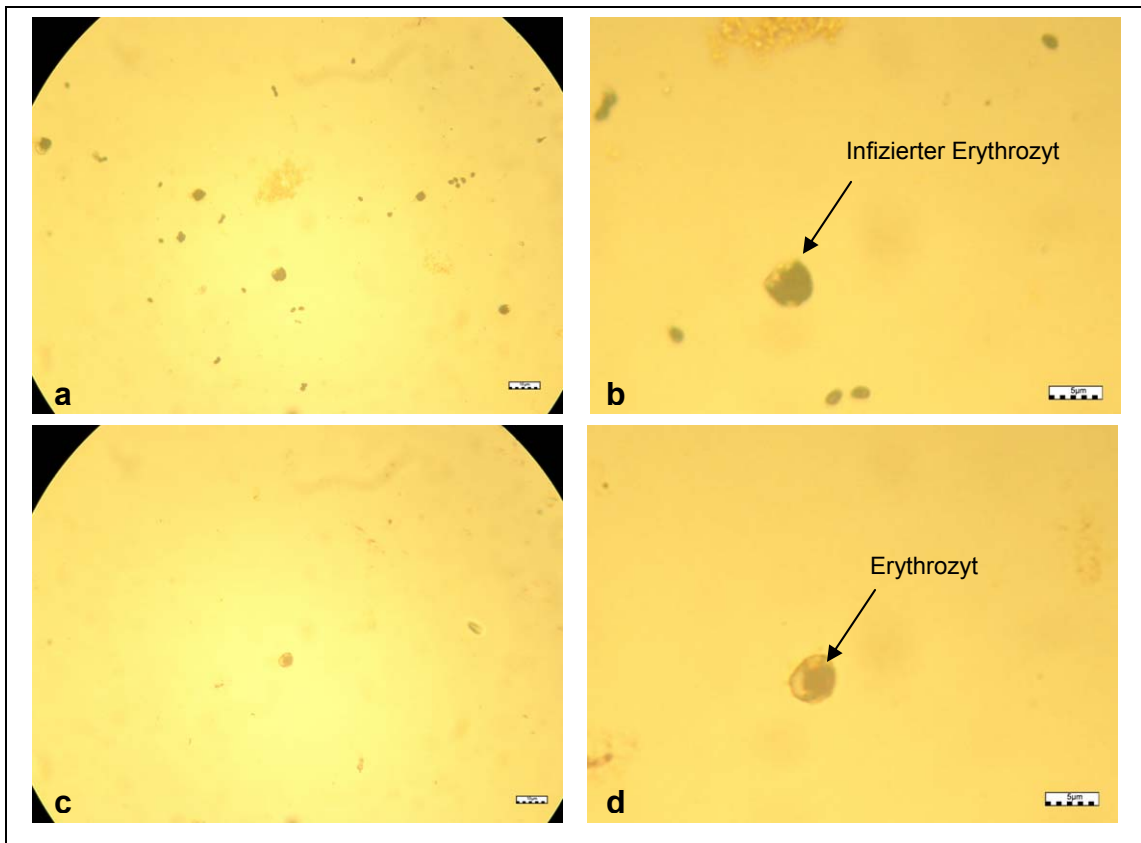


Abbildung 30: a: externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung: 1000x c: externe Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat, Vergrößerung: 500x. d: Vergrößerung: 1000x.

b) Beschichtung mit anti-CD36-Antikörper

Zunächst wurden die Quarzoberflächen wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben mit auf PLL immobilisierten C32-Membranen beschichtet. Die Rezeptoren der C32-Membranen (CD36) wurden anschließend durch die Inkubation mit anti-CD36-Antikörper 1:10 in PBS-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, um die Bindung von FCR3-CD36 an die Membranen zu verhindern. Auf dieser Beschichtung wurde die externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten im Vergleich zur Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat durchgeführt. Der gegen CD36 gerichtete Antikörper verhinderte die Bindung infizierter Erythrozyten, es kam auch zu keiner Anbindung nicht infizierter Erythrozyten an der Oberfläche (s. Abbildung 31).

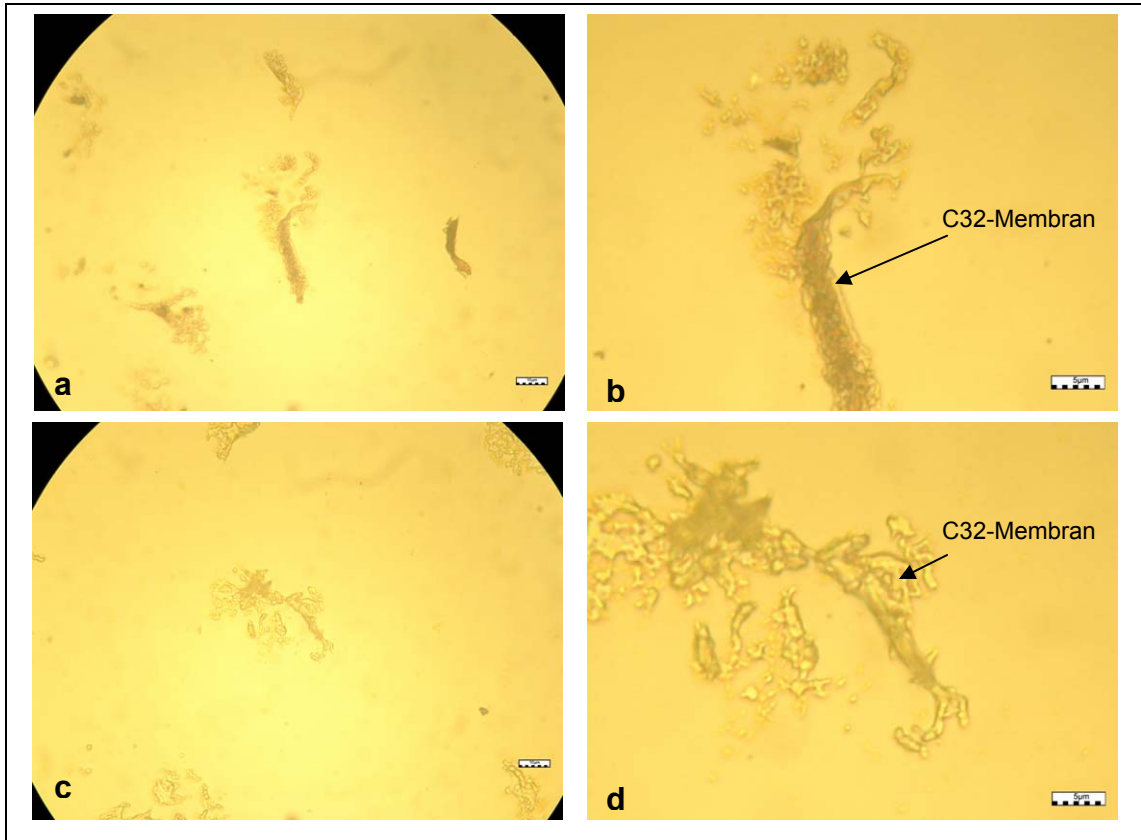


Abbildung 31: a: externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung 1000x c: externe Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat an mit anti-CD36-Antikörper blockierte C32-Membranen, Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

c) Beschichtung mit CD36 Binding Medium

Die Oberflächen zweier Quarze wurden wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben mit Poly-L-Lysin beschichtet, anschließend wurden die Quarze mit CD36 Binding Medium für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auf den einen Quarz wurden FCR3-CD36-infizierte Erythrozyten aufgebracht, auf den anderen Erythrozytenkonzentrat zur Kontrolle. Es zeigte sich eine sehr geringe, vereinzelte Anhaftung infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten an der Oberfläche (s. Abbildung 32).

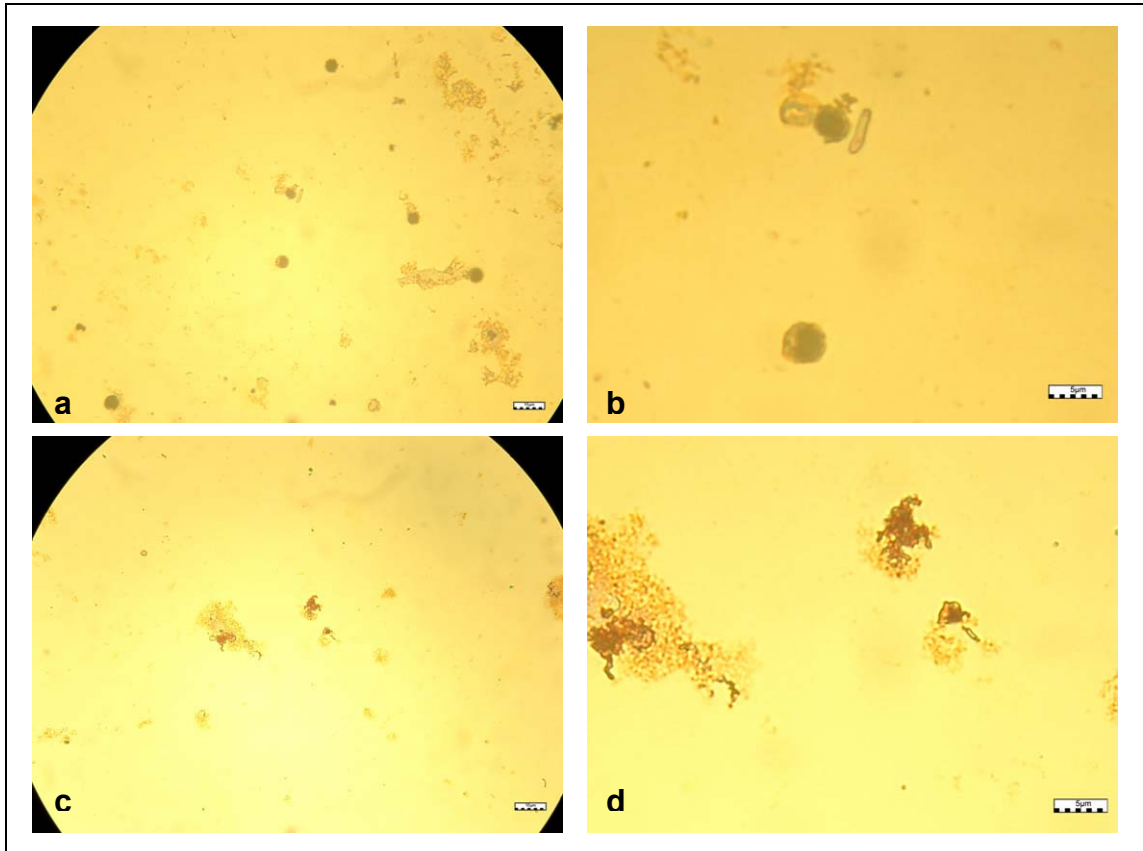


Abbildung 32: a: externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung 1000x c: externe Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat an CD36 Binding Medium. Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung 1000x.

d) Beschichtung mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+)

Die beiden Quarze wurden zunächst wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben mit Poly-L-Lysin beschichtet und anschließend mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten im Vergleich zur Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat auf jeweils einem Quarz. Es zeigte sich keine Bindung infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten an den Oberflächen (s. Abbildung 33).

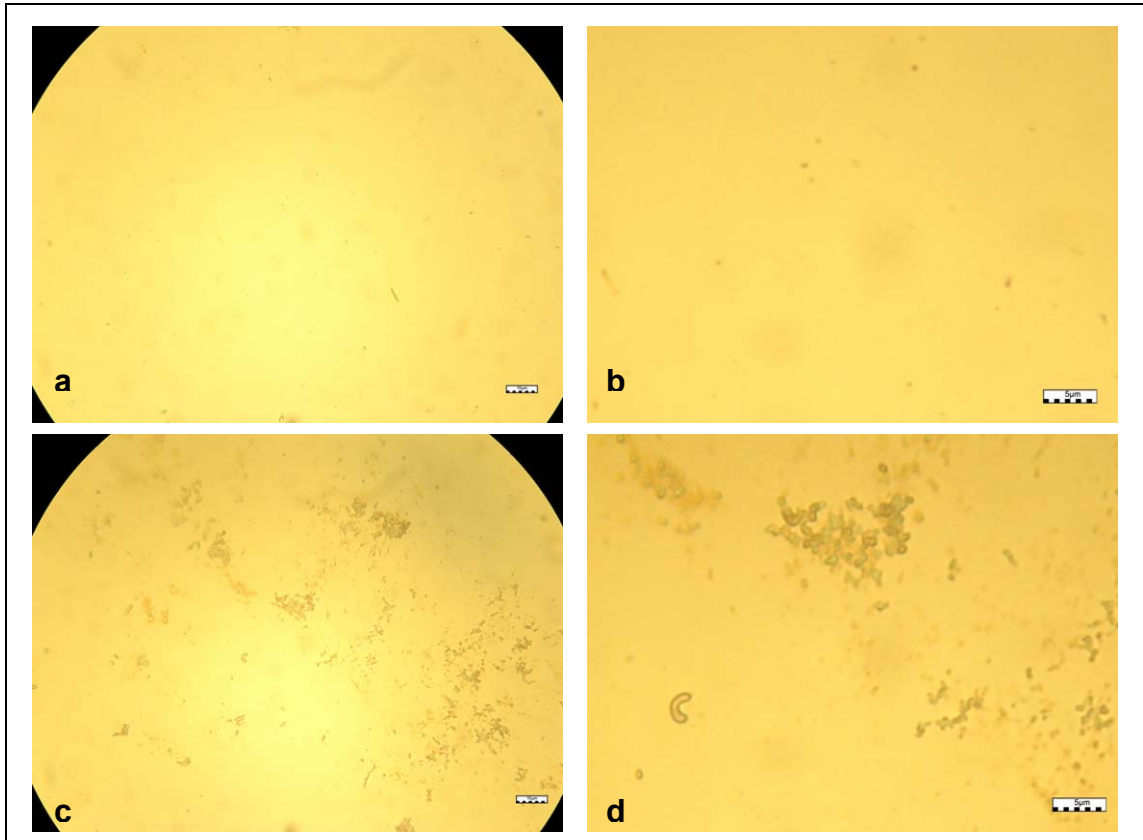


Abbildung 33: a: externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung: 1000x c: externe Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat an Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+). Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

e) Beschichtung mit BSA

Die Quarze wurden zunächst mit Poly-L-Lysin beschichtet. Anschließend wurden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur mit BSA inkubiert. Die externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten im Vergleich zur Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat ergab eine sehr vereinzelte und geringfügige Anhaftung infizierter ebenso wie nicht-infizierter Erythrozyten an der Oberfläche (s. Abbildung 34).

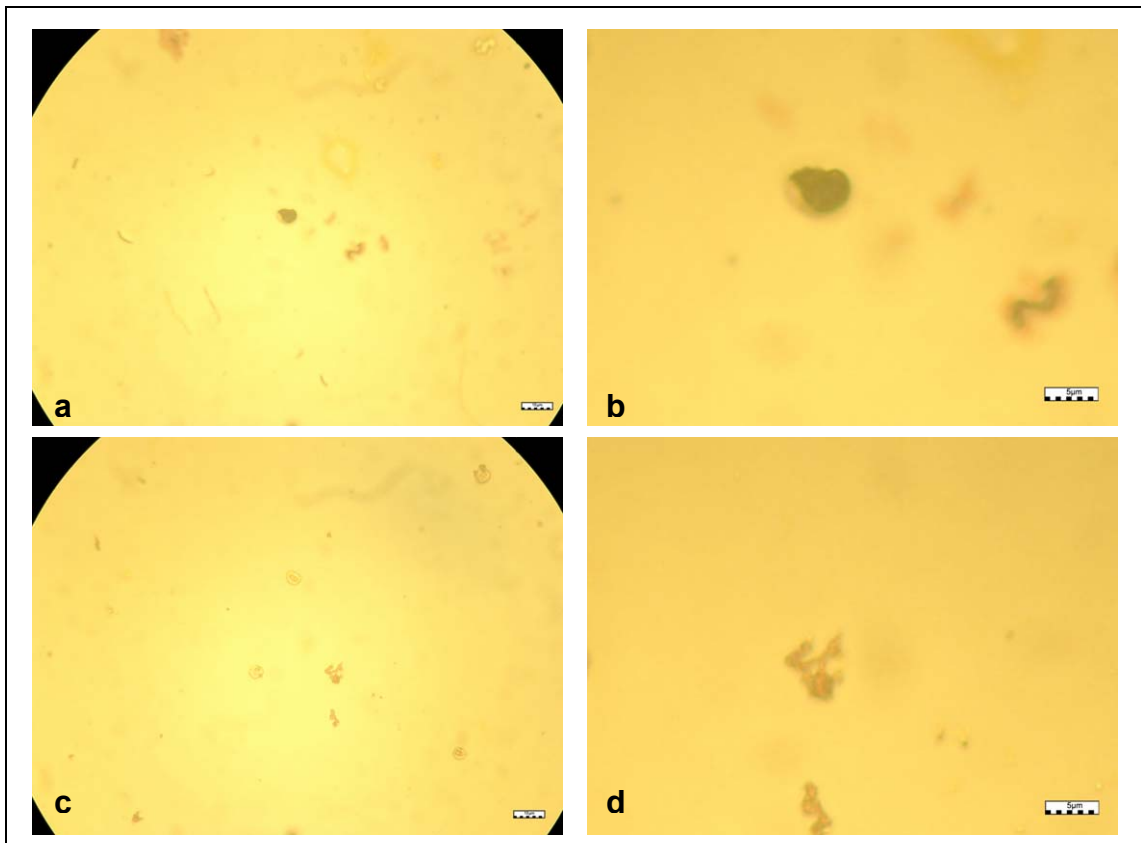


Abbildung 34: a: externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten, Vergrößerung 500x b: Vergrößerung: 1000x c: externe Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat an BSA. Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

Um vergleichend zu den Negativkontrollen die spezifische Ankopplung *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an die auf der Quarzoberfläche immobilisierten C32-Membranen darzustellen, wurde im folgenden Abschnitt eine Positivkontrolle durchgeführt. Dabei wurde außerdem gezeigt, dass diese spezifische Bindung nur zwischen der entwickelten Beschichtung mit C32-Membranen und infizierten Erythrozyten möglich ist und eben nicht beim Erythrozytenkonzentrat, sodass dieses in folgenden Ankopplungsmessungen zuverlässig als Negativkontrolle dienen konnte.

f) Beschichtung mit auf PLL immobilisierten C32-Membranen

Die beiden Quarze wurden entsprechend dem in Kapitel 2.2.1.3 erläuterten Beschichtungsprotokoll mit auf PLL immobilisierten C32-Membranen beschichtet. Es folgte die externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten und im Vergleich dazu die Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat.

Der Versuch zeigte deutlich die Bindung *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an Rezeptoren der C32-Membranen (s. Abbildung 35). Im Vergleich dazu kam es zu keiner Bindung von Erythrozytenkonzentrat an die beschichtete Quarzoberfläche.

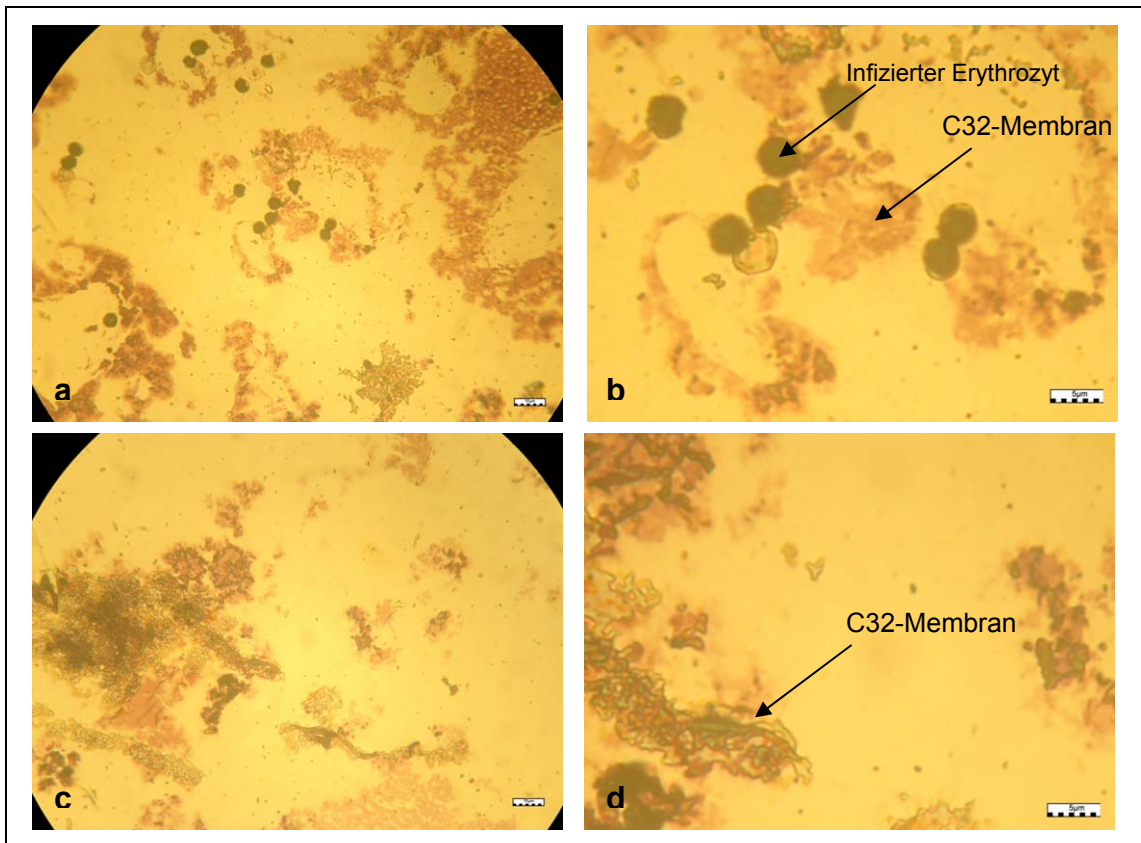


Abbildung 35: a: externe Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung: 1000x c: externe Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen, Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

Damit konnte aus oben stehenden Ergebnissen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass im Vergleich zu den verschiedenen im Abschnitt Negativkontrolle getesteten Oberflächenbeschichtungen, nur bei der für die Positivkontrolle angewendeten Beschichtung eine deutliche Anlagerung infizierter Erythrozyten gesehen werden konnte. Dies zeigte, dass die Bindung der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten an den auf PLL immobilisierten C32-Membranen äußerst spezifisch war.

3.4.1.2 Ankopplungsmessungen zur Negativkontrolle

Die aus den externen Ankopplungen gewonnenen Erkenntnisse wurden nun im folgenden Abschnitt verwendet, um mittels QCM-Ankopplungsmessungen auf den jeweiligen Beschichtungssystemen auch ein sensorisches Ergebnis der Negativkontrollen zu erhalten. Die externen Ankopplungsversuche haben ergeben, dass die Blockierung der PLL-Schicht mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+) und mit BSA, sowie die Blockierung der Bindungsstellen an den C32-Membranen mit anti-CD36-Antikörper, die Anlagerung infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten durch unspezifische Bindungen am wirkungsvollsten verhinderten. Nun wurde geprüft, ob sich die Ergebnisse der externen Ankopplungen auch auf die Ankopplungsmessungen im Analysegerät Fidget Type Fg T1 übertragen ließen. Ziel war es, unspezifische Bindungen auszuschließen, um den Nachweis zu erbringen, dass alle im Folgenden gewonnenen Messwerte tatsächlich auf spezifischen Bindungen zwischen C32-Membranen und *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten zurückzuführen sind.

a) Blockierung mit anti-CD36-Antikörper

Für die Messung wurden die Schwingquarze mit auf PLL immobilisierten C32-Membranen beschichtet (s. Kapitel 2.2.1.4) und anschließend die Rezeptoren mit anti-CD36-Antikörper blockiert, um die Bindung von FCR3-CD36 an CD36 zu verhindern. Die Ankopplungsmessung wurde wie in Kapitel 2.2.5 ausführlich erläutert durchgeführt. Zu Beginn und nach Ende der Messung wurde ein Ausstrich angefertigt (s. Abbildung 36), um die Vitalität und das Stadium der Parasiten mikroskopisch zu beurteilen. Dabei zeichneten sich vitale Parasiten dadurch aus, dass sie im Inneren der Erythrozyten lagen, so wie es im Ausstrich zu Beginn der Messung gesehen werden konnte. Die Parasiten befanden sich im späten Trophozoiten- und Schizontenstadium (s. Abbildung 36a und b). Nach Ende der Messung war ein Teil der Parasiten außerhalb der Erythrozyten lokalisiert (s. Abbildung 36c und d), was bedeutete, dass es im Verlauf der Messung zur Freisetzung von Merozoiten gekommen war.

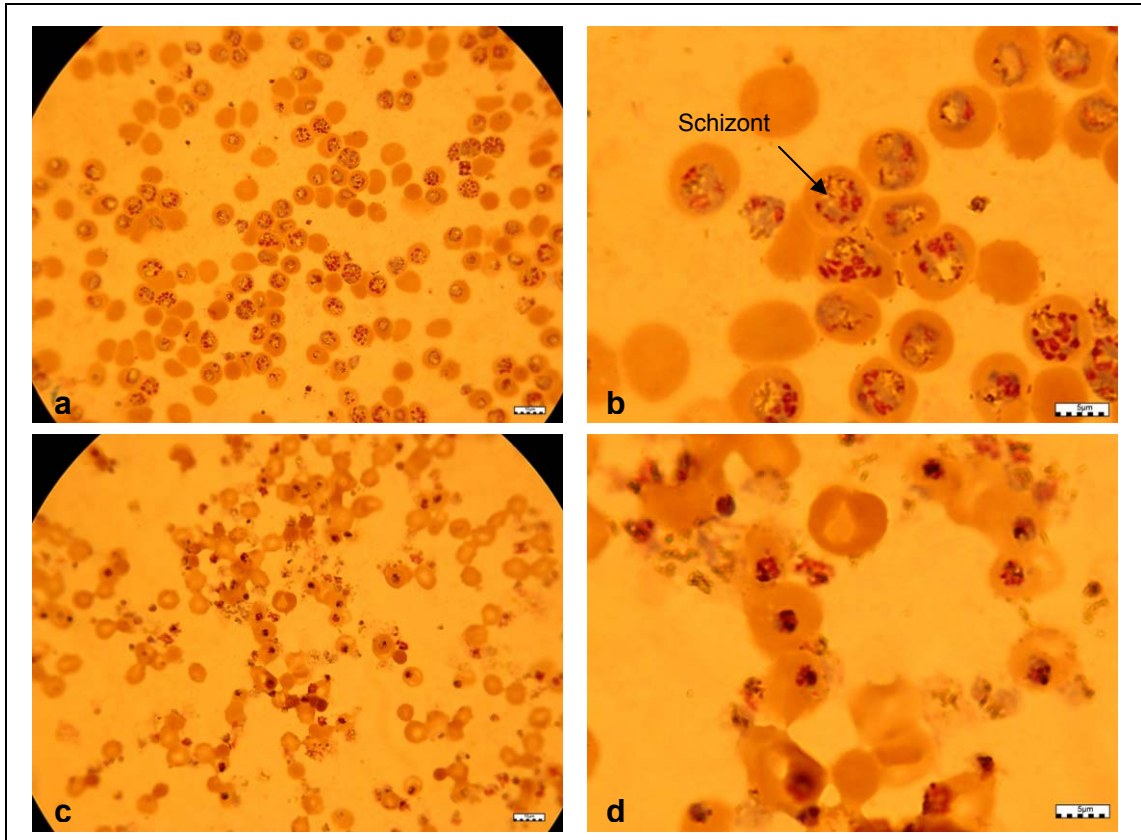


Abbildung 36: a: Blutausstrich zu Beginn der Messung, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung: 1000x c: Blutausstrich nach Beenden der Messung, Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

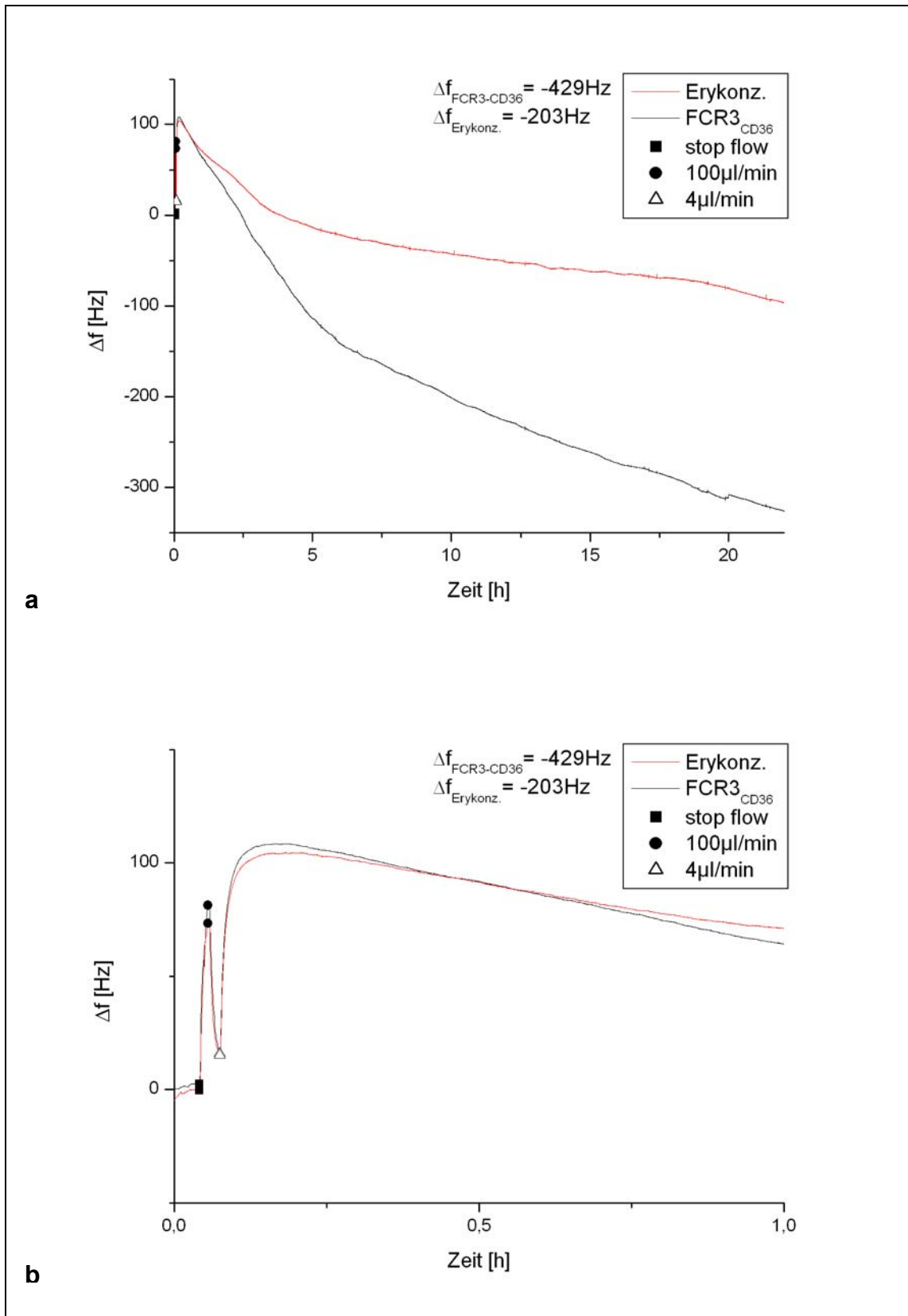


Abbildung 37: Blockierung mit anti-CD36-Antikörper : a: Übersicht b: Ausschnitt Messbeginn.

Abbildung 37b zeigt den Ausschnitt der Kurvenverläufe während der Einleitung der Proben in die Messkammern und die damit verbundenen typischen, nahezu deckungsgleichen Verläufe, die durch Ein- und Ausschalten der Pumpen verursacht wurden. Abbildung 37a zeigt außerdem den gesamten weiteren Kurvenverlauf nach Zurückschalten der Pumpen auf 4µl/min. Der Kurvenverlauf nach dem letzten großen Anstieg war also charakteristisch für den Effekt der eingeleiteten Proben auf dem Schwingquarz. Die Frequenz, die mit dem Einfluss des Erythrozytenkonzentrates korrelierte (in den Abbildungen 37a und b rot dargestellt), zeigte im Verlauf einen Frequenzabfall um -203Hz. Das Signal der Probe aus FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten (in den Abbildungen 37a und b schwarz dargestellt) zeigte einen Frequenzabfall um -429 Hz. Diese Kurvenverläufe sprachen eindeutig dafür, dass es zu einer Ankopplung der Proben an die Quarzbeschichtung gekommen war, die im Falle der Parasiten etwa doppelt so hoch war wie bei der Kontrolle. Dies ließ schließen, dass es zu unspezifischen Bindungen sowohl zwischen Erythrozytenkonzentrat als auch zwischen infizierten Erythrozyten und der Oberfläche gekommen war. Außerdem war die Blockierung mit anti-CD36-Antikörper nicht ausreichend, sodass es hier zu einer deutlich stärkeren Anlagerung infizierter Erythrozyten kommen konnte. Der Versuch musste als nicht erfolgreich gewertet werden, da es durch die Blockierung der Bindungsstellen an den C32-Membranen zu keiner Anlagerung hätte kommen dürfen. Auch die mikroskopische Auswertung der Quarzoberfläche (s. Abbildung 38) korrelierte mit dem Ergebnis der Messung: Der Probenquarz (s. Abbildung 38a und b) zeigte eine Anlagerung infizierter Erythrozyten, sowohl an den C32-Membranen, als auch an der PLL-Beschichtung. Auf dem Kontrollquarz (s. Abbildung 38c und d) lag eine deutliche Ankopplung von Erythrozyten vor – hier als „Ghosts“ (Bezeichnung für die leere Erythrozytenmembran) dargestellt, da die Erythrozyten vermutlich durch die Fixierung in Methanol geschädigt wurden.

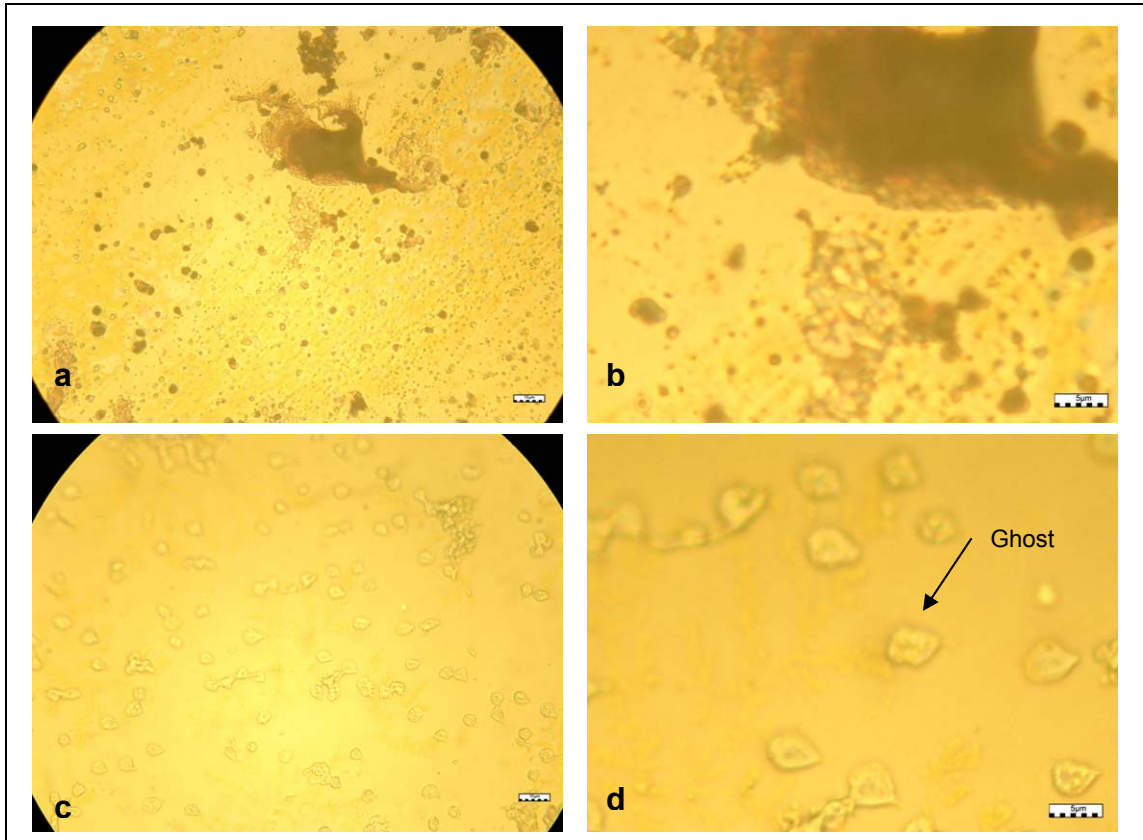


Abbildung 38: a: Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung: 1000x c: Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat an mit anti-CD36-Antikörper blockierte C32-Membranen, Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

b) Blockierung mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+)

Im Gegensatz zur oben beschriebenen Messung sollte nun getestet werden, ob die Blockierung der PLL-Schicht mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+) Erfolg versprechend ist. Wäre nämlich die PLL-Schicht blockiert und nur noch die Bindungsstellen der C32-Membranen frei, so dürfte es bei der Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat zu keiner Anlagerung, bei der Probe mit infizierten Erythrozyten müsste es jedoch zu einer deutlichen Ankopplung kommen. Damit wäre der Beweis erbracht, dass es sich um eine spezifische Bindung handelt. Für die Messung wurden die Quarze zunächst wieder, wie bereits beschrieben, mit auf PLL immobilisierten C32-Membranen beschichtet. Anschließend wurden sie mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung wurde, wie im vorhergehenden Versuch ausführlich beschrieben,

durchgeführt. Zu Beginn und nach Ende der Messung wurde ebenfalls ein Blutausstrich zur Beurteilung der Parasiten angefertigt (s. Abbildung 39). Zu Beginn der Messung waren die Parasiten im Schizontenstadium überwiegend intraerythrozytär lokalisiert (s. Abbildung 39a und b). Auch nach Ende der Messung fand sich ein Teil der Parasiten noch innerhalb der Erythrozyten, einige befanden sich jedoch außerhalb der Erythrozyten und waren folglich am Ende der Messung nicht mehr vital.

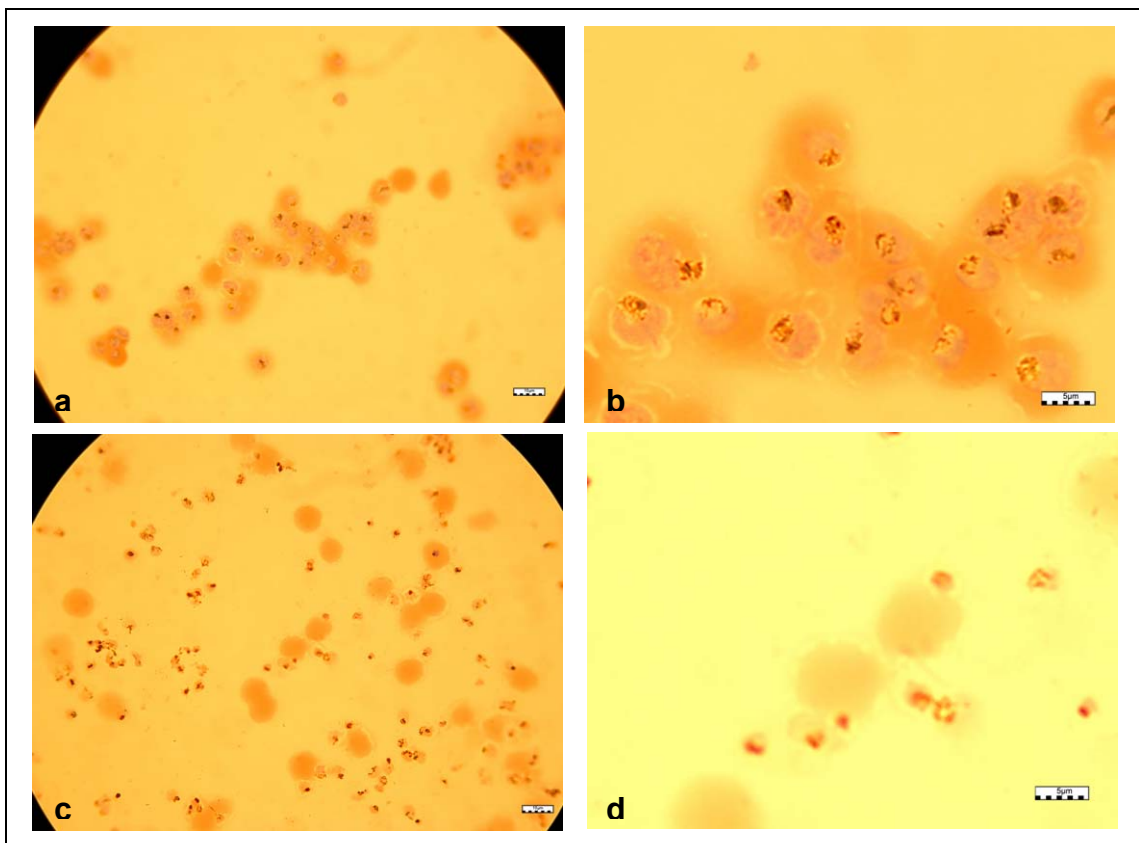


Abbildung 39: **a:** Blutausstrich zu Beginn der Messung, Vergrößerung: 500x **b:** Vergrößerung: 1000x **c:** Blutausstrich nach Beenden der Messung, Vergrößerung: 500x, **d:** Vergrößerung: 1000x.

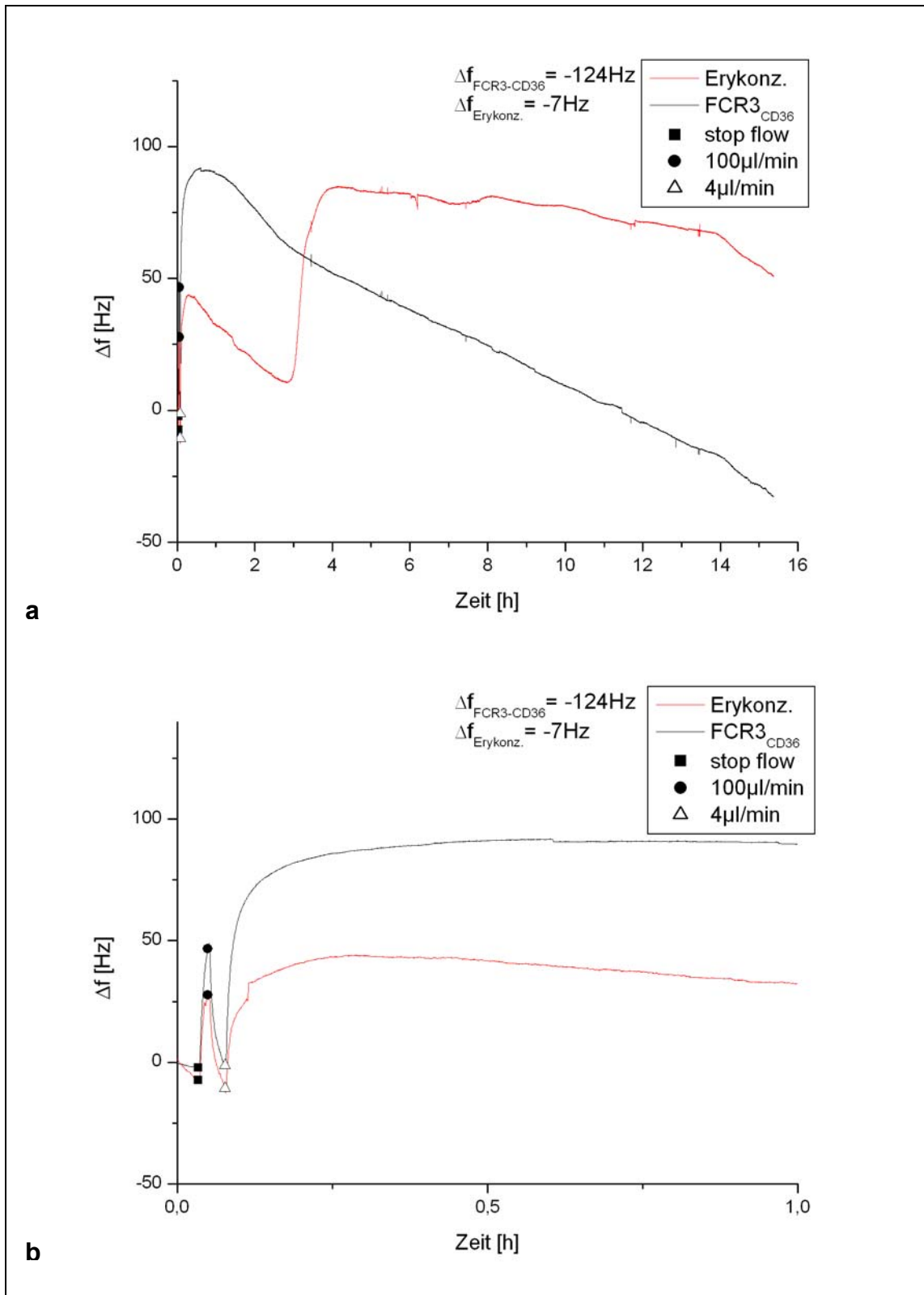


Abbildung 40: Blockierung mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+):

a: Übersicht **b:** Ausschnitt Messbeginn.

Abbildung 40a zeigt wiederum den gesamten Kurvenverlauf in der Übersicht, der entscheidend für das Messergebnis war. Das Signal der Probe aus FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten (in den Abbildungen 40a und b schwarz dargestellt) zeigte einen konstanten Abfall der Frequenz, der in der Summe -124Hz betrug. Die Frequenz, die den Einfluss des Erythrozytenkonzentrates widerspiegelte (in den Abbildung 40a und b rot dargestellt) zeigte im Verlauf zunächst einen kurzen Frequenzabfall, auf den ein deutlicher Anstieg folgte, welcher in eine tendenziell leicht abfallende Frequenz überging. Der Frequenzabfall betrug letztendlich -7Hz. Dieser Kurvenverlauf ließ sich so erklären: Durch das Auftreffen der Probe auf den Schwingquarz kam es zunächst zu einem durch Viskositätseffekte verursachten Frequenzabfall. Da die Erythrozyten auf der blockierten Oberfläche nicht haften bleiben konnten, wurden sie im weiteren Verlauf in großer Zahl fortgespült, was sich in einem kurzzeitigen Frequenzanstieg äußerte. Diese Frequenzabfälle zeigten deutlich, dass die Blockierung mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+) ausreichend war, um unspezifische Bindungen von Erythrozyten zu verhindern. Viel entscheidender war allerdings die Erkenntnis, dass es sich um eine spezifische Ankopplung der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten an die C32-Membranen handelte. Die Negativkontrolle war damit erfolgreich. Die Quarze wurden anschließend wieder mikroskopisch ausgewertet (s. Abbildung 41). Die infizierten Erythrozyten koppelten ausschließlich an die C32-Membranen an, eine Anlagerung von Erythrozyten außerhalb der von Membranen belegten Flächen war nicht zu erkennen (s. Abbildung 41 a und b). An der mit C32-Membranen beschichteten und mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+) blockierten Schwingquarzoberfläche war keine Anlagerung von Erythrozyten zu erkennen (s. Abbildung 41c und d).

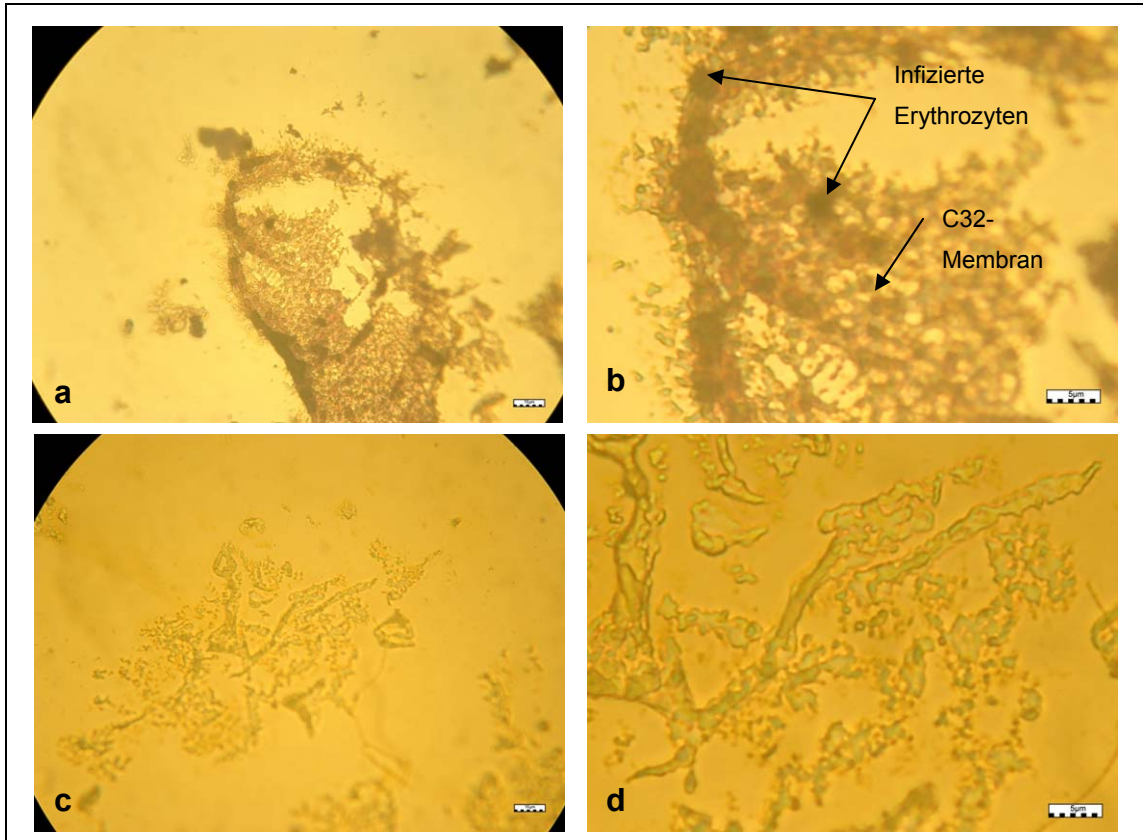


Abbildung 41: a: Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten, Vergrößerung 500x b: Vergrößerung: 1000x c: Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen, die mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+) blockiert waren. Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

c) Blockierung mit 2% BSA in PBS-Puffer

Nun sollte in einem weiteren Versuch ermittelt werden, ob die Blockierung der PLL-Schicht mit 2% BSA in PBS-Puffer, wie sie für die Langzeitankopplungsmessungen zum Einsatz kommen sollte, ebenso wirksam ist wie die mit Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+). Wäre dies der Fall, müsste es wieder zu einer deutlichen Ankopplung infizierter Erythrozyten im Sinne einer spezifischen Bindung an die C32-Membranen kommen. Bei der Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat dürfte sich wiederum keine Anlagerung zeigen. Die Quarze wurden zunächst wieder mit auf PLL immobilisierten C32-Membranen beschichtet und anschließend mit 2% BSA in PBS-Puffer für 1h bei Raumtemperatur blockiert. Der angefertigte Blutausstrich zeigte zu Beginn der Messung eine hohe Anzahl von parasitierten Erythrozyten im späten Trophozoiten- und Schizontenstadium (s. Abbildung 42 a und b);

nach Ende der Messung lagen die Parasiten immer noch innerhalb der Erythrozyten und hatten den Messvorgang offenbar unbeschadet überstanden (s. Abbildung 42c und d).

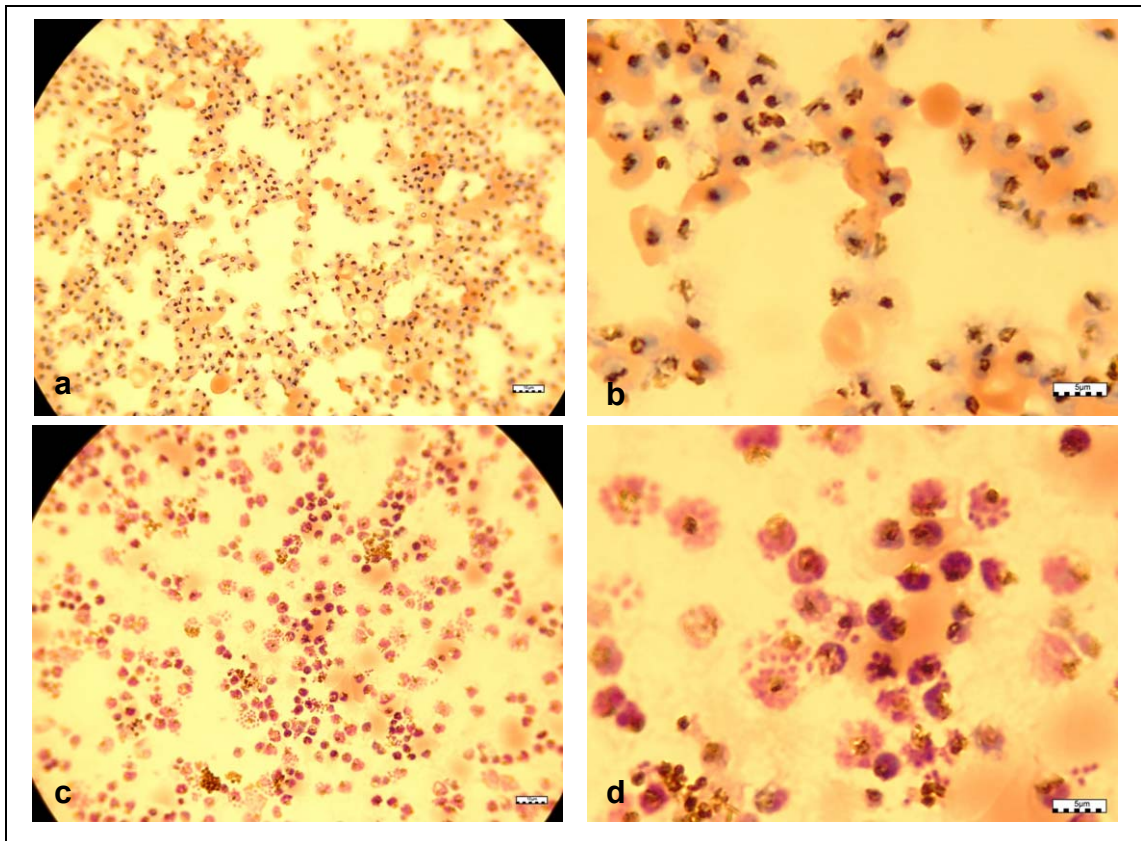


Abbildung 42: a: Blutausstrich zu Beginn der Messung, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung: 1000x c: Blutausstrich nach Beenden der Messung, Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

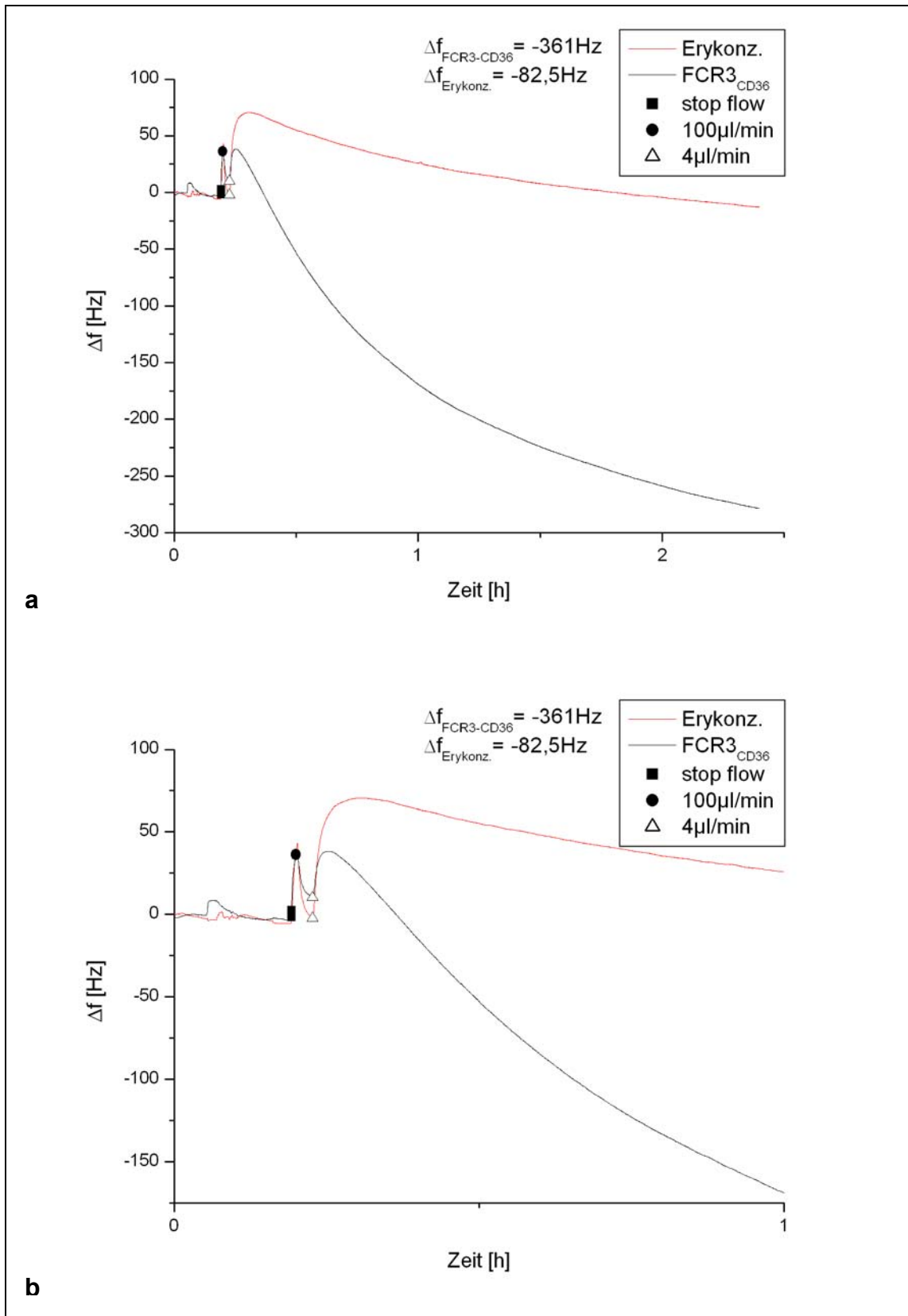


Abbildung 43: Blockierung mit 2% BSA in PBS-Puffer: a: Übersicht b: Ausschnitt
 Messbeginn.

Abbildung 43a zeigt den gesamten Kurvenverlauf in der Übersicht, rot ist der Verlauf der Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat dargestellt, schwarz ist der Verlauf der Probe mit FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten dargestellt. Die Kontrollmessung zeigte einen insgesamt sehr flachen Kurvenverlauf, der einen Frequenzabfall von -82,5Hz ergab. Der Kurvenverlauf der Positivprobe fiel von Beginn an sehr steil ab und erreichte bis zum Ende der Messung einen Frequenzabfall von -361Hz. Dies zeigt, dass das zweiprozentige BSA in PBS-Puffer genauso geeignet ist, die PLL-Schicht zu blockieren. Es wurde deutlich, dass der Kurvenverlauf die spezifische Ankopplung der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten an die C32-Membranen wiedergab. Die Quarze wurden ebenfalls mikroskopisch ausgewertet (s. Abbildung 44). Die *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten koppelten an die C32-Membranen an, wie in den Abbildungen 44a und b deutlich zu sehen war. Im Vergleich dazu zeigte die mit BSA blockierten C32-Membranen beschichtete Schwingquarzoberfläche keine Anlagerung von Erythrozyten (s. Abbildung 44c und d).

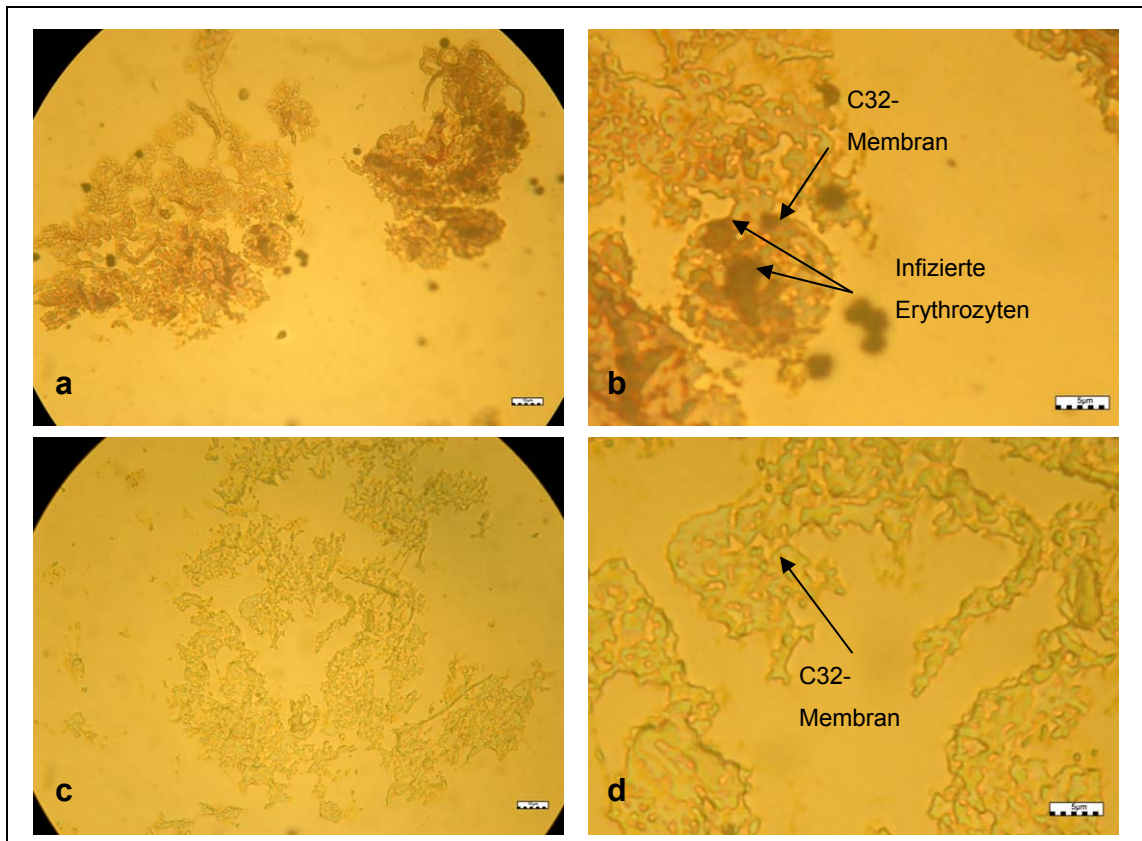


Abbildung 44: a: Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung: 1000x c: Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat an 2% BSA in PBS-Puffer, Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

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

Wie durch die vorangegangenen Versuche gezeigt, konnte nun endgültig von spezifischen Bindungen ausgegangen werden. Damit waren die Voraussetzungen für erfolgreiche Langzeitankopplungsmessungen geschaffen worden. Im folgenden Abschnitt der Arbeit wurden auf Grundlage dieser Erkenntnis die entsprechenden Langzeitmessungen über annähernd 24 Stunden mit den beiden Parasitenstämmen 3D7 und FCR3-CD36 im Analysegerät *Fidget Type Fg T1* durchgeführt. Hierbei wurde der Ankopplungsvorgang biosensorisch erfasst und graphisch dargestellt. Durch Ausschöpfung aller bisher erworbenen Versuchsergebnisse war es nun möglich, die Parameter in Bezug auf Vitalität und Bindungseigenschaften der Parasiten sowie das Messprotokoll und die Schwingquarzbeschichtung so zu wählen, dass die Messungen den zu untersuchenden Vorgang widerspiegeln. Idealerweise verfügte das Analysegerät *Fidget Type Fg T1* über zwei

Messkammern, sodass die beiden Analyte parallel vermessen werden konnten. So war es möglich, in der einen Messkammer die Ankopplung einer Probe aus infizierten Erythrozyten in RPMI verdünnt auf PLL immobilisierten C32-Membranen zu vermessen (s. Abbildung 45a). Dort sollte durch diesen Vorgang ein deutlicher Frequenzabfall aufgezeichnet werden können. In der zweiten Messkammer konnte zeitgleich die Negativkontrolle erfolgen. Dazu wurde reines Erythrozytenkonzentrat in Verdünnung mit RPMI über einen Schwingquarz geleitet, der dieselbe Beschichtung mit C32-Membranen besaß (s. Abbildung 45b). Hier sollte keine Ankopplung und damit auch kein Frequenzabfall erfolgen. Anschließend wurde die Schwingquarzoberfläche wieder mikroskopisch beurteilt, um die Ankopplung von infizierten Erythrozyten mit dem Ergebnis der Frequenzänderung zu verifizieren.

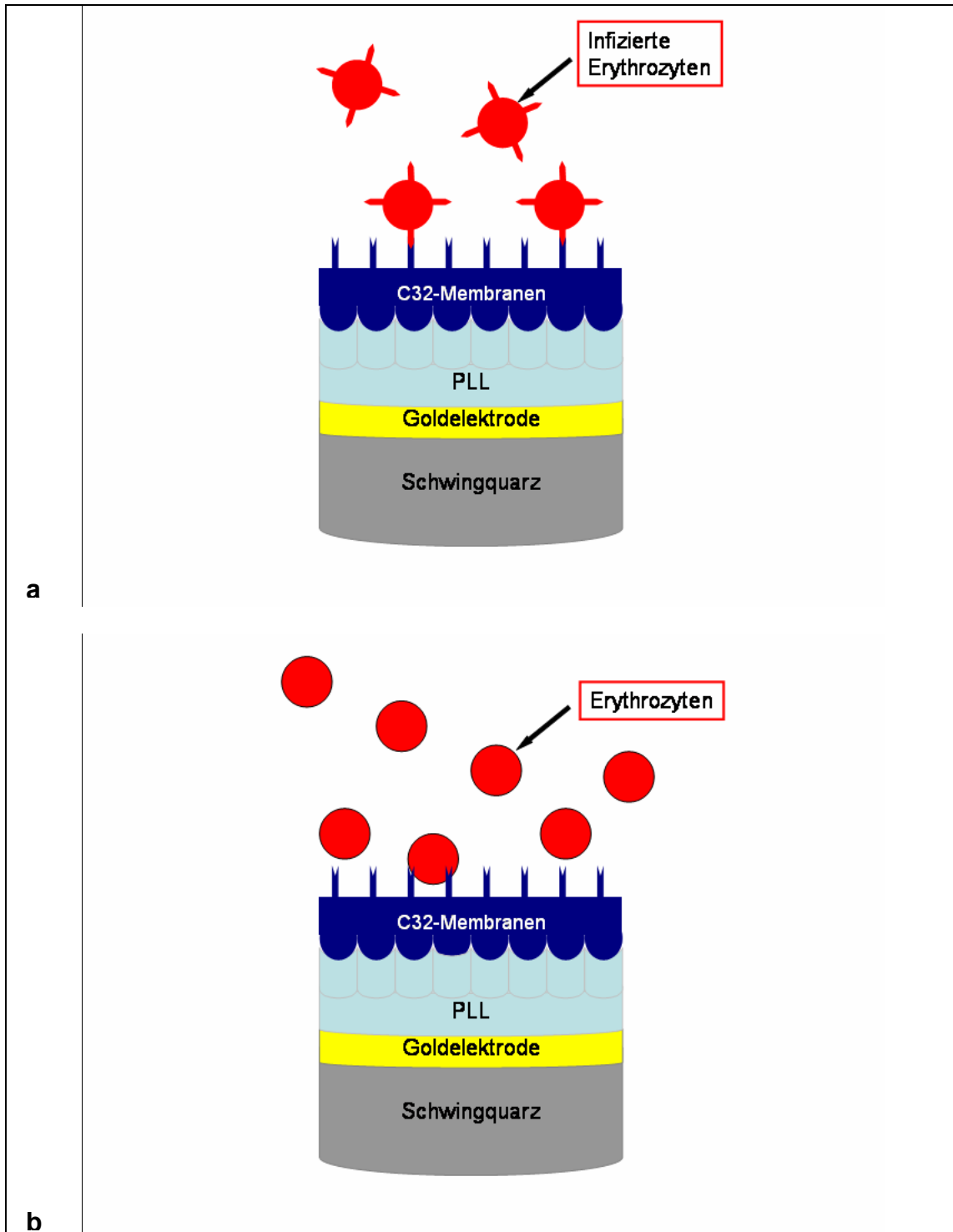


Abbildung 45: a: Ankopplung von *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten auf PLL immobilisierten C32-Membranen. b: Negativkontrolle: Ankopplung von Erythrozyten auf PLL immobilisierten C32-Membranen.

Exemplarisch sind in Kapitel 3.4.2.1 zwei von insgesamt elf erfolgreich durchgeführten Langzeitkopplungsmessungen mit zugehörigen Messkurven und Fotos der Schwingquarze dargestellt. Die Ergebnisse aller elf Messungen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Dabei zeigt diejenige Messung mit der größten Differenz zwischen dem Frequenzabfall der Probe ($\Delta f_{3D7} / \Delta f_{CD36}$) und dem Frequenzabfall der Kontrolle ($\Delta f_{\text{Erythrozytenkonzentrat}}$) den größten Erfolg.

Tabelle 6: Ergebnisse der QCM-Messungen zur Zytoadhäsion von 3D7 und FCR3-CD36 an CD36

Dateiname	$\Delta f_{3D7} / \Delta f_{CD36}$	$\Delta f_{\text{Erythrozytenkonzentrat}}$	Differenz
080808HIY	-90,7Hz	-41Hz	-49,7Hz
080826ISU	-169Hz	-119Hz	-50Hz
080725ILZ	-226Hz	-139Hz	-87Hz
080818IKU	-113Hz	-13Hz	-100Hz
080828IJP	-206Hz	-59Hz	-147Hz
080915IIQ	-249,7Hz	-90,2Hz	-159,5Hz
080813IHW	-281Hz	-50Hz	-231Hz
080723HIY	-425Hz	-149Hz	-276Hz
080923GNX	-345Hz	-55Hz	-290Hz
080804IQW	-279Hz	-0,05Hz	-278,95Hz
080806HSQ	-342Hz	-2Hz	-340Hz
Durchschnitt	-247,85Hz	-55,20Hz	-182,65 Hz

Zur Übersicht ist in Abbildung 46 ein Vergleich der bei den QCM-Messungen erhaltenen Signale zwischen der Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat und den beiden Parasitenstämmen bezogen auf die Bindung an CD36 dargestellt. Im Hinblick auf die CD36-Bindung der beiden Parasitenstämme 3D7 und FCR3-CD36 kann mittels einer durchgeführten statistischen Untersuchung (t-Test) gefolgert werden, dass keine signifikant unterschiedlichen Signale erhalten wurden ($p=0,48$). Die bei den Kontrollen mit Erythrozytenkonzentrat erhaltenen Frequenzabfälle waren im Vergleich zu den Messungen mit infizierten Erythrozyten nach einer Analyse mittels t-Test signifikant deutlich geringer ausgeprägt (3D7: $p=1,91E^{-4}$; FCR3-CD36: $p=1,70 E^{-4}$).

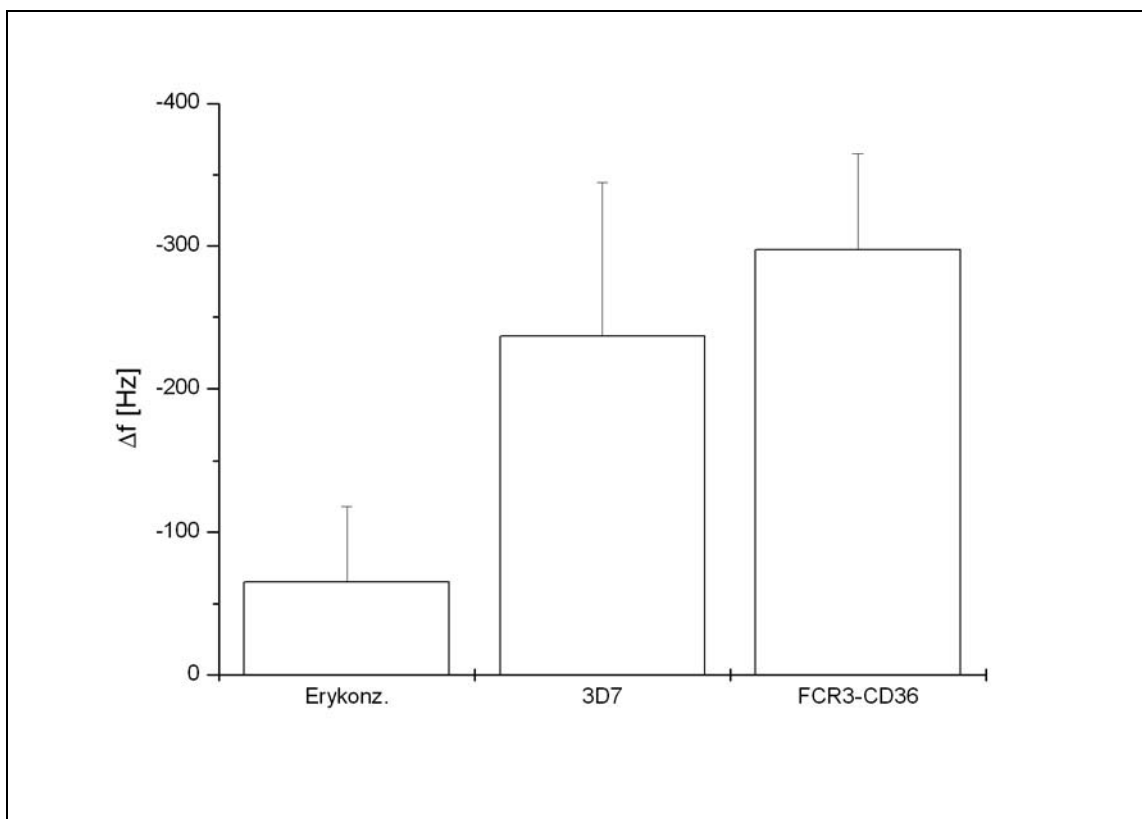


Abbildung 46: Vergleich der bei den QCM-Messungen erhaltenen Frequenzabfälle zwischen der Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat und der Bindung der beiden Parasitenstämme 3D7 und FCR3-CD36 an CD36.

3.4.2.1 Ergebnisse der Langzeitankopplungsmessungen

Die Langzeitankopplungsmessungen wurden, wie in Kapitel 2.2.5 ausführlich beschrieben, nach demselben Messprotokoll durchgeführt. Zu Beginn und nach Ende jeder Messung wurden Giemsa-gefärbte Blutaussstriche der Probe angefertigt, die die Entwicklung der Parasiten im Verlauf der Messung zeigten (s. Abbildungen 47 und 50). Zu Beginn der Messung lagen die Parasiten hauptsächlich als Schizonten und nur zu einem geringen Teil als Trophozoiten vor, sie entwickelten sich bis zum Ende der Messung zu Merozoiten. Die Kurvenverläufe (s. Abbildungen 48 und 51) zeigten zu Beginn der Messungen einen starken Anstieg der Frequenz, da durch Verminderung des Pumpenflusses von 100 µl/min auf 4 µl/min der über dem Sensor herrschende Druck in der Messkammer deutlich vermindert wurde. Allen Messungen war gemein, dass die infizierten Erythrozyten eine deutlich stärkere Bindungstendenz an die C32-Membranen aufwiesen und somit auch einen weitaus größeren Frequenzabfall verursachten als die Kontrolle mit Erythrozytenkonzentrat. Bei der Untersuchung der Quarze am Mikroskop (s. Abbildungen 49 und 52) zeigte sich ebenfalls eine geballte Adhäsion der infizierten Erythrozyten an den C32-Membranen. An den Kontrollquarzen blieb die Adhäsion von Erythrozyten aus. Diese Ergebnisse zeigen, dass es erfolgreich gelungen war, den Ankopplungsvorgang *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an CD36 biosensorisch zu erfassen und graphisch darzustellen. Es war in jeder Messung möglich, den Ankopplungsvorgang durch einen signifikanten Frequenzunterschied von der Negativkontrolle abzugrenzen, die sich konstant auf geringe Frequenzabfälle einpendelte. Der Ankopplungsvorgang löste reproduzierbar in jeder Messung einen steilen Frequenzabfall aus. Auch die anschließenden Auswertungen der Schwingquarze unter dem Mikroskop zeigten stets die entsprechende Ankopplung und bestätigten damit dieses Ergebnis.

a) Beispiel 1

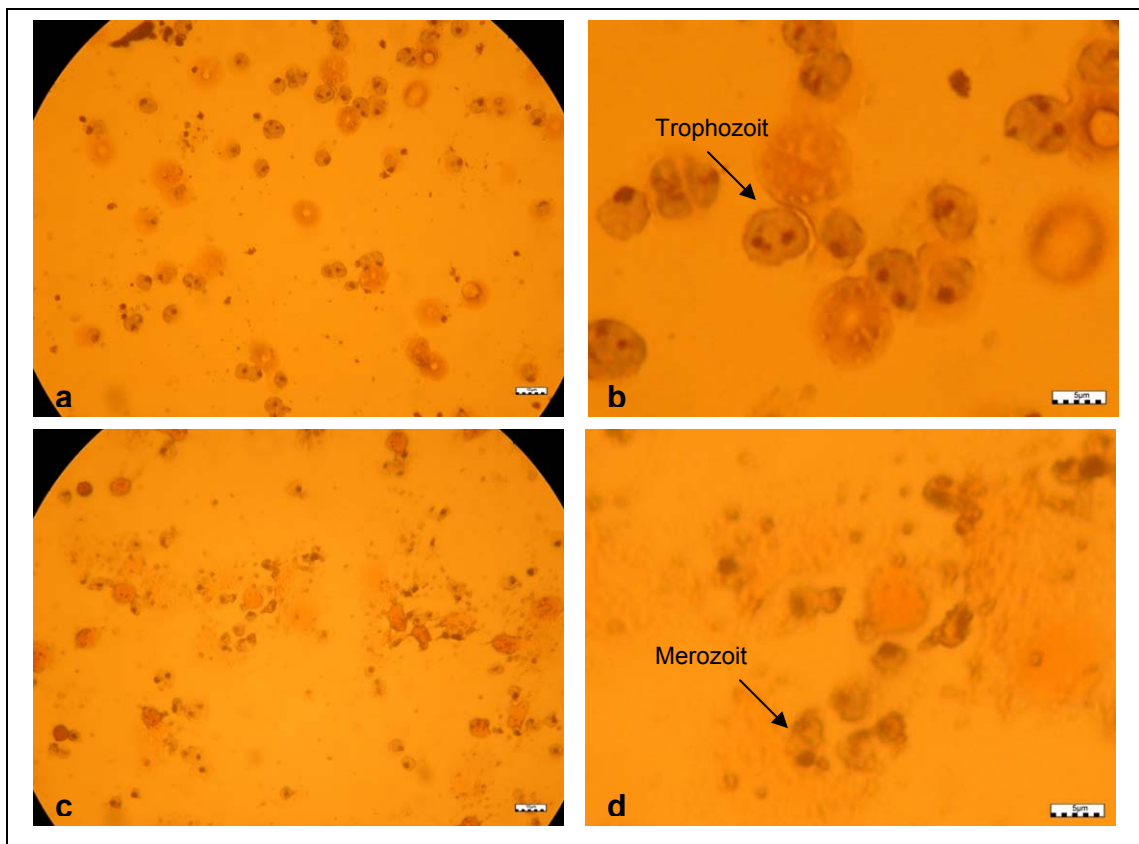


Abbildung 47: a: Blutausstrich zu Beginn der Messung, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung: 1000x c: Blutausstrich nach Beenden der Messung, Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

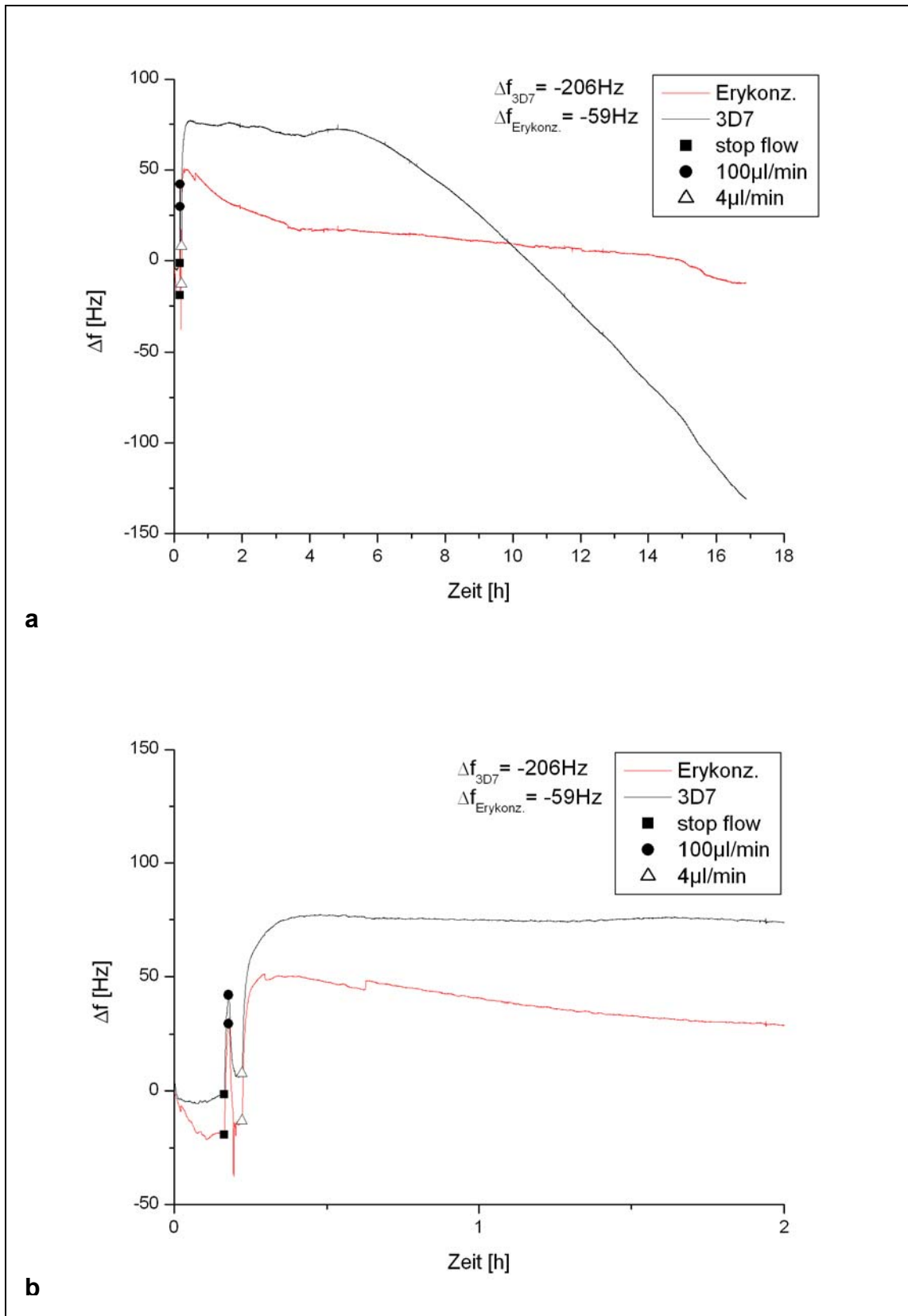


Abbildung 48: Beispiel 1: Langzeitankopplungsmessung zur Detektion der Adhäsion *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten auf PLL immobilisierten C32-Membranen, **a:** Übersicht, **b:** Ausschnitt Messbeginn.

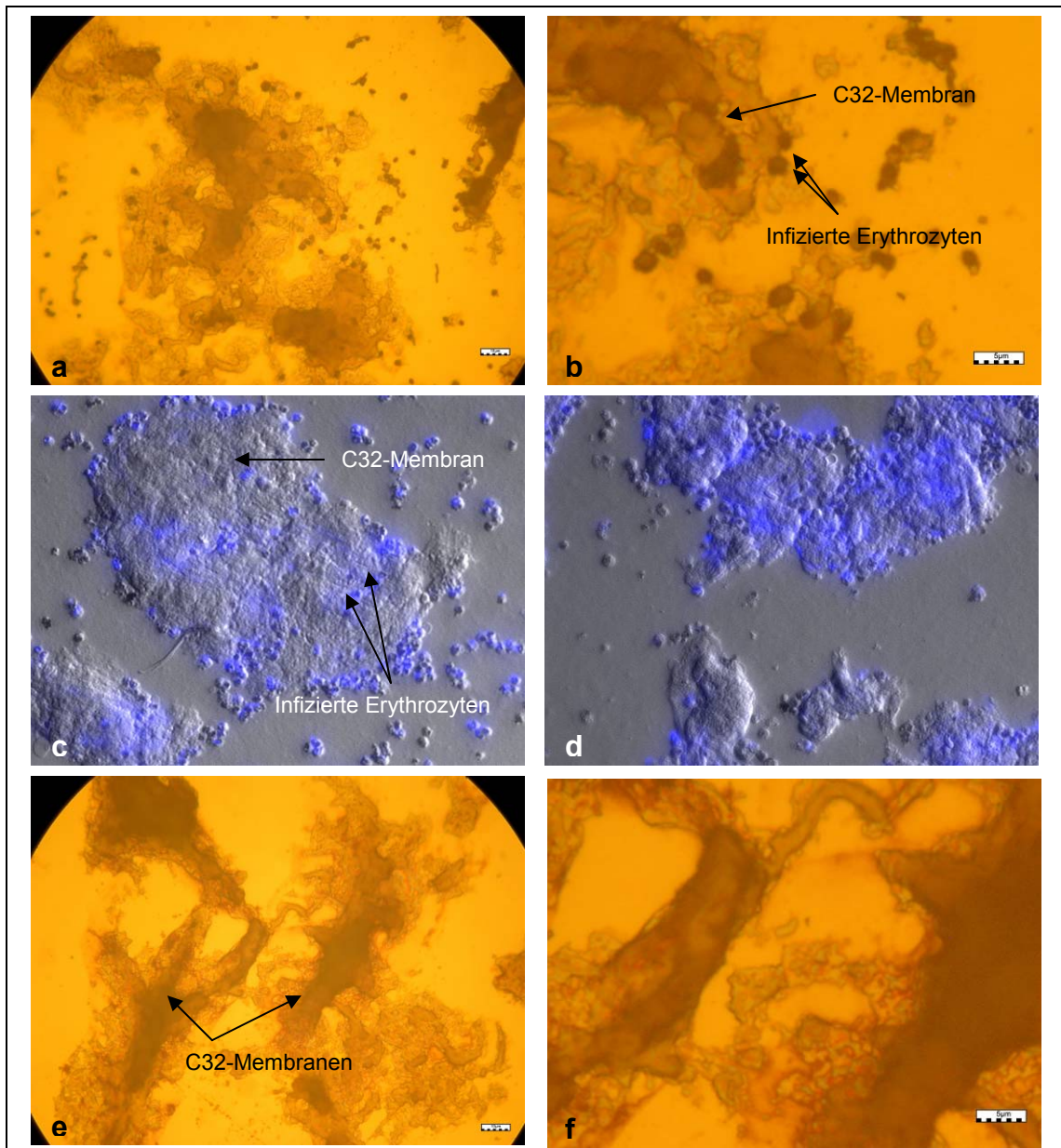


Abbildung 49: Korrespondierende Auflichtaufnahmen der Quarze, a: Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten an C32-Membranen, Vergrößerung: 500x **b:** Vergrößerung: 1000x **c:** Exemplarische Aufnahme des Selben Quarzes wie in Abb. 49a und b, wobei die FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten durch die Kernfärbung mit DAPI im Fluoreszenzmikroskop blau leuchteten, Vergrößerung: 500x **d:** Vergrößerung: 1000x **e:** Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat als Kontrollmessung, Vergrößerung: 500x **f:** Vergrößerung: 1000x.

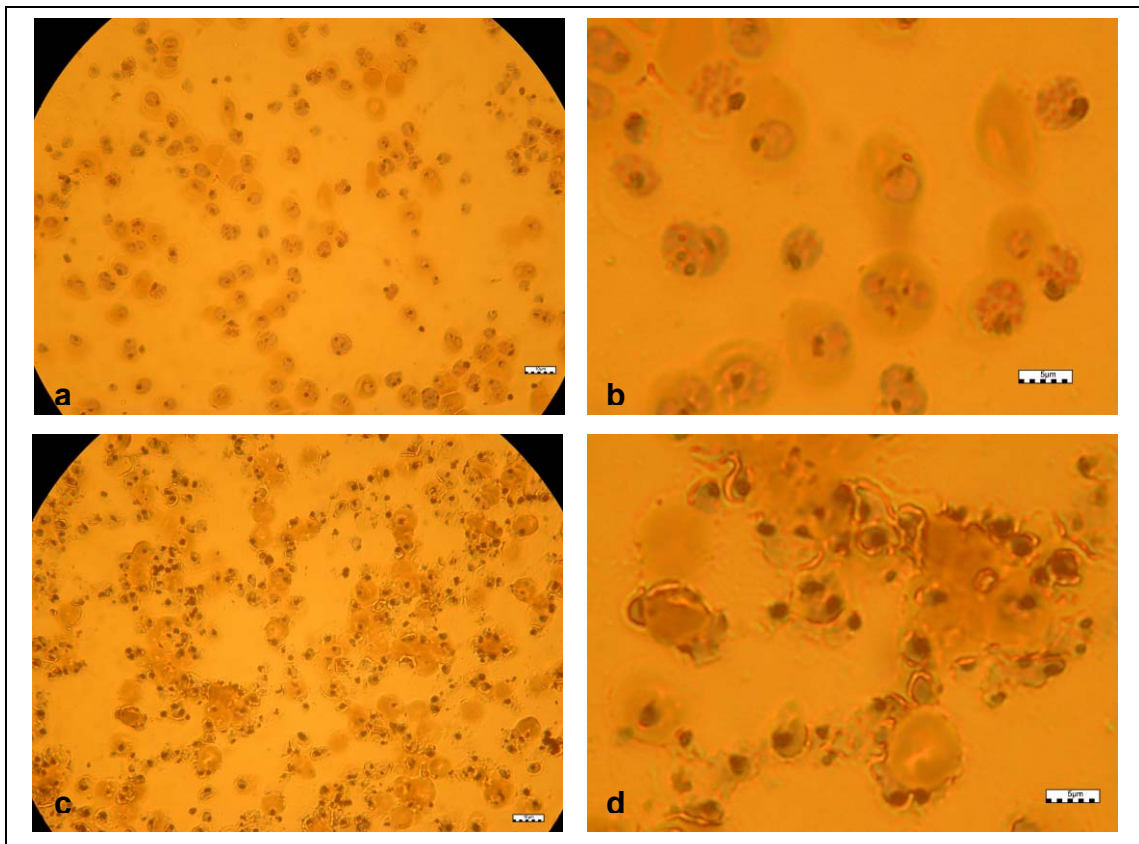
b) Beispiel 2

Abbildung 50: a: Blutausstrich zu Beginn der Messung, Vergrößerung: 500x b: Vergrößerung: 1000x c: Blutausstrich nach Beenden der Messung, Vergrößerung: 500x d: Vergrößerung: 1000x.

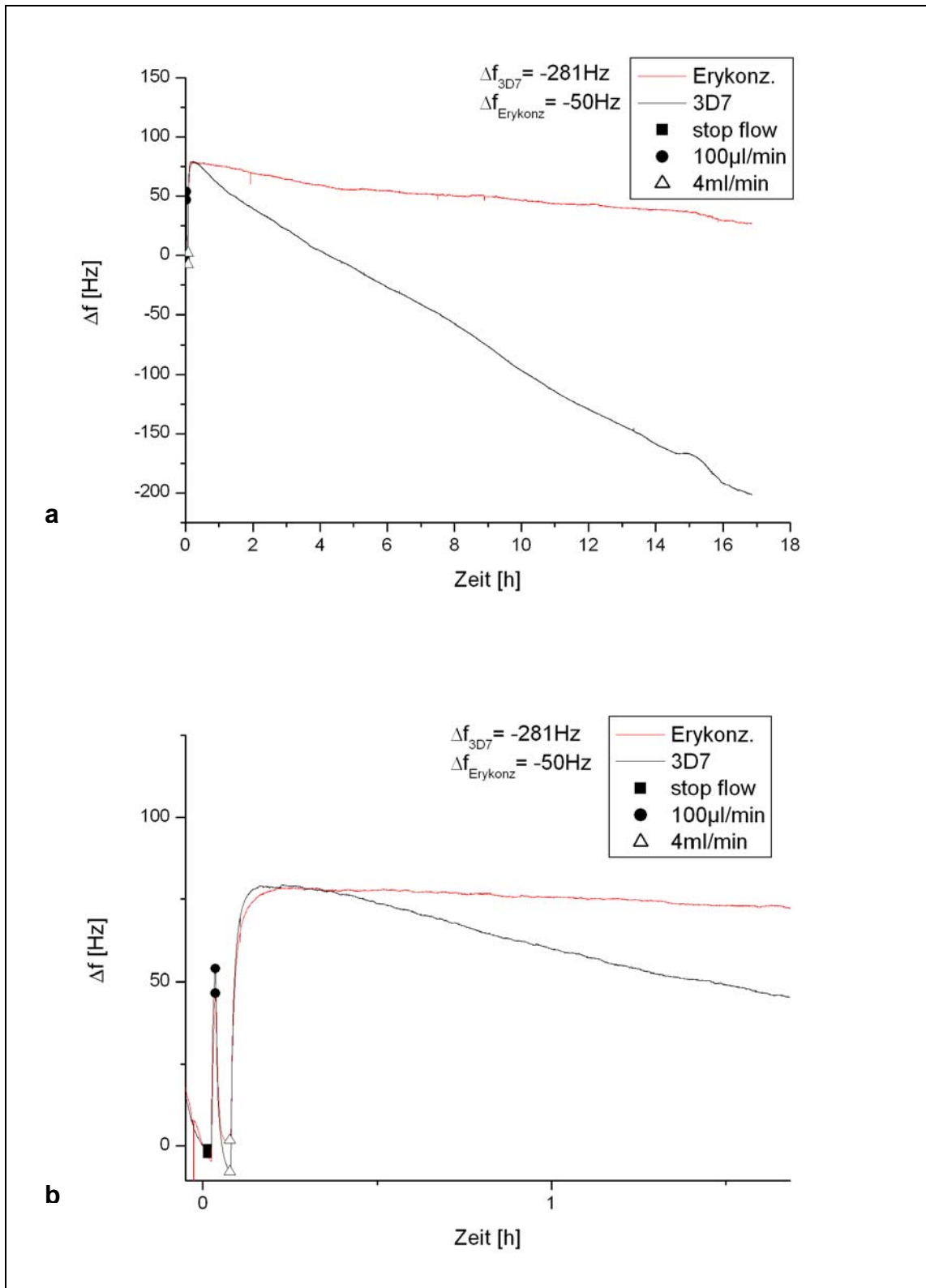


Abbildung 51: Beispiel 2: Langzeitankopplungsmessung zur Detektion der Adhäsion *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten auf PLL immobilisierten C32-Membranen, **a:** Übersicht, **b:** Ausschnitt Messbeginn.

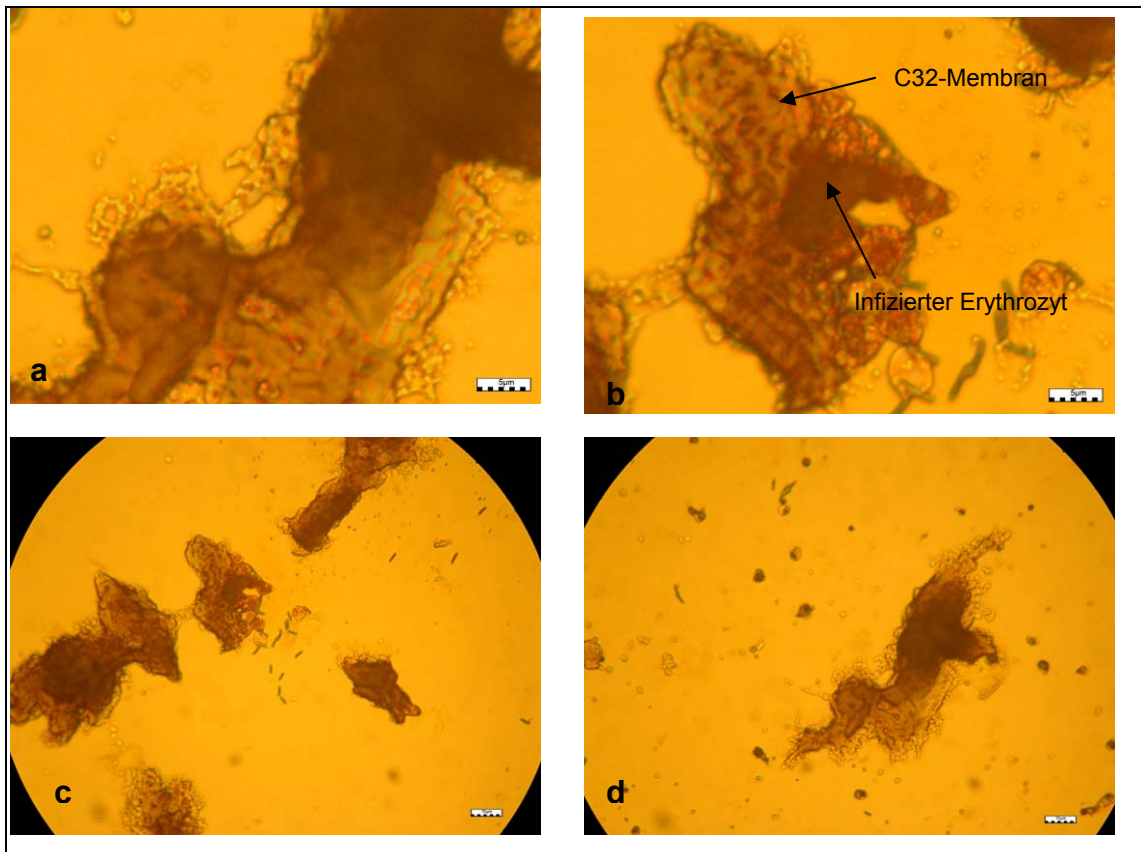


Abbildung 52: Korrespondierende Auflichtaufnahmen der Quarze, a-b: Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten an C32-Membranen, Vergrößerung: 1000x c-d: Ankopplung von Erythrozytenkonzentrat als Kontrollmessung, Vergrößerung: 500x.

3.4.3 Ankopplung von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten an einen PLL/C32-Membranen beschichteten Quarz in der Mikrofluidik

Um den Ankopplungsvorgang deutlicher zu veranschaulichen, wurde ein in der Arbeitsgruppe entwickeltes mikrofluidisches Element verwendet. Basierend auf den Entwicklungen der makrofluidischen Sensorplattform ist die Mikrofluidik eine miniaturisierte Sensorplattform mit einem fluidisch dicht und spannungsarm integrierten Schwingquarzsensoren, die nach dem gleichen Prinzip arbeitet. Dieses mikrofluidische Element konnte somit unter dem Mikroskop angebracht werden. Der entscheidende Vorteil dabei war, dass der Adhäsionsvorgang in der Messkammer direkt beobachtet werden konnte. Mithilfe der integrierten Kamera und entsprechender Time-Lapse-Aufnahmen wurde der Fließvorgang auf dem Quarz in mehreren Bildern in bestimmten

Zeitabständen festgehalten. Es wurde somit möglich, in einer Bilderfolge aufzunehmen, wie die *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten an den auf dem Quarz immobilisierten C32-Membranen entlangrollten und adhärerten. Dazu wurde der Quarz wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben mit auf PLL-immobilisierten C32-Membranen beschichtet. Die Probe und die mikrofluidische Sensorplattform wurden nach demselben Protokoll (s. Kapitel 2.2.5) wie für die Langzeitankopplungsmessungen im Analysegerät *Fidget* Type *Fg* T1 vorbereitet. Nachdem die exakte Fokusebene am Mikroskop identifiziert war, wurde die Probe mit einer Fließgeschwindigkeit von 100µl/min in die mikrofluidische Messkammer eingeleitet und das Programm Time Lapse gestartet. Als das mikrofluidische Element komplett befüllt war, wurde die Fließgeschwindigkeit auf 6µl/min reduziert. Die Messung erfolgte über Nacht, wobei über eine Gesamtlaufzeit von 15 Stunden insgesamt 60 Aufnahmen in einem zeitlichen Abstand von je 15 Minuten angefertigt wurden. Ausschnitte der Bilderfolge sind in Abbildung 53 dargestellt. Zur Auswertung wurden exemplarisch drei *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrozyten ausgewählt, deren Position in allen Aufnahmen bestimmt und entsprechend markiert wurde. Die Bilderfolge zeigte, wie die infizierten Erythrozyten 1 und 3 an der C32-Membran adhärerten und über den gesamten Zeitraum der Messung in dieser Position verblieben. Die Position des infizierten Erythrozyten 2 demonstrierte beispielhaft das Phänomen des initialen Rollens entlang der Membran. Nach etwa drei Stunden adhärerte schließlich auch Erythrozyt 2 an einer bestimmten Stelle der C32-Membran. Die Auflichtaufnahme und die korrespondierende Fluoreszenzaufnahme nach Färbung des Quarzes mit DAPI (s. Abbildung 54) zeigten ebenfalls die Lokalisation der infizierten Erythrozyten ausschließlich an der C32-Membran.

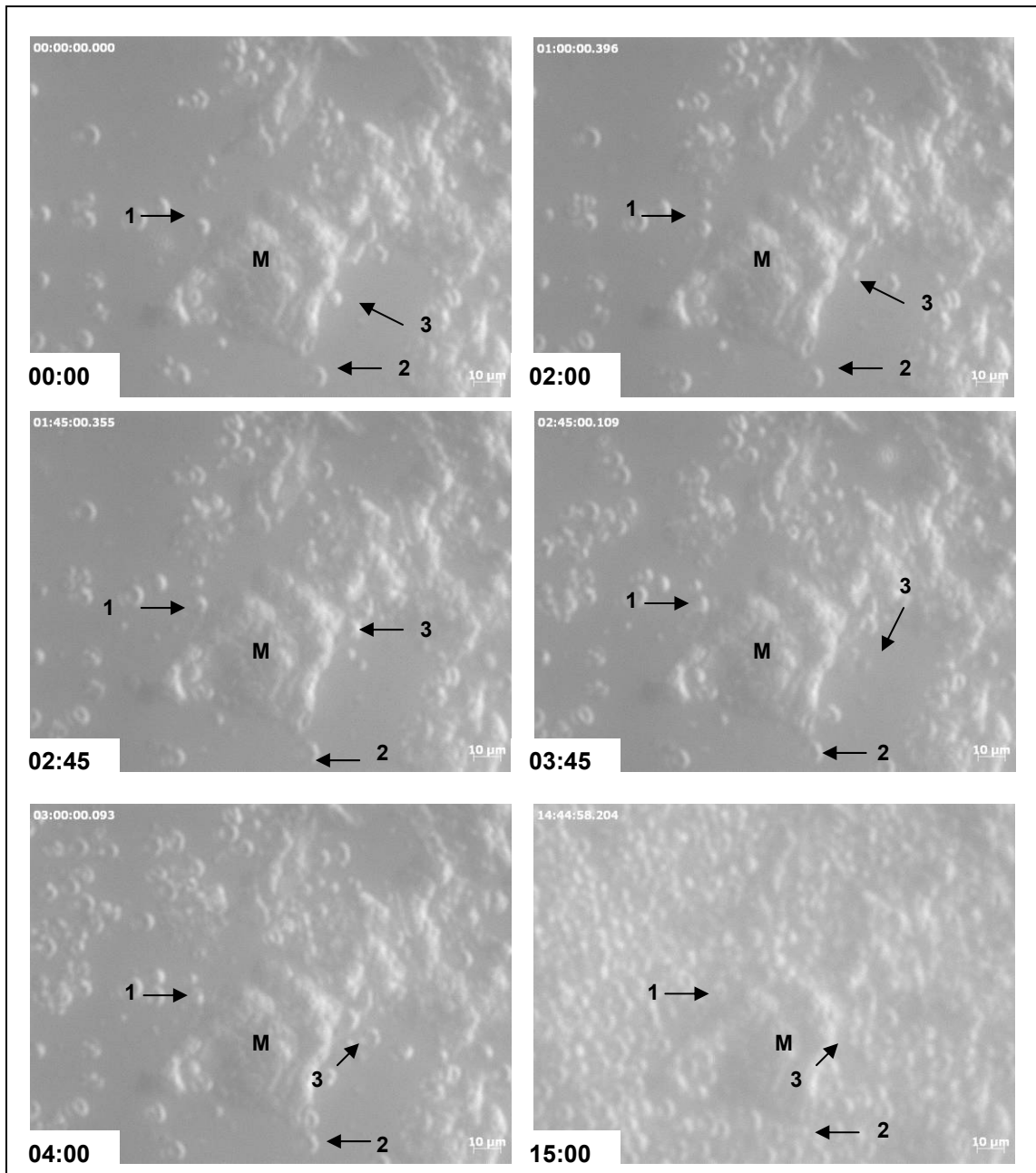


Abbildung 53: Auflichtmikroskopische Zellreihe zur Zytoadhäsion von FCR3-CD36-infizierten Erythrozyten an einen PLL/C32-Membranen beschichteten Quarz. Links im Bild jeweils der Zeitpunkt der Aufnahme (in Stunden). Die Position dreier ausgewählter infizierter Erythrozyten (1, 2 und 3) an der C32-Membran (M) wurde über die gesamte Messung beobachtet. Vergrößerung: 500x.

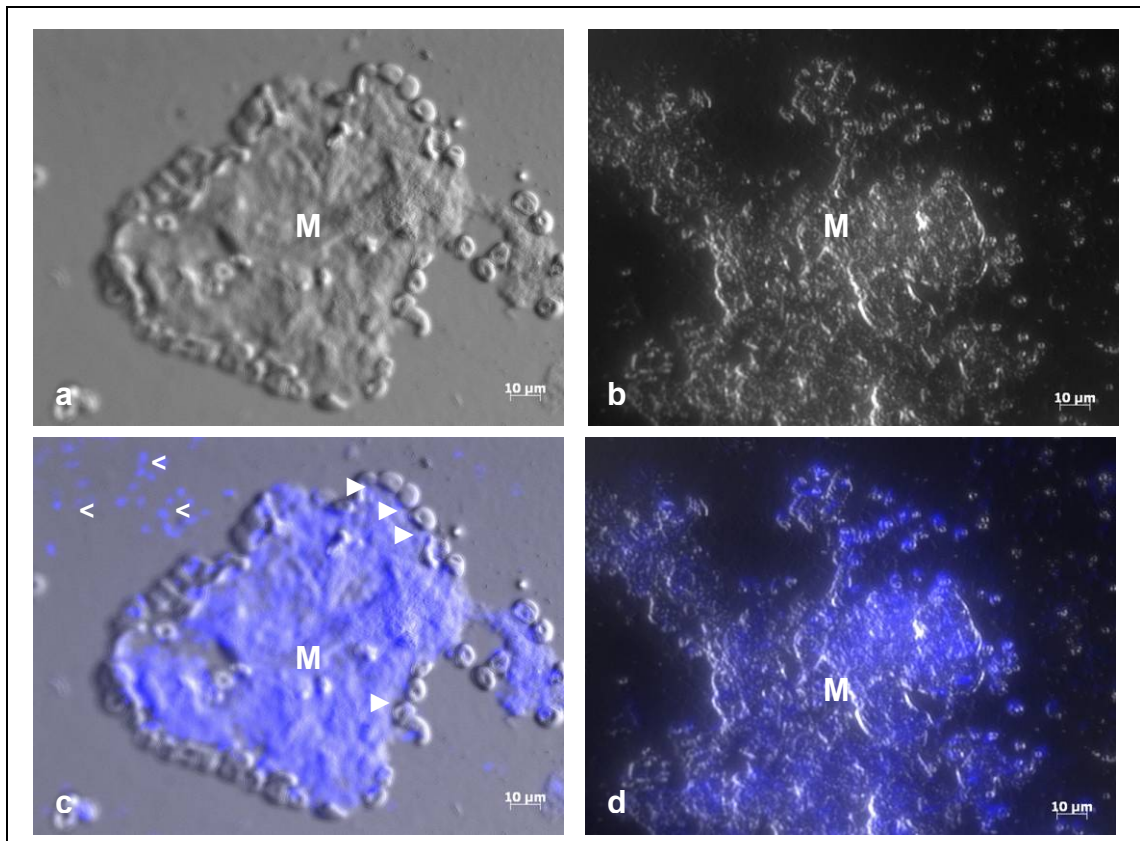


Abbildung 54: a-b: Auflichtaufnahmen zur Zytoadhäsion FCR3-CD36-infizierter Erythrozyten auf der PLL/C32-Membranen (M) beschichteten Schwingquarzoberfläche, c-d: korrespondierende Fluoreszenzaufnahmen, Kerbfärbung mit DAPI. Am Rand der Membran lokalisierte infizierte Erythrozyten (▶) und einige freigesetzte Merozoiten (<) sind zu sehen. Vergrößerung: 500x.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zytoadhäsionsvorgang später Blutstadien *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an den Rezeptor CD36 tragende C32-Membranen mittels Schwingquarzsensoren biosensorisch erfasst und untersucht. Grundlage dafür bildete die Entwicklung und Optimierung eines Beschichtungssystems, welches die Immobilisation der Rezeptoren CD36 und CSA auf dem Schwingquarz ermöglichte. Darüber hinaus wurde ein Verfahren entwickelt, welches den sensiblen Kulturbedingungen der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten während der Messungen im Analysegerät Fidget Type Fg T1 gerecht wurde. Auf Basis dieser Erkenntnisse konnte die spezifische Ankopplung *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten auf Poly-L-Lysin immobilisierten C32-Membranen aufgrund der Massenlagerung biosensorisch als Abfall der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes gemessen und aufgezeichnet werden. Die Etablierung dieses grundlegenden Messverfahrens birgt großes Potenzial zur weiteren Erforschung der Zytoadhäsionsvorgänge, die sich während des erythrozytären Zyklus der Malariainfektion vollziehen.

4.1 Immobilisierung von Erythrozyten auf den beschichteten Quarz

Für die Immobilisation des Rezeptors CD36 auf den Quarz wurde eine Beschichtung der Schwingquarzoberfläche mit Poly-L-Lysin vorgenommen, die als Haftvermittler zwischen der Oberfläche der Goldelektrode des Schwingquarzes und dem Rezeptor CD36 fungierte. Da davon auszugehen war, dass für die Immobilisation des Rezeptors CD36 eine vollständige Bedeckung des Schwingquarzes mit Poly-L-Lysin optimal sei, sollte zunächst der Erfolg der Beschichtung mit Poly-L-Lysin überprüft und gegebenenfalls optimiert werden. Da bekannt war, dass Erythrozyten unspezifisch an die PLL-Schicht binden, erschien die Ankopplungsmessung von Erythrozyten an Poly-L-Lysin beschichtete Schwingquarze als geeignete Methode. Somit war es möglich, über Anzahl, Verteilung und Bindungsverhalten der Erythrozyten direkt

Rückschlüsse auf die Bindungsstellen der Poly-L-Lysin-Beschichtung zu ziehen. Dieser erste Versuch eignete sich außerdem besonders gut, um mit dem Umgang mit Sensorplattform und Messelektronik vertraut zu werden, da der Versuchsablauf gewisse Ähnlichkeiten mit dem der geplanten Ankopplungsmessungen mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten aufwies. Des Weiteren erschien diese Methode auch dahingehend sinnvoll, dass der Beschichtungserfolg durch Einsatz der QCM-Technologie quantitativ erfasst werden konnte, was bereits schon jetzt die enormen Vorteile dieser Technologie eindrucksvoll unter Beweis stellte. So konnte nämlich die Masse der Erythrozyten, die erfolgreich auf der PLL-Schicht angekoppelt hatten, in direkten Bezug zu dem gemessenen Abfall der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes gesetzt und objektiv verglichen werden. Um bei den späteren Messungen mit infizierten Erythrozyten reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, war es von besonderer Bedeutung – trotz des wie in Kapitel 2.2.1.3 beschriebenen, zwar standardisierten aber dennoch manuell durchgeführten Beschichtungsvorganges – eine gleich bleibend homogene Beschichtung zu erhalten. In Ergänzung zur quantitativen Beurteilung durch Vermessung mittels QCM-Technologie wurde deshalb eine optische Beurteilung der Schwingquarzoberfläche nach Beenden der Messung unter dem Mikroskop vorgenommen, um einen direkten Eindruck von der Verteilung der Homogenität und dem Ankopplungsverhalten der auf dem Quarz befindlichen Poly-L-Lysin-Moleküle in Relation zu den Erythrozyten zu erhalten. Bei den durchgeführten Messungen wurde besonders auf ein störungsfreies Frequenzsignal zu Beginn der Messung geachtet, um optimale Bedingungen für die exakte Messung des erwarteten Frequenzabfalls zu schaffen. Das in anderen Arbeiten [8,16] bewährte Prinzip der „stop flow“ Messung, welches ein störungsfreieres Ankopplungsverhalten durch kurzzeitige Unterbrechung des Pumpflusses versprach, wurde ebenfalls getestet, zeigte jedoch für die Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an PLL-Quarze keine Verbesserung des Messergebnisses. Insgesamt war das Ergebnis der Messungen überaus zufrieden stellend ausgefallen. Die Ankopplungsmessungen zeigten beachtliche Frequenzabfälle, die eine zahlreiche Ankopplung von Erythrozyten

widerspiegelten und damit zeigten, dass das Beschichtungsverfahren für Poly-L-Lysin in dieser Form durchaus für alle weiteren Messungen geeignet war. Als besonders aufschlussreich erwiesen sich auch die im Anschluss an die Messung angefertigten Fotografien der fixierten Quarzoberflächen, auf denen eine sehr dichte, regelmäßig angeordnete Belegung mit Erythrozyten zu sehen war.

4.2. Langzeitankopplungsmessungen von Blut an PLL-Quarze

Im Rahmen der Malariaforschung wurde das Analysegerät *Fidget Type Fg T1* erstmalig innerhalb der Arbeitsgruppe für Biosensorik für Langzeitmessungen mit intakten Zellen über bis zu 48 Stunden eingesetzt [6,24]. Daher war es unverzichtbar, zunächst alle Parameter, die die Messung hätten beeinflussen können, auf ihre konstante, zuverlässige Beständigkeit über den gesamten Zeitraum der Messung hinweg zu überprüfen. Hinzu kam, dass erstmals auch die Übertragung einer vitalen Parasitenkultur in eine Messkammer stattfand. Um dies erfolgreich bewerkstelligen zu können, war selbstverständlich großes Augenmerk auf die Einhaltung konstanter Kulturbedingungen zu legen. Die Kultivierung von *Plasmodium falciparum* bedurfte bereits bei der Pflege der Zellkultur die strikte Einhaltung der sensiblen Kulturbedingungen. So war es umso mehr eine große Herausforderung, zum einen der Vitalerhaltung der Kultur und zum anderen der Durchführbarkeit der Ankopplungsmessung gerecht zu werden. Stellvertretend für dieses Vorhaben erschienen die bereits erläuterten Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an mit Poly-L-Lysin beschichteten Quarzen als besonders geeignet, um die Ankopplungsmessungen unter Langzeitbedingungen zu testen. In Bezug auf die einzuhaltenden Kulturbedingungen für die *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten musste es zunächst gelingen, die Bedingungen in der Anlage den für die Zellkultur geltenden Richtlinien anzupassen. Dabei mussten die drei entscheidenden, für die Parasiten lebenswichtigen Parameter Temperatur, Begasung und Nährmedium beachtet werden. In Bezug auf die geforderte konstante Temperatur von 37°C war von großem Vorteil, dass die vollautomatische Sensorplattform thermostatisiert war und so eine Messung

unter konstanter Temperatur problemlos ermöglichte. Die erforderliche Begasung mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ gelang zuverlässig durch die konstante Einleitung des Gases in die während der Messung in einem Schnappdeckelglaschen befindliche Probe. Ein weiterer großer Vorteil des Analysegerätes *Fidget Type Fg T1* war die Fließ-Injektions-Anlage, die optimal für einen kontinuierlichen Strom der Pufferlösung sorgte. Das erforderliche Nährmedium konnte so zunächst unverändert als Pufferlösung in die Fließ-Injektionsanlage eingebracht werden. Die Entwicklung eines zuverlässigen Versuchsprotokolls beinhaltete außerdem, alle Parameter so auszurichten, dass die Signalfrequenz durch keine störenden Faktoren beeinflusst wurde. Nur so konnte es gelingen, Frequenzsignale zu erhalten, die eindeutig interpretiert werden konnten. Bei allen durchgeführten Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an mit Poly-L-Lysin beschichteten Quarzen wurde zunächst die aus verdünntem EDTA-Blut hergestellte Probe über den Quarz geleitet. Wie bereits erläutert (s. Kap. 4.2.1), kam es folglich in allen Fällen zum erwarteten Abfall der Resonanzfrequenz, verursacht durch die Ankopplung der Erythrozyten an die Poly-L-Lysin Beschichtung des Schwingquarzes. Von besonderem Interesse war in dieser Versuchsreihe nun allerdings das Verhalten der Signalfrequenz nach Ende des Ankopplungsereignisses. Diese wurde jeweils über eine Nacht aufgezeichnet und anschließend analysiert. Da die Messkammer während dieser Zeit mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit mit Medium gespült wurde, dürfte es in dieser Zeit zu keinen Massenänderungen auf dem Schwingquarz-Sensor kommen, dementsprechend müsste die Resonanzfrequenz unverändert bleiben. Im ersten Versuch war dies auch über etwa zehn Stunden der Fall, bevor es zu einer groben Abweichung des bis zu diesem Zeitpunkt konstanten und völlig störungsfreien Frequenzsignals kam. Da die Messkammer über ein Fenster verfügte, das es ermöglichte, die Vorgänge auf der Schwingquarzoberfläche direkt zu beobachten, konnte festgestellt werden, dass sich eine Luftblase gebildet hatte. Diese auf der Oberfläche des Schwingquarz-Sensors befindliche Phasengrenze zwischen Luft und Medium hatte dazu geführt, dass das Frequenzsignal empfindlich gestört wurde. Da dieses Problem bei den

Ankopplungsmessungen von Erythrozyten an mit Poly-L-Lysin beschichteten Quarzen bei Raumtemperatur nicht aufgetreten war, lag die Vermutung nahe, dass dieses Problem im Zusammenhang mit der Thermostatisierung der Anlage auf 37°C stand. Es erschien nahe liegend, dass die Erwärmung des Mediums ursächlich für ein Entweichen von Lufteinschlüssen im Medium war. Da die Temperatur eine unveränderliche Konstante der Messung darstellte, musste die Optimierung über eine entsprechende Vorbehandlung des Mediums herbeigeführt werden. Es erschien als einfachste Methode, das Medium unter Vakuum zu entgasen. Für den Anfang wurde angenommen, vier Stunden seien für die Entgasung ausreichend, da nach dieser Zeit keine optisch wahrnehmbare Blasenbildung mehr festgestellt werden konnte. Für das Entgasen war es nötig, das sterile Medium in ein unsteriles Gefäß umzufüllen, welches an die Vakuumpumpe angeschlossen werden konnte. Um die Sterilität des Mediums nach dem Entgasungsvorgang wieder herzustellen, wurde ein präziser Ablauf festgelegt, nach dem das Medium steril filtriert und abgefüllt wurde. Hierzu kann vorweggenommen werden, dass sich mögliche Befürchtungen, durch den Filtervorgang erneute Lufteinschlüsse zu erzeugen, nicht bestätigten. Im Gegenteil wurde der Filter- und Entgasungsvorgang als ebenso einfach durchzuführende wie auch effektive Methode angesehen, das Medium optimal vorzubereiten. Die erste Messung mit dem wie beschrieben vorbereiteten Medium zeigte bereits eine beachtliche Verbesserung. Die störungsfreie Frequenzaufzeichnung wurde erst nach etwa 14 Stunden durch die Bildung einer Luftblase in der Messkammer unterbrochen. Durch die Entgasung konnte die Zeitspanne, in welcher das Signal stabil blieb, im Vergleich zu den vorangehenden Messungen bereits verdoppelt werden. Diese Tatsache untermauerte die Vermutung, die Blasenbildung sei durch ein Ausgasen von Lufteinschlüssen verursacht worden. Es wurde deshalb vermutet, durch längeres Entgasen das gewünschte Resultat – ein möglichst über die gesamte Messzeit konstantes Frequenzsignal – zu erhalten. Demgemäß wurde festgelegt, die Vakuumzeit auf acht Stunden zu verdoppeln. Tatsächlich war dies die ausreichende Zeit, um ein Medium zu erhalten, welches genügend von Lufteinschlüssen befreit war. Die Messungen zeigten,

dass es nun möglich war, über bis zu 22 Stunden ein konstantes und verlässliches Frequenzsignal aufzuzeichnen. Somit waren auf der einen Seite das konstante Frequenzsignal und auf der anderen Seite die vitalerhaltenden Parameter für die Ankopplungsmessungen mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten nachweislich erfolgreich aufrechterhalten worden. Die Langzeitankopplungsmessungen konnten somit dahingehend optimiert werden, dass Ankopplungsmessungen mit infizierten Erythrozyten erfolgreich durchgeführt werden können.

4.3 Nachweis der Immobilisierung der Rezeptoren auf den Quarz

Mit dem Nachweis der gelungenen und optimalen Beschichtung des Schwingquarzes mit Poly-L-Lysin war nun die Grundlage und gute Voraussetzung geschaffen worden, in einem weiteren Schritt die den Hauptrezeptoren CD36 tragenden C32-Membranen auf Basis der Poly-L-Lysin-Beschichtung auf den Quarz immobilisieren zu können. Sowohl die Kultivierung der C32-Zellen als auch die Entwicklung und Optimierung eines Beschichtungsprotokolls für die Immobilisierung der C32-Membranen auf den Quarz sowie umfangreiche Versuche zum Nachweis der erfolgreichen Immobilisierung der C32-Membranen auf den Quarz mittels Fluoreszenz wurden von Frau Dipl. Biol. Daniela Kömpf im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt [24].

Ziel dieser Arbeit war es außerdem, für den ausschließlich in der Plazenta vorkommenden Rezeptor CSA ein Verfahren zur Immobilisierung auf den Quarz zu entwickeln. Auch wenn das Hauptaugenmerk der weiteren Experimente auf der Untersuchung der Ankopplungsvorgänge von *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten auf PLL immobilisierten C32-Membranen und damit der Untersuchung des Rezeptors CD36 lag, war es für diese Arbeit dennoch von Bedeutung, die Untersuchung mittels QCM-Technologie auch für einen weiteren der bisher erforschten Rezeptoren zugänglich zu machen. Auf dieser Basis kann es in zukünftigen Experimenten gelingen, die Anwendung dieser

innovativen Technologie noch weiter für die Erforschung der pathogenen Adhäsionsvorgänge der Malaria auszubauen. Die Immobilisation des Rezeptors CSA auf den Quarz wurde über eine Beschichtung der Schwingquarzoberfläche mit NeutrAvidin ermöglicht, die als Haftvermittler zwischen der Oberfläche der Goldelektrode des Schwingquarzes und dem Rezeptor CSA fungierte. In einer früheren Arbeit kam diese Verbindung biotinylierter Proteine (in diesem Fall handelte es sich um Lektine) mit der NeutrAvidinschicht bereits erfolgreich zur Anwendung [42]. Das dem Avidin ähnliche NeutrAvidin verfügt über Cysteinbausteine, die zu einer spontanen Adsorption an die Goldoberfläche führen, die tetramere Struktur ermöglicht die Bindung von vier Biotin-Molekülen. Somit gilt die durch Adsorption entstandene Verbindung zwischen der Goldoberfläche des Schwingquarzes und der Lektinschicht als gesichert [42]. Auf dieser Grundlage basierte nun das Bestreben, auch die Haftvermittlung zwischen anderen Molekülen, wie zum Beispiel dem Rezeptor CSA, über den Biotinylierungsprozess herzustellen. Zur Überprüfung, ob zum einen der Biotinylierungsprozess erfolgreich verlaufen war und zum anderen dadurch die Immobilisierung des Rezeptors CSA auf der NeutrAvidinoberfläche erreicht werden konnte, wurde wiederum das Verfahren der Ankopplungsmessung gewählt. Auch hier zeigte sich der entscheidende Vorteil der QCM-Technologie, den Erfolg der Beschichtung unmittelbar quantitativ erfassen und zeitgleich graphisch darstellen zu können. Somit war es in sehr übersichtlicher Art und Weise möglich, das Messprotokoll in strukturierter Vorgehensweise zu variieren und dennoch die Ergebnisse ebenso simpel wie objektiv vergleichen zu können. Genau aus diesem Grunde wurde in einem ersten Versuch die Negativkontrolle ebenfalls als Ankopplungsmessung durchgeführt. Um unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor und der NeutrAvidinbeschichtung ausschließen zu können und zur Demonstration, dass es sich um eine spezifische Bindung des biotinylierten CSA handelte, wurde nicht biotinyliertes CSA im Analysegerät *Fidget Type Fg T1* über den NeutrAvidinbeschichteten Schwingquarz geleitet. Die Negativkontrollen zeigten allesamt keine relevante Änderung der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes. Folglich kam es zu keiner Interaktion der Oberflächenbeschichtung des Quarzes und dem

Rezeptor CSA. Die nachfolgenden Ankopplungsmessungen von biotinyliertem CSA an NeutrAvidin-Quarze zeigten eindrücklich den erwünschten Erfolg. Jeweils kurz nach Einleiten der Probe in die Messkammer verzeichnete die Resonanzfrequenz einen deutlichen Abfall, an dessen Scheitelpunkt sich die Frequenz auf ein stabiles Niveau einstellte. Dies zeigte, dass es gelungen war, durch die Biotinylierung des Rezeptors CSA eine spezifische Bindung zur Oberflächenbeschichtung des Schwingquarzes herzustellen. Um diesen ersten Erfolg im Laufe der Entwicklung eines geeigneten Beschichtungsprotokolls besser beurteilen zu können, erfolgten weitere Ankopplungsmessungen zur Überprüfung der Beschichtungsqualität. Dabei ist als besonderer Vorteil hervorzuheben, dass es durch die parallele Aufzeichnung der vermessenen Resonanzfrequenzen möglich war, die Vorgänge in der Messkammer zeitgleich auf dem Bildschirm beobachten zu können. Demzufolge konnte zum jeweils exakten Zeitpunkt sofort agiert werden. Um zu sehen, ob durch die im Abschnitt Methodik beschriebene externe manuelle Beschichtung des Quarzes mit NeutrAvidin der Quarz bereits voll belegt waren oder ob auf der Goldoberfläche noch freie Stellen verblieben, an denen theoretisch eine weitere Adsorption stattfinden könnte, wurde folgender Versuchsablauf festgelegt: Zunächst wurde über einen extern NeutrAvidinbeschichteten Quarz biotinyliertes CSA geleitet, um – wie im oben beschriebenen Versuch bereits mit Erfolg gelungen – alle freien Bindungsstellen der NeutrAvidinschicht zu blockieren. Anschließend wurde NeutrAvidin in die Messkammer geleitet; dabei spielte es keine Rolle, ob die Beschichtung extern oder in der Messkammer vorgenommen worden war. Wären jetzt noch freie Bindungsstellen vorhanden gewesen, so hätte davon ausgegangen werden müssen, dass es zu einer weiteren Adhäsion von NeutrAvidin auf der Goldoberfläche gekommen war. Das Ergebnis zeigte, dass es zum erwarteten Kurvenverlauf nach Einleiten des biotinylierten CSA kam. Hatte sich die Resonanzfrequenz auf ein stabiles Niveau eingestellt, verursachte das eingeleitete NeutrAvidin nur noch einen geringen Abfall der Frequenz, der sich in kurzer Zeit nivellierte, um zur Ausgangsfrequenz zurückzukehren. Dies zeigte, dass keine Notwendigkeit bestand, von der externen Beschichtung mit NeutrAvidin abzuweichen, da dieses Verfahren zu

einem optimalen Ergebnis geführt hatte. Da nun die Integrität der Neutravidinschicht als zweifellos anzusehen war, wurde im gleichen Verfahren überprüft, ob auch alle vorhandenen Bindungsstellen der Neutravidinschicht im dargestellten Verfahren mit biotinyliertem CSA belegt werden konnten. Dazu wurde wiederum das Verfahren aus zwei nacheinander in die Messkammer geleiteten Analyten benutzt. Die erste Probe bestand aus biotinyliertem CSA und bewirkte den erwartungsgemäßen Frequenzabfall, der zu diesem Zeitpunkt bereits als reproduzierbarer Standard angesehen werden konnte. Die zweite Probe bestand aus biotinyliertem BSA gleicher Konzentration. Sie löste den charakteristischen Verlauf der Frequenzkurve aus, der eindeutig dafür sprach, dass nur eine kurzzeitige Viskositätsänderung und keine zusätzliche Ankopplung auf der Schwingquarzoberfläche stattgefunden hatte. Nachdem nun alle Komponenten der neu entwickelten Beschichtung auf optimale, sprich maximale Oberflächenbelegung und reproduzierbare Funktionalität hin überprüft worden waren, konnte das Beschichtungsprotokoll als erfolgreich erachtet werden. Wie bereits erläutert, sollte diese Beschichtung in dieser Arbeit nun aber nicht weiter angewandt werden, da sich das Hauptaugenmerk auf den Rezeptor CD36 richtete. Sie steht damit künftigen Forschungsvorhaben zur Verfügung.

4.4 Ankopplungsmessungen von *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten bzw. Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen

Nachdem nun alle Voraussetzungen geschaffen waren, um die Ankopplungsmessung durchführen zu können, wurden all die bereits gewonnenen Erkenntnisse zusammengefügt. Die Fragen nach Beschichtung, Immobilisierung der Rezeptoren auf dem Quarz und stabilen Bedingungen für die Langzeitmessung waren zufrieden stellend beantwortet – nun galt es, in einem entscheidenden nächsten Schritt die in zuvor durchgeführten Kontrollversuchen voll funktionsfähigen einzelnen Versuchsabläufe in einem Gesamtkonzept zu vereinen. Wie bereits erläutert, wurde die Immobilisierung der C32-Membranen auf die Poly-L-Lysin-Oberfläche von Frau Dipl. Biol.

Daniela Kömpf erfolgreich durchgeführt [24]. Somit war es Ziel dieser Arbeit, die spezifische Bindung der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten an den auf PLL immobilisierten C32-Membranen nachzuweisen. Das Ergebnis dieser Tests war ausschlaggebend für den Fortgang des gesamten Experiments. Um sorgfältig analysieren und vergleichen zu können, wurde eine Testreihe aus Quarzen unterschiedlicher Beschichtung angefertigt, an welchen das Ankopplungsverhalten infizierter Erythrozyten geprüft werden konnte. Parallel dazu wurden adäquate Kontrollen mit denselben Beschichtungen durchgeführt. Dafür wurde auf die entsprechend beschichteten Quarze die Probe aus *Plasmodium falciparum*-infizierten bzw. nicht-infizierten Erythrozyten aufgebracht, inkubiert und fixiert. Die Auswertung erfolgte schnell und präzise unter rein optischen Aspekten unter dem Mikroskop. Um prinzipiell auszuschließen, dass es zu keiner signifikanten Adhäsion an der goldbeschichteten Oberfläche der Schwingquarze kommt, wurde für einen ersten Versuch ein Quarz ohne Beschichtung gewählt. Dabei zeigte der reine Goldquarz eine äußerst vereinzelte Anhaftung sehr weniger infizierter wie auch nicht infizierter Erythrozyten. Es konnte zweifellos davon ausgegangen werden, dass bei einer Vermessung dieser Ankopplung mittels massensensitiver Schwingquarz-Sensoren kein Frequenzabfall der üblichen Größenordnung verzeichnet werden könnte. Die nächsten beiden Quarze der Testreihe wurden nach Protokoll mit Poly-L-Lysin und C32-Membranen beschichtet. Die Bindungsstellen der C32-Membranen für infizierte Erythrozyten wurden mit anti-CD36-Antikörper blockiert. Es kam zu keinerlei Anhaftung von infizierten oder nicht-infizierten Erythrozyten, was zum einen nochmals bestätigte, dass keine unspezifische Bindung an der freien Poly-L-Lysin-Schicht zustande kam. Zum anderen konnte diese Negativkontrolle eindeutig demonstrieren, dass im Umkehrschluss die Bindung ausschließlich zwischen *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten und den CD36 tragenden C32-Membranen möglich und somit spezifisch war, wie auch in einer entsprechenden Positivkontrolle bewiesen wurde. Das von Frau Kömpf erarbeitete Protokoll zur Immobilisierung der C32-Membranen sah die Blockierung der PLL-Schicht mit 2% BSA in PBS-Puffer vor [24]. Um zu prüfen, ob es durch Verwendung anderer Blockierungen

zu Qualitätsunterschieden kommt, wurde die Testreihe mit einer Quarzbeschichtung fortgesetzt, die aus auf Poly-L-Lysin immobilisierten C32-Membranen bestand und jeweils mit CD36 Bindungsmedium, Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+) und BSA blockiert wurde. Dabei zeigten alle Quarze eine lediglich äußerst vereinzelte Adhäsion infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten auf der Oberfläche. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Qualität der Blockierung festgestellt werden, weshalb in folgenden Versuchen die Blockierung der PLL-Schicht mit BSA beibehalten wurde. In einer weiteren externen Ankopplung wurde abschließend noch die Positivkontrolle durchgeführt. Dazu wurden die beiden Quarze nach Protokoll mit der Beschichtung aus PLL und C32-Membranen versehen und blockiert. In diesem Fall kam es zu keiner Adhäsion von Erythrozyten, im Gegensatz dazu aber zu einer eindeutigen Ankopplung zahlreicher *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an der Oberfläche der C32-Membranen. Damit war der Nachweis erbracht, dass es einerseits zwischen den infizierten Erythrozyten und den C32-Membranen zu einer äußerst spezifischen Bindung kam und andererseits die Verwendung von Erythrozytenkonzentrat für die Negativkontrolle der Ankopplungsmessungen zuverlässig und aussagekräftig herangezogen werden konnte. Bevor endgültig mit den eigentlichen Ankopplungsmessungen begonnen wurde, wurden die aus den externen Ankopplungen gewonnenen Erkenntnisse zunächst verwandt, um ergänzend auch im Analysegerät Fidget Type Fg T1 entsprechende Negativkontrollen durchzuführen. Idealerweise verfügte die Sensorplattform über zwei Messkammern, sodass Probe und Kontrolle parallel zueinander vermessen werden konnten. So wurde die rein optische Auswertung des Adhäsionsverhaltens optimal durch quantitative Ergebnisse ergänzt und veranschaulicht. Alle Quarze wurden wieder mit Poly-L-Lysin-Beschichtung und C32-Membranen versehen. Im ersten Versuch wurde die Blockierung der den Rezeptor CD36 tragenden C32-Membranen mit anti-CD36-Antikörper vorgenommen. Das Ergebnis zeigte hier im Gegensatz zur externen Ankopplung eine vermehrte Anlagerung infizierter und nicht infizierter Erythrozyten. Sowohl Probe als auch Kontrolle zeigten jetzt deutliche

Frequenzabfälle. Es war trotz Blockierung zu Adhäsionen gekommen, weshalb die Verwendung von anti-CD36-Antikörper als nicht erfolgreich gewertet werden musste. Weitaus positiver fielen die Ergebnisse der weiteren Versuche mit Blockierungen durch Kulturmedium *P. falciparum* mit 10% Humanserum (AB+) und 2%igem BSA in PBS-Puffer aus. Sowohl die Kurven der Signalfrequenzen als auch die anschließende mikroskopische Betrachtung der fixierten Quarzoberflächen zeigten ein eindeutiges Resultat. In beiden Messungen fand bei der parallelen Negativkontrolle keine Anlagerung von Erythrozyten statt. Die Probe hingegen ließ eine eindeutige Ankopplung infizierter Erythrozyten ausschließlich an den C32-Membranen erkennen. Allerdings war das Ergebnis der mit 2%igem BSA in PBS-Puffer blockierten Oberflächen noch eindeutiger, die Differenz der Resonanzfrequenzen bedeutend größer. Es wurde festgelegt, für die folgenden Ankopplungsmessungen die Blockierung mit 2%-igem BSA in PBS-Puffer in das Protokoll aufzunehmen. Es folgten insgesamt elf mit Erfolg durchgeführte Ankopplungsmessungen von *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten bzw. Erythrozytenkonzentrat auf PLL immobilisierten C32-Membranen. Allesamt zeigten den charakteristischen Kurvenverlauf: die Resonanzfrequenz der Probe führte nach Einleiten der Probe aus infizierten Erythrozyten einen deutlichen Abfall der Resonanzfrequenz, der im Durchschnitt -247,85Hz betrug. Im Falle der Negativkontrolle lag der durchschnittliche Frequenzabfall bei -55,20Hz, was sich durch die Viskosität des Probenvolumens bei Auftreffen auf den Schwingquarz-Sensor erklärte. Die entscheidende Differenz zwischen Frequenzabfall der Probe und Frequenzabfall der Negativkontrolle betrug im Durchschnitt -182,65Hz. Bei diesem Wert kann eine deutliche Unterscheidung der Vorgänge auf der Schwingquarzoberfläche vorgenommen werden. Das mikroskopische Bild der fixierten Schwingquarzoberfläche untermauerte stets das Ergebnis der Resonanzfrequenzen. Ein großer Frequenzabfall korrelierte zuverlässig mit einer zahlreichen Ankopplung infizierter Erythrozyten auf der Schwingquarzoberfläche, eine geringe Änderung der Resonanzfrequenz ließ mit Sicherheit auf eine anlagerungsfreie Oberfläche schließen. Gelegentlich wurden die Quarze auch mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese

Bilder zeigten die angekoppelten infizierten Erythrozyten auf den C32-Membranen in besonderer Deutlichkeit. Zu Beginn und am Ende der Messungen wurde ein Ausstrich der parasitierten Erythrozyten angefertigt, um Anzahl und Vitalitätszustand der späten Trophozoiten und Schizonten zu dokumentieren. Es zeigte sich, dass zu Beginn der Messung stets ein hoher Prozentsatz vital erscheinender Parasiten vorhanden war. Nur so konnte es auch gelingen, die entsprechenden Ankopplungen zu erzielen. Bis zum Ende der Messung gelang es jedoch leider nicht in allen Fällen, diesen Zustand aufrecht zu erhalten, aber doch in ausreichender Form, um eine Verfälschung der Messdaten durch eventuelles Ablösen von avitalen infizierten Erythrozyten zu verhindern, was im Frequenzverlauf durch einen Anstieg verzeichnet worden wäre. Es war auf diese Weise erstmals erfolgreich und reproduzierbar gelungen, den Ankopplungsvorgang *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an die den Rezeptor CD36 tragenden C32-Membranen biosensorisch zu erfassen und darzustellen. Bezüglich der erhaltenen Ergebnisse blieb offen, ob es zu einer spezifischen Bindung infizierter Zellen an den Rezeptor CD 36 kam. Wie bereits erläutert, konnte ein entsprechender Inhibierungsversuch unter Verwendung eines anti-CD36-Antikörpers keine vollständige Unterbindung der Zelladhäsion zeigen. Eine Interaktion infizierter Zellen mit dem Antikörper ist bisher nur bei IgM-Antikörpern bekannt, da es sich bei dem anti-CD36-Antikörper jedoch um einen IgG-Antikörper handelte, war eine solche Interaktion auszuschließen. Es lag daher die Vermutung nahe, dass die Adhäsion über einen weiteren, bisher unbekanntem Rezeptor auf den C32-Membranen vermittelt wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte kein sicherer Beweis für eine spezifische Bindung infizierter Zellen an den Rezeptor CD36 erbracht werden, jedoch konnte das Auftreten solcher Bindungen auch nicht ausgeschlossen werden. Dieser Sachverhalt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus technischen Gründen nicht geklärt werden, die Aufklärung bleibt somit weiteren Arbeiten vorbehalten. Wie bereits zu Beginn erläutert, liegt darin enormes Potential, die Malariaforschung durch weiterführende Analyse dieser erstmals quantitativ erfassbaren Zytoadhäsionsvorgänge unter Einsatz der innovativen QCM-Technologie in

vielerlei Hinsicht entscheidend voranzubringen. Die Übertragung dieses komplexen Prozesses – der ursächlich für die Pathogenese der Malariainfektion ist – auf die Ebene der biosensorischen Messverfahren auf einem Schwingquarz eröffnet völlig neue Dimensionen, um neuartige Medikamente und Therapien zu entwickeln und vor allem auch schnell und zuverlässig auf ihre Wirksamkeit testen zu können. In dieser Arbeit ist die biosensorische Darstellung des durch den Hauptrezeptor CD36 vermittelten Adhäsionsvorganges sowie die Entwicklung einer geeigneten Beschichtung für die Erarbeitung der Vorgänge hinsichtlich des ausschließlich plazentaren Rezeptor CSA gelungen. Auf dieser Basis ist es ebenso realistisch wie visionär, in Zukunft auch die an weitere Rezeptoren gekoppelten Adhäsionsvorgänge übertragen und erforschen zu können. Um dem Bedürfnis nachzukommen, diesen komplexen Ankopplungsvorgang während der ganzen Messung nicht nur graphisch in Form der Frequenzkurve, oder makroskopisch durch das Sichtfenster der Messkammer beobachten zu können, wurde zusätzlich ein weiteres Verfahren erprobt. Dabei war es keinesfalls Ziel, die ursprünglichen Ankopplungsmessungen im Analysegerät *Fidget Type Fg T1* durch dieses Verfahren zu ersetzen, was auch im Hinblick auf eine fehlende quantitative Erfassung wenig sinnvoll erschien. Durch Übertragung des auf der makrofluidischen Sensorplattform erprobten Versuchsablaufes auf die Mikrofluidik wurde es möglich, den gesamten Vorgang mithilfe der integrierten Kamera und entsprechender Time-Lapse-Aufnahmen live mitzuverfolgen. Die Vorgänge auf dem Quarz wurden in zahlreichen Bildern in definierten Zeitabständen festgehalten, wodurch die Adhäsion, vor allem aber auch das beschriebene Entlangrollen der infizierten Erythrozyten an den C32-Membranen beobachtet werden konnte. So war es – wenn auch mangels korrespondierender Messsignale nicht quantitativ erfassbar – möglich, noch einmal einen völlig neuen Eindruck für die zeitlichen Abläufe und eine bildliche Vorstellung des untersuchten Vorganges zu gewinnen. Auch wenn das Verfahren in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde, kann dieses Experiment als äußerst lohnenswerte Aussicht auf eine weitere Darstellungsmöglichkeit

betrachtet werden – die beeindruckenden Bilder (s. Abbildungen 53 und 54) sprechen für sich.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die experimentelle Untersuchung des pathogenen Adhäsionsvorganges der *Malaria tropica* mittels Schwingquarzsensoren. Dazu sollte der Zytoadhäsionsvorgang später Blutstadien *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an die Rezeptoren CD36 und CSA auf die Ebene der innovativen QCM-Technologie übertragen werden. Die Entwicklung und Optimierung geeigneter Beschichtungssysteme für die Schwingquarzsensoren sowie eines Protokolls zur Übertragung der einzelnen Komponenten des Zytoadhäsionsvorganges auf das Analysegerät *Fidget Type Fg T1* waren Hauptbestandteile dieser Arbeit. Dazu wurde zunächst die Beschichtung der Schwingquarzoberfläche mit Poly-L-Lysin durch Immobilisierung von Erythrozyten getestet. Wie die Auswertung der Ankopplungsmessungen ergab, konnte die optimale Beschaffenheit der Oberfläche durch das entwickelte Beschichtungssystem erreicht werden. Die Poly-L-Lysin-Beschichtung konnte somit als Haftvermittler zwischen der Oberfläche der Goldelektrode des Schwingquarzes und dem Rezeptor CD36 eingesetzt werden. Ein Protokoll zur Immobilisierung der den Hauptrezeptor CD36 tragenden C32-Membranen auf Basis der Poly-L-Lysin-Beschichtung entwickelte Frau Dipl. Biol. Daniela Kömpf im Rahmen ihrer Dissertation. In dieser Arbeit gelang der Nachweis der erfolgreichen Immobilisation des in der Plazenta vorkommenden Rezeptors CSA mittels Biotinylierung auf der mit NeutrAvidin beschichteten Schwingquarzoberfläche. Zahlreiche Negativkontrollen und Ankopplungsmessungen zur Überprüfung der NeutrAvidinschicht sowie des Ankopplungsverhaltens des biotinylierten CSA belegten dieses Ergebnis. Tests mit Langzeitankopplungsmessungen von Erythrozyten an mit Poly-L-Lysin beschichteten Schwingquarzen ergaben, dass nach entsprechender Entgasung des Mediums unter Vakuum die Einhaltung der sensiblen Kulturbedingungen für *Plasmodium falciparum* im Analysegerät *Fidget Type Fg T1* zuverlässig gelang. Außerdem war gesichert, über den gesamten Zeitraum der Messung ein konstantes und zuverlässiges Frequenzsignal zu erhalten. Diese Optimierung der Langzeitankopplungsmessungen und Beschichtungssysteme ebnete den Weg zu Ankopplungsmessungen mit infizierten Erythrozyten. Die spezifische

Bindung der *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten an den auf PLL immobilisierten C32-Membranen belegte eine Testreihe externer Ankopplungsmessungen mit Quarzen unterschiedlicher Beschichtung. Unter Einsatz aller erworbenen Erkenntnisse gelang es sodann erstmals, den Ankopplungsvorgang *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an die den Hauptrezeptor CD36 tragenden C32-Membranen im Analysegerät Fidget Type Fg T1 biosensorisch reproduzierbar zu erfassen. Dabei wurden sehr zuverlässig spezifische Bindsignale erhalten, die sich deutlich von den Kontrollen mit nicht-infizierten Erythrozyten unterschieden. Als weitere Möglichkeit zur Visualisierung des komplexen Zytoadhäsionsvorganges wurde der Versuchablauf abschließend auf die mikrofluidische Sensorplattform übertragen und konnte so mithilfe entsprechender Time-Lapse-Aufnahmen live mitverfolgt werden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Aikawa M. (1988), Morphological changes in erythrocytes induced by malarial parasites. *Biol Cell* 64: 173-81.
- [2] Barragan A., Kremsner P.G., Wahlgren M. and Carlson J. (2000), Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect Immun* 68(5): 2971-5.
- [3] Baruch D.I., Gormley J.A., Ma C., Howard R.J. and Pasloske B.L. (1996), *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3497-502.
- [4] Beeson J.G., Andrews K.T., Boyle M., Duffy M.F., Choong E.K., Byrne T.J., Chesson J.M., Lawson A.M. and Chai W. (2007), Structural basis for binding of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 to chondroitin sulfate and placental tissue and the influence of protein polymorphisms on binding specificity. *J Biol Chem* 282(31): 22426-36.
- [5] Buffet P.A., Gamain B., Scheidig C., Baruch D., Smith J.D., Hernandez-Rivas R., Pouvelle B., Oishi S., Fujii N., Fusai T., Parzy D., Miller L.H., Gysin J., Scherf A. (1999), *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12743-8.
- [6] Bustos Cruz R.E. (2010), Development of a novel real-time method to study the erythrocytic life cycle of *Plasmodium falciparum* using Quartz Crystal Microbalances. Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen
- [7] Chen B.Q., Barragan A., Fernandez V., Sundström A., Schlichtherle M., Sahlén S., Carlson J., Datta S. and Wahlgren M. (1998), Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as a

-
- rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. J Exp Med 187(1): 15-23.
- [8] Claußen J. (2007), Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren. Dissertation, Universität Kaiserslautern
- [9] Coatney G.R., Collins W.E., Warren M., Contacos P.G. (1971), The Primate Malaria. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda.
- [10] Cooke B.M., Rogerson S.J., Brown G.V. and Ross L. Coppel R.L. (1996), Adhesion of malaria-infected red blood cells to chondroitin sulfate A under flow conditions. Blood 88(10): 4040-4.
- [11] McCormick C.J., Craig A., Roberts D., Newbold C.I. and Berendt A.R. (1997), Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells. J Clin Invest 100(10): 2521-9.
- [12] Curtidor H., Torres M.H., Alba M.P. and Patarroyo M.E. (2007), Structural modifications to a high-activity binding peptide located within the PfEMP 1 NTS domain induce protection against *P. falciparum* malaria in *Aotus* monkeys. J Biol Chem 388: 25-36.
- [13] Dönges J. (1988), Parasitologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- [14] Frank W., Lieder J. (1986): Taschenatlas der Parasitologie für Humanmediziner, Veterinärmediziner und Biologen. Kosmos Verlag.
- [15] Frankland S., Elliott S.R., Yosaatmadjy F., Beeson J.G., Rogerson S.J., Adisa A. and Tilley L. (2007), Serum lipoproteins promote efficient

-
- presentation of the malaria virulence protein PfEMP1 at the erythrocyte surface. *Eukaryot Cell* 6(9): 1584-94.
- [16] Gehring F.K. (2005), Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten – Entwicklung eines Blutanalysegerätes. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- [17] Gruarin P., Primo L., Ferrandi C., Bussolino F., Tandon N.N., Arese P., Ulliers D., and Alessio M. (2001), Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is mediated by a redox-dependent conformational fraction of CD36. *J Immunol* 2001(167): 6510-17.
- [18] Ho M. and White N.J. (1999), Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: 1231-42.
- [19] Hof H., und Dörries R. (2005), Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- [20] Horrocks P., Pinches R.A., Chakravorty S.J., Papakrivos J., Christodoulou Z., Kyes S.A., Urban B.C., Ferguson D.J. and Newbold C.I. (2005), PfEMP1 expression is reduced on the surface of knobless *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *J Cell Sci* 118: 2507-18.
- [21] Janshoff A., Galla H.-J. und Steinem C. (2000), Die Quarzmikrowaage in den Biowissenschaften. *Angew. Chem.* 112: 4164-95.
- [22] Knobloch J. (1996), Tropen- und Reisemedizin. Gustav Fischer Verlag Jena
- [23] Robert Koch Institut, Ratgeber Infektionskrankheiten, Merkblätter für Ärzte. Aktualisierte Fassung vom Februar 2006.
- [24] Kömpf D., Dissertation in Vorbereitung, Eberhard Karls Universität: Tübingen.

-
- [25] Kretschmer H., Bienzle U., Klauß V., Kreamsner P.G., Leichsenring M. in Knobloch, J. (ed.) (1996), Tropen- und Reisemedizin. Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart Lübeck Ulm.
- [26] Lang W. und Meta A. (2000), Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Thieme Verlag Stuttgart.
- [27] Ljungström I., Perlmann H., Schlichtherle M., Scherf A. und Wahlgren M. (2004), Methods in Malaria Research. Manassas, Virginia.
- [28] Löscher T., Hoelscher M., Nothdurft H.D. (2003), Malaria - Diagnostik. Dtsch Med Wochenschr 128: 1290-3.
- [29] Lucius R., Loos-Frank B. (1997), Parasitologie - Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- [30] Lucius R., Loos-Frank B. (2008), Biologie von Parasiten. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [31] Mackenstedt U., Brockelman C.R., Mehlhorn H. and Raether W. (1989), Comparative morphology of human and animal malaria parasites, Parasitol Res 75: 528-35.
- [32] Mehlhorn H. und Piekarski G. (2002), Grundriß der Parasitenkunde. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- [33] Muthusamy A., Achur R.N., Valiyaveetil M., Botti J.J., Taylor D.W., Leke R.F. and Gowda D.C. (2007), Chondroitin sulfate proteoglycan but not hyaluronic acid is the receptor for the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in human placenta and infected red blood cell adherence up-regulates the receptor expression. The Am J Pathol 170(6): 1-12.

-
- [34] Ockenhouse C.F., Klotz F.W., Tandon N.N. and Jamieson G.A. (1991), Sequestrin, a CD36 recognition protein on *Plasmodium falciparum* malaria-infected erythrocytes identified by anti-idiotypic antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 88: 3175-9.
- [35] Ockenhouse C.F., Klotz F.W., Tandon N.N. and Jamieson G.A. and Greenwalt D.E. (1993), Antigenic and functional differences in adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human and bovine CD36. Infect Immun 61 (5): 2229-32.
- [36] Pasloske, B.L. and R.J. Howard (1994), Malaria, the red cell and the endothelium. Annu Rev Med 45: 283-95.
- [37] Piekarski G. (1987), Medizinische Parasitologie in Tafeln. Springer-Verlag.
- [38] Ribaut C. (2008), Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human Plasmodium species. Malar J 2008(7): 45.
- [39] Rogers N., Targett G.A. and Hall B.S. (1996), *Plasmodium falciparum* gametocyte adhesion to C32 cells via CD 36 is inhibited by antibodies to modified band 3. Infect Immun 64(10): 4261-8.
- [40] Rug M., Prescott S.W., Fernandez K.M., Cooke B.M. and Cowman A.F. (2006), The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum* -infected human erythrocytes. Blood 2006(108): 370-8.
- [41] Scherf A., Hernandez-Rivas R., Buffet P., Bottius E., Benatar C., Pouvelle B., Gysin J. and Lanzer M. (1998), Antigenic variation in malaria: *in situ* switching, relaxed and mutually exclusive transcription of *var* genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. Embo J 17(18): 5418-26.

-
- [42] Schoch M. (2008), Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren. Dissertation, Universität Tübingen.
- [43] Schumacher R. (1999), Die Schwingquartzmethode. *Chemie in unserer Zeit* 33(5): 268-78.
- [44] Smith J.D., Gamain B., Baruch D.I. and Kyes S. (2001), Decoding the language of var genes and *Plasmodium falciparum* sequestration. *Trends Parasitol* 17(11): 538-45.
- [45] Snow R.W., Guerra C.A., Noor A.M., Myint H.Y., Hay S.I. (2005), The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434: 214-7.
- [46] Udomsangpetch R., Webster H.K., Pattanapanyasat K., Pitchayangkul S. and Thaithong S. (1992), Cytoadherence characteristics of rosette-forming *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 60(11): 4483-90.
- [47] Viebig N.K., Wulbrand U., Förster R., Andrews K.T., Lanzer M. and Knolle P.A. (2005), Direct activation of human endothelial cells by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect Immun* 73(6): 3271-7.
- [47] Waller K.L., Nunomura W., Cooke B.M., Mohandas N., Coppel R.L. (2001), Mapping the domains of the cytoadherence ligand *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) that bind to the knob-associated histidine-rich protein (KAHRP). *Mol Biochem Parasitol* 119(1): 125-9.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Northoff vom Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) gilt mein besonderer Dank für die Annahme als Doktorandin, für die Betreuung meiner Dissertation sowie für die hilfreichen Anregungen und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Dr. F. K. Gehring, dem Arbeitsgruppenleiter der Biosensorikgruppe Tübingen, danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die gute und persönliche Betreuung und die zahlreichen Anregungen und innovativen Ideen während meiner Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. B. Mordmüller vom Institut für Tropenmedizin, der es ermöglichte, die Zellkulturen am Institut durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Daniela Kömpf für die geduldige Einarbeitung und großartige Betreuung während meiner ganzen Promotionszeit. Ihre Motivation und ihr unermüdlicher Einsatz für unser gemeinsames Thema war mir eine große Hilfe und hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auf sie ist einfach immer Verlass und die Zusammenarbeit mit ihr war mir eine große Freude.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten Biosensorikgruppe für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere den Herren Dr. Hartmut Drechsel, Dr. Joachim Heimberger, Dr. Lothar Müller und Dr. Michael Wandel danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft, ihre Unterstützung in Rat und Tat und viele motivierende Gespräche, aus denen oft hilfreiche Ideen hervorgegangen sind.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin sowie des Instituts für Tropenmedizin in Tübingen danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut und die kooperative Zusammenarbeit. Mein spezieller Dank gilt Frau Dr. Jana Held, Frau Evelyn Böttger und Frau Serena Tschan für die geduldige Unterstützung und Beratung bei der Kultivierung der Parasitenkulturen.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern Rudolf und Angelika Kleiner und meinem Freund Michael Müller die immer für mich da sind, in meine Fähigkeiten vertrauen und deren Liebe und Unterstützung mir Mut und Kraft geben.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefani Franziska Kleiner

Geburtsdatum: 10.12.1984

Geburtsort: Sigmaringen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1991 - 1994 Grundschule Laiz

1994 - 2004 Gymnasium Heimschule Kloster Wald

Juni 2004 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

2000 – 2005 Schulbegleitende Ausbildung zur Damenschneiderin,
Lehrwerkstätten Heimschule Kloster Wald

März 2005 Abschluss der Gesellenprüfung im Damenschneider-
Handwerk

Studium

April 2005 - Mai 2010 Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard Karls
Universität Tübingen

März 2006 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

Oktober 2007 Zahnärztliche Vorprüfung

25. Mai 2010 Zahnärztliche Prüfung und Approbation

