

**Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin  
Der Universität Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff**

**Untersuchung der Malariainfektion  
Mittels Schwingquarzsensoren:**

**Erprobung thermischer Trigger zur Freisetzung von Merozoiten  
aus dem Erythrozyten**

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

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

**vorgelegt von  
Katrin Julia Wirth  
aus Dresden  
2014**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Wendel

Diese Dissertation entstand in der Zeit von März 2008 bis August 2013 innerhalb der Biosensorik-Gruppe (Arbeitsgruppe Gehring) des Instituts für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H. Northoff) unter der Anleitung von Dr. rer. nat. Frank K. Gehring.

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Malaria .....	1
1.1.1.	Zahlen und Verbreitung .....	1
1.1.2.	Malaria tertiana .....	3
1.1.3.	Malaria quartana .....	4
1.1.4.	Malaria tropica .....	4
1.2.	Humanpathogene Plasmodien .....	6
1.3.	Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	8
1.3.1.	Entwicklung im Vektor .....	8
1.3.2.	Entwicklung im Menschen .....	9
1.4.	Der Merozoitenaustritt aus dem Erythrozyten .....	10
1.5.	Schwingquarzsensoren .....	11
1.5.1.	Aufbau des FidgeType FgT1 .....	11
1.6.	Ziel der Arbeit .....	14
2.	Material.....	16
2.1.	Laboraausstattung .....	16
2.2.	Verbrauchsmaterialien .....	17
2.3.	Chemikalien .....	18
2.4.	Lösungen .....	19
2.5.	Zellkulturen.....	20
2.6.	Software .....	20
3.	Methoden.....	21
3.1.	Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	21
3.1.1.	Giemsafärbung zur Bestimmung der Parasitämie .....	21
3.1.2.	Synchronisierung .....	21
3.2.	Versuchsvorbereitung .....	22
3.2.1.	Quarzreinigung .....	22
3.2.2.	Quarzbeschichtung .....	22

3.2.3.	Vorbereitung des Mediums .....	23
3.2.4.	Vorbereitung der Messanlage.....	23
3.2.5.	Vorbereitung der Proben .....	24
3.3.	Versuchsdurchführung .....	25
3.3.1.	Ankopplungsmessung zur Testung der Schicht .....	25
3.3.2.	Langzeitmessung zur Testung der Schichtstabilität .....	25
3.3.3.	Testung der Auswirkung der Temperatur auf die Frequenz .....	26
3.3.4.	Langzeitankopplungsmessung mit <i>Plasmodium falciparum</i> und Temperaturrampe .....	26
4.	Ergebnisse.....	29
4.1.	Ankopplungsmessung zur Testung der PLL- Schicht .....	29
4.2.	Langzeitankopplungsmessung zur Testung der Schichtstabilität .....	30
4.3.	Testung der Auswirkung von Temperaturveränderungen auf die Frequenz .....	31
4.4.	Langzeitankopplungsmessung mit <i>Plasmodium falciparum</i> und Temperaturrampe .....	32
4.4.1.	Rampe 1 .....	34
4.4.2.	Rampe 2 .....	37
4.4.3.	Rampe 3 .....	40
4.4.4.	Rampe 4 .....	43
4.4.5.	Rampe 5 .....	46
4.4.6.	Rampe 6 .....	49
4.4.7.	Frequenzschwankungen bei Probenaufnahme .....	51
4.4.8.	Zusammenfassung .....	53
4.5.	Fehlerbreite .....	55
4.5.1.	Fehler bei der Quarzbeschichtung mit PLL .....	55
4.5.2.	Luftblasenproblematik.....	55
4.5.3.	Kontaktierung am FidgeType FgT1 .....	55
4.5.4.	<i>Plasmodium falciparum</i> - Kultur .....	56

5.	Diskussion .....	57
5.1.	Ankopplungsmessung zur Testung der PLL- Schicht .....	57
5.2.	Langzeitankopplungsmessung zur Testung der Schichtstabilität .....	58
5.3.	Testung der Auswirkung von Temperaturveränderungen auf die Frequenz .....	59
5.4.	Langzeitankopplungsmessung mit <i>Plasmodium falciparum</i> und Temperaturrampe .....	60
6.	Zusammenfassung .....	65
7.	Literaturangaben .....	66
8.	Abbildungen.....	72
9.	Danksagungen .....	73
10.	Lebenslauf.....	74

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
Hz	Hertz
ICAM1	InterCellular Adhesion Molecule 1
KAHRP	Knob- Associated Histidine-Rich Protein
IL	Interleukin
l	Liter
LDH	Low Density Lipoprotein
m	Meter
MACS	Magnetic Cell Sorting
mmol	millimol
P.	Plasmodium
PFA	Paraformaldehyd
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrozyte membrane protein-1
PfHSP70-I	<i>Plasmodium falciparum</i> heat shock protein 70-I
PLL	Poly-L-Lysin
QCM	Quartz crystal microbalance
rpm	rotations per minute
SERA	Serine repeat antigen
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt
WHO	World Health Organisation
yr	year

# 1. Einleitung

## 1.1. Malaria

### 1.1.1. Zahlen und Verbreitung

Malaria ist die häufigste parasitäre Tropenkrankheit (1). Sie ist nicht nur der Grund für schwere Erkrankungen und Todesfälle, sondern beeinflusst auch das Gesundheitssystem, das wirtschaftliche Wachstum und die Entwicklung in stark betroffenen Gebieten (2). Heute belaufen sich die Schätzungen von jährlichen Neuerkrankungen auf ungefähr 500 Millionen. Circa 1,5 bis 2,7 Millionen sterben jedes Jahr an den Folgen der Malariainfektion (Abb. 1) (3); davon sind circa 75% afrikanische Kinder.

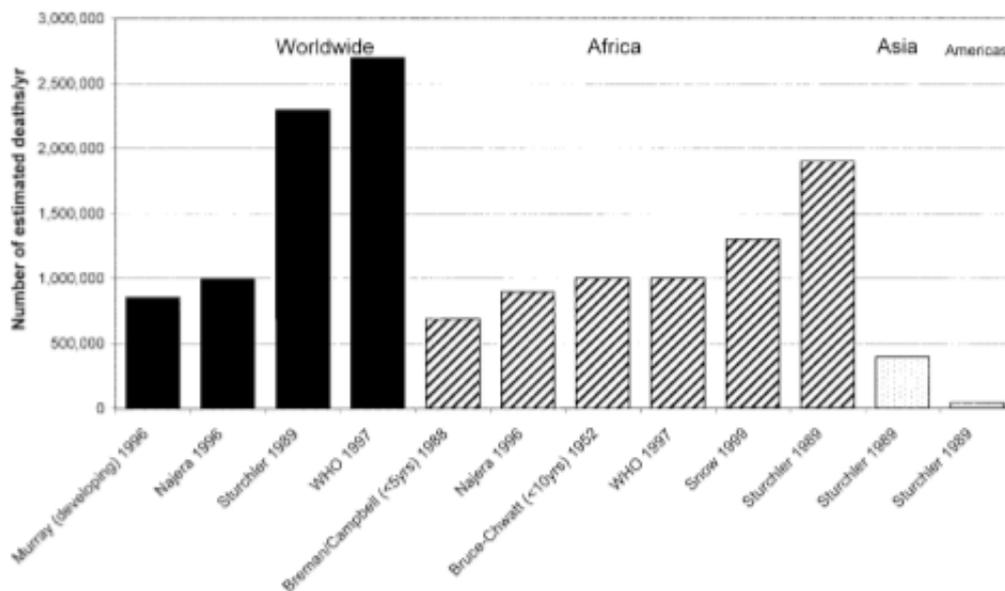


Abb. 1: Geschätzte weltweite und regionale Malariatodesfälle von 1952- 1999

Die genaue Quantifizierung der Malariaerkrankung ist sehr schwierig, da sie bei partiell immunen Personen auch asymptomatisch ablaufen kann. Des Weiteren kann sie sich nur in akuten cerebralen Symptomen und Tod oder in permanenten neurologischen Folgeschäden äußern. Weiterhin können andere fieberauslösende Erkrankungen Malariasymptome simulieren. Durch die oft

schlechte medizinische Versorgung in den meisten von Malaria betroffenen Ländern bleibt die genaue Diagnose oft aus und viele Fälle werden durch eine unzureichende Überwachung der Infektion nie gemeldet (4).

Die am häufigsten betroffenen Länder befinden sich südlich der Sahara, wie zum Beispiel Uganda, Tansania, Malawi, und Mosambik (5). Aber auch Teile Asiens, Süd- und Mittelamerikas sind betroffen (Abb. 2).

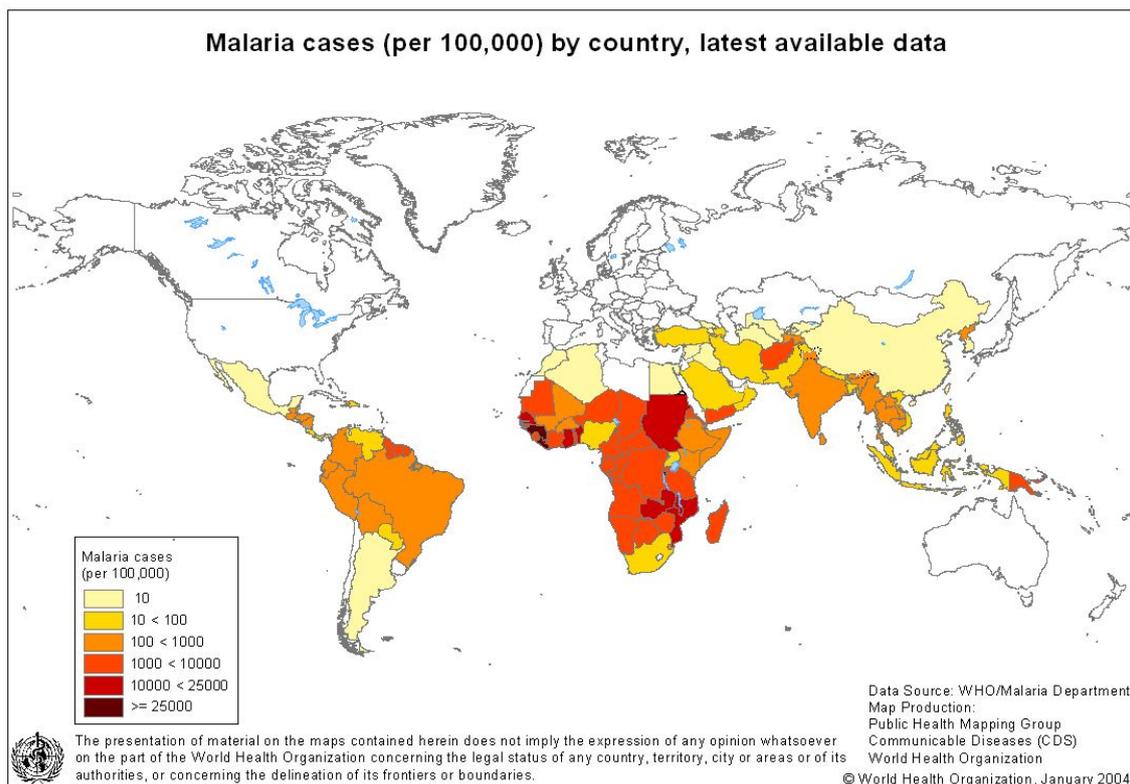


Abb. 2: Zahl der weltweiten Malariafälle, WHO 2004

Diese Länder sind vor allem betroffen, da sie optimale Bedingungen für die Vermehrung von Anopheles- Mücken bieten, die den Malariaparasiten auf den Menschen übertragen. Tropische Gebiete mit warmen Temperaturen, starken Regenfällen, hoher Luftfeuchte und stillen Gewässern, die der Sonnenstrahlung ausgesetzt sind, dienen vor allem *Anopheles gambiae* als Lebensraum. Doch die geeignete Umgebung zur Vermehrung des Vektors ist nur eine Komponente, die zur Verbreitung von Malaria führt. Die Immunität der Bevölkerung, die Art des Parasiten, die Langlebigkeit des Vektors und die Bereitschaft des Einzelnen auf der einen Seite und eine verbesserte Bildung

sowie wirtschaftliche und soziale Standards, Gesundheitssystem, Beseitigung von Brutplätzen der Moskitos, der Einsatz von Fliegengittern an Fenstern und Türen, Moskitonetze über Betten, die Verwendung von Insektenschutzmitteln und Insektiziden auf der anderen beeinflussen die Verbreitung der Krankheit. Da vor allem in armen Bevölkerungsschichten die Mittel zur Bekämpfung der Ausbreitung von Malaria fehlen, ist die Krankheit vor allem bei diesen Menschen vorherrschend (4).

### **1.1.2. Malaria tertiana**

Diese Form der Malaria wird von *Plasmodium vivax* und von *Plasmodium ovale* ausgelöst. Sie ist eine schwere Form der Malaria, die dennoch nicht lebensbedrohlich verläuft (3). Wie alle anderen Arten der Malaria auch wird sie durch den Stich der weiblichen Anopheles- Mücke übertragen, die vor allem nachtaktiv ist (6). 43% aller Malariaerkrankungen werden durch *Plasmodium vivax* ausgelöst (7).

Nach einer Inkubationszeit von meist 12 bis 20 Tagen kommt es zunächst zu folgenden Symptomen: subfebrile Temperaturen, Abgeschlagenheit, Kopf- und Rückenschmerzen. Danach folgen Fieberschübe die einen Rhythmus von 48h einhalten, also an jedem dritten Tag auftreten, daher der Name Malaria tertiana (6). Die Fieberschübe äußern sich in Schüttelfrost und mehreren Stunden anhaltendem Fieber von 40 bis 41°C und klingen mit Schweißausbrüchen wieder ab. Ohne Behandlung kommt es zu einer Reihe von 10- 15 Anfällen die in ihrer Intensität langsam abnehmen (8).

Die Besonderheit von *P. vivax* und *P. ovale* ist die Ausbildung von Hypnozoiten. Diese bilden sich im Leberstadium des Entwicklungszyklus und können noch Monate und Jahre nach der Ersterkrankung zu Rückfällen führen (9). Des Weiteren befallen sie nur frühe Erythrozytenstadien (Retikulozyten), wodurch sich die Parasitämie auf durchschnittlich 1% beschränkt(1).

### **1.1.3. Malaria quartana**

Die Malaria quartana wird durch *Plasmodium malariae* ausgelöst und geht mit Fieberschüben im Abstand von 72h einher. Es befällt nur reife Erythrozyten, was wie bei der Malaria tertiana zu einer Parasitämie von circa 1% führt (7).

Die Inkubationszeit kann bis zu 4 Wochen oder länger dauern. Der Ablauf der Erkrankung ist sonst der Malaria tertiana sehr ähnlich und verläuft bei Erwachsenen meist gutartig. Unterschiede sind zum einen, dass es nicht zur Ausbildung von Hypnozoiten kommt. Dennoch kann es auch Jahre später noch zu Rückfällen kommen. Zum anderen kommt es vor allem bei Kindern oft zur Ausbildung eines nephrotischen Syndroms auf Grund von Immunreaktionen des Körpers und ist mit einer hohen Letalität verbunden (6).

### **1.1.4. Malaria tropica**

Durch *Plasmodium falciparum* verursacht, ist die Malaria tropica die am meisten verbreitete mit circa 50% aller Erkrankungen und die gefährlichste aller Malariaformen (7). Nach einer Inkubaionszeit von 6- 14 Tagen kommt es zunächst zu unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Rücken- und Kopfschmerzen, sowie subfebrilen oder unregelmäßigen febrilen Temperaturen. Später kommt es zu steigenden Temperaturen, die selten einen Rhythmus aufweisen wie es bei den oben beschriebenen Formen der Fall ist. Weitere Symptome einer unkomplizierten Malaria tropica sind in Abb. 3 zusammengefasst (6).

- Splenomegalie
- Hepatomegalie
- normochrome Anämie durch
- Hämolyse und gehemmte Knochenmarksfunktion
- Eosinopenie
- mäßige Monozytose
- Thrombozytopenie
- selten Leukozytopenie
- erhöhte LDH- und Cholesterin-Werte
- niedrige Hepatoglobulin- und Triglyzerid- Werte

Abb. 3: Symptome einer unkomplizierten Malaria tropica

Wird die Diagnose nicht schnell genug erstellt und bleibt somit eine rasche Therapie aus kommt es zur Beteiligung anderer Organe wie dem Zentralen Nervensystem, der Niere, der Leber, der Lunge und dem blutbildenden und endokrinen System. Jetzt spricht man von einer komplizierten Malaria tropica, deren Symptome in Abb. 4 aufgelistet sind (3). Eine unbehandelte Malaria tropica führt in 10 bis 20% zum Tod (6).

- Bewusstseinstörung
- zerebraler Krampfanfall
- schwere Anämie (Hb < 8g/dl bei nicht immunen Personen)
- Niereninsuffizienz (Ausscheidung < 400ml/24h)
- respiratorische Insuffizienz, unregelmäßige Atmung, Hypoxie
- Hypoglykämie (Blutzucker >40mg/dl)
- Schocksymptomatik
- Spontanblutungen
- Azidose (Plasmabikarbonat > 15mmol/l)
- Hämoglobinurie
- Ikterus (Bilirubin >3mg/dl)
- Transaminasen (> 3fache Norm)
- Hyperparasitämie (> 5% der Erythrozyten von Plasmodien befallen)

Abb. 4: Symptome der komplizierten Malaria tropica

## 1.2. Humanpathogene Plasmodien

Bei Plasmodien handelt es sich um Einzeller der Gruppe der Sporozoa. Sie werden durch den Stich der Anopheles-Mücke nur auf den Menschen übertragen (8). Von über 120 Arten sind nur vier humanpathogen, nämlich die auch schon oben genannten *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. falciparum*. Von diesen vier kann nur das *Plasmodium falciparum* in vitro kultiviert werden, für alle anderen Arten werden Versuchstiere benötigt (6).

Außer bei *P. falciparum* verläuft der Entwicklungszyklus stets streng synchron. Bei *P. vivax* und *P. ovale* beträgt die Dauer des erythrozytären Zyklus 48 Stunden, daher treten die Fieberanfälle auch immer in diesem Abstand auf. Bei *P. malariae* beträgt die Dauer 72 Stunden, auch hier folgen die Fieberschübe diesem Intervall. Nur bei *P. falciparum* verläuft der Zyklus nicht synchron und so fehlt häufig die Charakteristik der wiederkehrenden Fieberschübe. Hier kommt es oft zu andauerndem hohem Fieber (7).

Das Fieber ist eine Reaktion auf Malaria- Antigene, die von zu Grunde gehenden Erythrozyten in den Blutstrom entlassen werden. Sie führen zur Ausschüttung von Tumornekrose- Faktor (TNF $\alpha$ ) und Zytokinen (IL-1, IL- 6, IL- 8, u.a.), was vermutlich zur Fieberentwicklung führt. Des Weiteren ist vermutlich Hämozoïn daran beteiligt (1).

Ein sehr wichtiges Merkmal von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten ist die Fähigkeit an kapilläre Endothelzellen zu binden. Dadurch können sie der Elimination in der Milz entgehen. Dieser Vorgang beginnt damit, dass parasitäre Proteine in das Zytosol und die Zellmembran der Erythrozyten sezerniert werden. Von besonderer Bedeutung scheint zum ersten das knob-associated histidine- rich protein (KAHRP) zu sein, das zu Veränderungen der Erythrozytenmembran führt, den so genannten knobs. Diese knobs beinhalten unter anderem ein zweites wichtiges Protein, *P. falciparum* erythrocyte membrane protein- 1 (PfEMP1) (10).

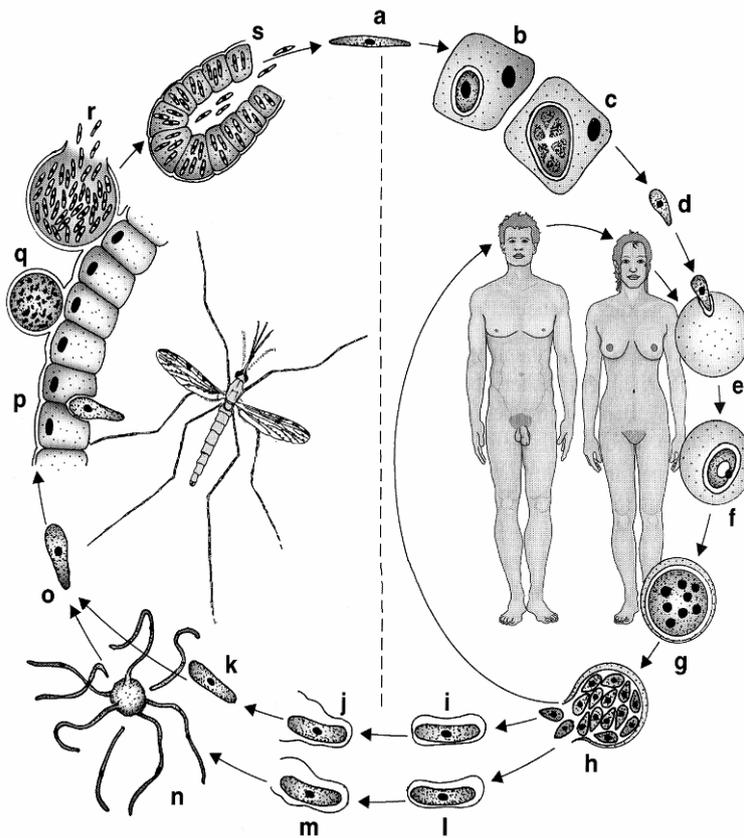
Dieses Protein gehört zur Familie der Adhäsionsproteine und führt zur Bindung an verschiedene Rezeptoren des Endothels. In den Kapillaren des Gehirns spielt vor allem das Molekül ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1) eine Rolle, in der Plazenta dagegen vor allem Chondroitinsulfat A (7). Aber auch CD36 ist ein wichtiger Rezeptor im Rest des Körpers.

Als weitere Folge der Endothelbindung kommt es zur Rosettenbildung. Darunter versteht man die Behinderung der Mikrozirkulation durch die Zusammenlagerung von infizierten und gesunden Erythrozyten. Durch den gestörten Austausch von Gasen und Nährstoffen kommt es zu Organschäden, was sich vor allem im Gehirn gravierend auswirkt (1). Dies ist eine Ursache der zerebralen Malaria, die zu Bewußtseinstörung und tiefem Koma führen kann.

Allerdings spielen hier noch vielzählige immunpathologische Faktoren eine Rolle (6).

### 1.3. Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Da die Experimente mit *Plasmodium falciparum* durchgeführt wurden, soll hier speziell dessen Lebenszyklus beschrieben werden.



- a: Sporozoit
- b: Trophozoit in Leberzelle
- c: Leberschizont
- d: Merozoit aus Leberzelle
- e: Invasion eines Erythrozyten
- f: Siegelringstadium
- g: Schizont
- h: Merozoiten
- i und j: Makrogametozyten
- k: Makrogamet
- l und m: Mikrogametozyten
- n: Exflagellation, die zur Bildung der Mikrogameten führt
- o: Zygote
- p: Ookinet
- q: Oozyste
- r: Sporozoiten werden aus der Oozyste frei und wandern in die Speicheldrüse ein
- s: Stich der Anopheles und Sporozoitenübertragung.

Abb. 5: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

#### 1.3.1. Entwicklung im Vektor

Der Malariaparasit wird ausschließlich durch die weibliche Anophelesmücke übertragen. Die Mücke selbst kann nur durch eine Blutmahlzeit an einem Malariapatienten infiziert werden. In ihr findet dann die geschlechtliche Phase des Zyklus statt.

Mit dem Blut des Patienten werden Gametozyten aufgenommen, die im Mückendarm zu Gameten heranreifen. Nach der Befruchtung kommt es zur Bildung von Ookineten. Diese sind beweglich und durchwandern das

Darmepithel, wo sie sich auch zu Oozysten entwickeln. Aus diesen bilden sich durch mehrfache Teilung tausende Sporozoiten, die in die Speicheldrüse der Mücke wandern und von dort durch eine weitere Blutmahlzeit auf den Menschen übertragen werden können (9).

### **1.3.2. Entwicklung im Menschen**

#### **1.3.2.1. Leberstadium**

Dieses Stadium wird auch als exoerythrozytäre Schizogonie bezeichnet (11) und geht ohne Krankheitszeichen einher. Nachdem mit dem Speichel der Mücke 15 bis 123 Sporozoiten in der menschlichen Blutbahn hinterlassen wurden, gelangen diese innerhalb weniger Minuten zur Leber.

In den Lebersinusoiden spielen sowohl parasitäre als auch humane Moleküle eine Rolle für die Bindung der Sporozoiten. Diese gelangen vor allem durch 2 Wege durch das Sinusendothel. Zum ersten durch die Sinusendothelzellen selbst, in dem sie deren Plasmamembran zerstören und zum zweiten durch Kupffer- Zellen durch die Ausbildung einer parasitophoren Vakuole.

Nachdem sie den perisinusoidalen- oder Disse- Raum durchdrungen haben, durchdringen die Sporozoiten zunächst mehrere Hepatozyten, ohne diese jedoch dauerhaft zu beschädigen. Ist der letzte Hepatozyt erreicht, kommt es zur Vermehrung und Ausbildung von Merozoiten (30000 bei *P. falciparum* (11)). Diese werden durch noch ungeklärte Mechanismen in den Blutstrom entlassen (12).

#### **1.3.2.2. Blutstadium**

Im Blutstrom kommen die Merozoiten in Kontakt mit Erythrozyten, dies führt dazu, dass sie unter der Ausbildung einer parasitophoren Vakuole in den Erythrozyten eindringen (13). Das erythrozytenparasitäre Stadium ist verantwortlich für jegliche Krankheitssymptome.

Im Erythrozyten entwickeln sich die Parasiten vom unreifen Trophozoiten (Ringstadium) zum reifen Trophozoiten und dann durch mitotischen Teilung

zum Schizonten. Diese bestehen je nach Spezies aus 6 - 32 Merozoiten, die in den Blutstrom entlassen werden und neue Erythrozyten infizieren. Hierzu haben sie nur wenig Zeit. Freie Merozoiten im Plasma sterben innerhalb weniger Minuten ab(32). In diesem Zyklus differenzieren sich einzelne Merozoiten zu männlichen und weiblichen Gametozyten, die von einem Moskito durch eine Blutmahlzeit wieder aufgenommen werden können (2).

#### **1.4. Der Merozoitenaustritt aus dem Erythrozyten**

Der Austritt der Merozoiten aus dem Erythrozyten ist ein noch ungenügend erforschter Prozess. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass es sich um eine komplizierte proteolytische Kaskade handelt, die zur Zerstörung der Membranen der parasitophoren Vakuole und des Erythrozyten führt. Eine der wichtigsten Proteasen dieses Prozesses ist allerdings mittlerweile identifiziert. Die Subtilisin-like Protease wird von einem Zellorganell, dem Exonem in die parasitophore Vakuole sezerniert. Dort führt es zur Aktivierung der SERAs, den Serine repeat Antigens. Diese führen zu weiteren Prozessen, die zum Merozoitenaustritt beitragen. (14, 15)

## **1.5. Schwingquarzensensorik**

Die Schwingquarzensensorik bedient sich dem Prinzip des akustischen Biosensors. Ein Biosensor ist eine Kombination aus einem Rezeptor zur molekularen Erkennung und einem Messwertaufnehmer, der die Wechselwirkungen in ein elektrisches Signal umwandelt. In diesem Fall wurde ein  $\alpha$ -Quarz ( $\text{SiO}_2$ ) verwendet, der an den aufgebrachtten Elektroden durch das Anlegen einer hochfrequenten Wechselspannung in mechanische Schwingung versetzt wird und so eine elektrische Ladung an seiner Oberfläche erzeugt, die über einen Frequenzzähler ausgelesen werden kann. Dies bezeichnet man als piezoelektrischen Effekt. Dieser Effekt wurde schon im Jahr 1880 von den Gebrütern Curie entdeckt und wird allgemein definiert als die Erzeugung einer elektrischen Ladung an der Oberfläche eines Festkörpers durch Zug, Druck oder Torsion. Durch diesen Effekt ist es möglich, an der Quarzoberfläche gebundene Massen im Nanogramm-Bereich zu wägen, da ein linearer Zusammenhang zwischen Frequenzänderung und Massebeladung zu stande kommt. Daher der Name Quarzmikrowaage oder auch quartz crystal microbalance (QCM).

Die Schwingquarzensensorik findet inzwischen ein sehr breites Anwendungsgebiet in der Forschung, wie zum Beispiel die Erprobung von Protein- Rezeptor- Wechselwirkungen, die Detektion von Viren, Bakterien und anderen Zellen, die Untersuchung des Adhäsionsverhaltes von Proteinen, Zellen und Membranen, die Blutgruppenbestimmung und viele mehr (16, 17, 18).

### **1.5.1. Aufbau des FidgeType FgT1**

Das in dieser Arbeit verwendete Gerät ist das von Dr. rer. nat. Frank Gehring entwickelte FidgeType FgT1. Es handelt sich hier um ein vollautomatisches 2-Kammer Analysegerät. Es besteht aus einer Sensorplattform und einem Steuergerät.

Die Sensorplattform (Abb. 7) besteht aus der 2- Kanal Sensoreinheit. Hier können in 2 getrennten Messkammern 2 Schwingquarze integriert werden und es können 2 verschiedene Proben untersucht werden. Sie können einfach über einen Bajonettverschluss geöffnet und geschlossen werden und machen damit die Montage der Schwingquarze sehr einfach. Die Messkammern können vollkommen getrennt durch die Fließ- Injektions- Anlage befüllt werden. Des Weiteren besteht die Sensorplattform aus zwei Peristaltikpumpen einem Pulsationsdämpfer und zwei Ventilen.

Das Steuergerät besteht (Abb. 6) aus der Ansterelektronik, dem Anzeigeelement und dem Steuerungsschalter und wird über eine eigens entwickelte Software angesteuert (17).



Abb. 6: Steuergerät und Monitor der FidgeType FgT1



Abb. 7: Sensoreinheit der FidgeType FgT1

#### **1.5.1.1. Thermostatisierung**

Die Sensoreinheit ist vollständig thermostatisierbar. Es ist möglich sie zu beheizen als auch zu kühlen. Dies geschieht mit Hilfe der eingebauten Peltier-Elemente. Unter den Messkammern befindet sich ein Wasserbad, durch das die Teflonschläuche der Fließ- Injektions- Anlage gelegt sind, so dass die verwendete Flüssigkeit sich in der Temperatur nicht von jener der Messkammer unterscheidet. Da sich Temperaturveränderungen auf das piezoelektrische Material auswirken, kommt es dabei auch zu Frequenzveränderungen. Des Weiteren ist die Oszillatorschaltung temperaturabhängig und somit kommt es bei einem positiven Temperaturgradienten zu einer negativen Frequenzverschiebung und umgekehrt. Dies wird im Ergebnisteil noch gezeigt (17).

## 1.6. Ziel der Arbeit

Zur Bekämpfung der Malaria gibt es mehrere Ansätze, unter anderem die Verhinderung der Bindung von infizierten Erythrozyten an Endothelzellen um der Elimination durch die Milz zu entgehen (10). Des Weiteren werden Proteasehemmer getestet, die den Austritt der Merozoiten aus den Erythrozyten unterdrücken sollen (14). Unter vielen weiteren Möglichkeiten werden auch vor allem die Impfstoffe ausführlich erforscht.

Diese haben vorwiegend Merozoiten als Angriffspunkt, weil die Parasiten in diesem Stadium direkt im Blut exponiert und dadurch besonders angreifbar sind (2, 19). Doch da *Plasmodium falciparum* im Körper des Menschen einen asynchronen Zyklus beschreibt (7), ist es sehr schwierig alle Merozoiten mit dieser Methode zu erreichen.

An dieser Stelle setzt die vorliegende Arbeit an. Zum einen soll mit thermischen Triggern erprobt werden, ob eine Synchronisation der Parasiten und ein gleichzeitiger Merozoitenaustritt erzielt werden kann.

Dazu wurde die Sensorplattform FidgeType FgT1 (QCM) eingesetzt. Zunächst erfolgte eine Immobilisierung von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten auf einem mit Poly-L-Lysin beschichteten Goldquarz.

Da die QCM-Anlage vollständig thermostatisierbar ist, kann der beschichtete Quarz febrilen Temperaturen ausgesetzt werden, die in ihrer Höhe und Dauer komplett steuerbar sind. Mit Hilfe der Sensorplattform können die sich verändernden Masseverhältnisse sowohl bei Ankopplung der Erythrozyten als auch beim Austritt der Merozoiten aus diesen in Form der Frequenzänderung aufgezeichnet werden. Bei der Ankopplung wird ein Abfall der Frequenz erwartet, der Merozoitenaustritt wird durch einen Anstieg der Frequenz angezeigt(21). Die Steuerbarkeit des Austritts aller Merozoiten zu einem einheitlichen Zeitpunkt würde die Anwendung von Impfstoffen erheblich vereinfachen, da die Lebensdauer von freien Merozoiten im Plasma sehr

begrenz ist, genaue Daten liegen hier jedoch noch nicht vor(33), muss dieser Einsatz sehr gezielt erfolgen.

## 2. Material

### 2.1. Laborausstattung

Artikel	Hersteller
Auflichtmikroskop Axioskop 2 MAT	Carl Zeiss, Jena/D
Brutschrank HeraCell 150	Heraeus Instruments Hanau/D
Digitalkamera Casio QV 5700für Mikroskop Axioskop 2 MAT	Casio Europe GmbH, Hamburg/D
Feinwaage	
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 Multistand	Miltenyl Biotech GmbH Bergisch Gladbach/D
MACS Seperation Columns 25 LD Columns	Miltenyl Biotech GmbH Bergisch Gladbach/D
Magnetrührer Variomag	H+ P Labortechnik AG, Oberschleißheim/B
Mikroskop Leica DM1000	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar/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
QCM- Messanlage Fidgetype Fg 1	Herstellung und Konstruktion: Dr. rer. nat. F. K. Gehring, IKET Tübingen/D

Sterilbank HERA- Safe	Heraeus Instruments Hanau/D
Zentrifuge Multifuge 1S- R	Heraeus Instruments Haunau/D

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
AT- cut Quarze	KVG, Neckarbischofsheim/D
BD Falcon 15 ml Polystyrene Conical Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes/USA
Costar Disposable Serological Pipette	Corning Incorporated, New York/USA
Einmalspritze Injekt 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen/D
Falcon Blue Max 50 ml Conical Tube	Becon Dickson Labware, Franklin Lakes/USA
Filterpapiere	Macherey- Nagel GmbH & Co., Düren/D
Kunststoffolie aus Polypropylen selbstklebend Innendurchmesser 6 mm Außerdurchmesser 13 mm	Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. F. K. Gehring, IKET Tübingen/D
Millex GS Syringe Driven Filter Unit	Millipore, Carrigtwohill/IE
Objektträger	R. Langenbrink, Emmendingen/D
Präzisionswischtücher Kimtech Science	Kimberley- Clark, Surrey/UK
Quarzhalterung: Halterung aus Teflon Innendurchmesser 9 mm Außendurchmesser 16 mm	Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. F. K. Gehring, IKET Tübingen/D
Zellkulturflaschen CELLSTAR	Greiner bio- one GmbH,

Tissue Culture Flasks	Frickenhausen/D
-----------------------	-----------------

### 2.3. Chemikalien

Artikel	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Albumax II-Pulver	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Gentamicin (50mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe/D
Giemsa	Merck KGaA, Darmstadt/D
Glucose	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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm/D
L-Glutamin (200µM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe/D
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Natriumhypochlorit (NaOCl, 4 %)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim/D
Paraformaldehyd (PFA, 95%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Perform	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt/D
Poly-L-Lysin (PLL, 70-150kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D

RPMI 1640-Lösung (mit NaHCO <sub>3</sub> , ohne L-Glutamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
RPMI 1640-Lösung (ohne NaHCO <sub>3</sub> , mit L-Glutamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 98 %)	Merck KGaA, Darmstadt/D
Stickstoff (N <sub>2</sub> ) , 4.0	stationäre Laborversorgung
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 %)	Merck GmbH, Darmstadt/D

## 2.4. Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Albumax II (10x):	5,20g RPMI-Pulver 500µl Gentamicin 2,98g HEPES 1,67g NaHCO <sub>3</sub> 1,00g Glucose 0,10g Hypoxanthin 25g Albumax II-Pulver Die Chemikalien in 500ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 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.
Giensa-Färbelösung:	5ml Giensa mit 45ml 1 X Phosphatpuffer verdünnen und filtrieren.
Kulturmedium <i>P. falciparum</i> :	500ml RPMI 1640 (mit NaHCO <sub>3</sub> , ohne L-glutamine) 500µl Gentamicin 5ml L-Glutamin (eingefroren) 200mM 12ml HEPES-Buffer (1M)

	50ml Albumax II (gefroren 10x) Lagerung bei 4°C.
Phosphatpuffer für Giemsa (10x):	4,1g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 6,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ 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 $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnt wurde.
Piranha-Reinigungslösung:	5ml $\text{H}_2\text{O}_2$ vorlegen, 15ml $\text{H}_2\text{SO}_4$ zugeben.

## 2.5. Zellkulturen

Bezeichnung	Hersteller
D10	Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen/D
Erythrozytenkonzentrat 0+	Blutbank des Zentrums für klinische Transfusionsmedizin Tübingen/D

## 2.6. Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems GmbH, München/D
Origin SRO	Origin Lab Coporation, Northampton/USA

### **3. Methoden**

#### **3.1. Kultivierung von *Plasmodium falciparum***

Verwendet wurde der *Plasmodium falciparum*-Stamm D10. Diese Parasiten wurden in 20 ml Kulturflaschen mit Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ und RPMI komplett kultiviert. Dabei betrug der Hämatokrit 5%. Außerdem war eine ständige Inkubation bei 37°C, sowie eine Begasung mit 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub> zur Lebenserhaltung der Kultur nötig. Die Kultivierung erfolgte kontinuierlich und dabei sollte die Parasitämie etwa bei ein bis zwei Prozent gehalten werden, um ein ausreichendes Wachstum zu gewährleisten.

##### **3.1.1. Giemsa-Färbung zur Bestimmung der Parasitämie**

Um die Parasitämie zu bestimmen, wurden täglich dünne Ausstriche aus der Kultur angefertigt. Dazu wurde mit einer sterilen Pipette vom Boden der Kulturflasche eine kleine Menge der Zellsuspension entnommen und auf einen Objektträger getropft. Mit einem weiteren Objektträger wurde der Tropfen verstrichen und der erhaltene Ausstrich getrocknet, 30s in Methanol fixiert und anschließend wieder getrocknet. Schließlich wurde er 20 Minuten in 10%iger Giemsa- Lösung gefärbt und anschließend unter fließendem Wasser gründlich abgespült und wieder getrocknet. Lichtmikroskopisch erfolgte eine Auszählung bei 1000facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Die Parasitämie wird prozentual als Anteil befallener Erythrozyten zur Gesamtmenge der Erythrozyten angegeben. Es wurden mindestens 300 Erythrozyten ausgezählt (nach (20)). Bei einer Parasitämie über 2% wurde die Kultur verdünnt.

##### **3.1.2. Synchronisierung**

Die Synchronisierung der Kultur war in regelmäßigen Abständen nötig, um das oft asynchrone Wachstum der Parasiten wieder auszugleichen. Das Verfahren mit 5%iger Sorbitol- Lösung ist nur für Ringstadien geeignet. Die Kultur sollte also eine Parasitämie von 3 bis 5% aufweisen und hauptsächlich Ringstadien

enthalten. Zum Zweck der Synchronisierung wurde die gesamte Kultur der Kulturflasche entnommen und in ein 50ml Falcon Tube gefüllt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 1800rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml Sorbitol-Lösung suspendiert. Sorbitol führt bei allen älteren Entwicklungsstadien, außer dem Ringstadium zur Lyse des Erythrozyten und so zum Tod des Parasiten(34). Nach einer 10 minütigen Inkubation wurde erneut zentrifugiert und zweifach mit Medium gewaschen. Zuletzt wurde das Pellet mit 19 ml neuem Medium in eine neue Kulturflasche zurückgegeben und wieder bei 37°C inkubiert (20).

## **3.2. Versuchsvorbereitung**

### **3.2.1. Quarzreinigung**

Die Quarze wurden vor der Beschichtung zunächst eine Minute in Aceton getaucht, danach mit bidestilliertem Wasser ab gespült und unter dem Stickstoffstrom getrocknet. Um eine hydrophile Oberfläche zu erhalten wurde der Quarz danach eine Minuten in Piranha-Lösung getaucht, ebenfalls mit Aquabidest. ab gespült und mit Stickstoff getrocknet (17).

### **3.2.2. Quarzbeschichtung**

Der Quarz wurde vor der Beschichtung in ein individuell entwickeltes Halterungssystem eingebracht.

Zur Beschichtung wurden daraufhin 20µl Poly-L-Lysin-Lösung auf den Quarz gegeben und danach mit Stickstoff langsam kreisförmig getrocknet bis keine flüssigen Rückstände mehr verblieben. Danach erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten bei 37°C.

Zum Schluss wurde der Quarz kräftig mit bidestilliertem Wasser ab gespült und danach mit Stickstoffgas getrocknet (17).

### **3.2.3. Vorbereitung des Mediums**

Im Versuch diente das Medium als Spüllösung. Als Medium für den Versuch wurde im Gegensatz zur Parasitenkultivierung RPMI komplett ohne  $\text{NaHCO}_3$  benutzt, um die Blasenbildung zu minimieren. Des Weiteren musste es aus diesem Grund entgast werden. Zu diesem Zweck wurden etwa 80 ml des Mediums unter der Sterilbank aus der Vorratsflasche in einen Rundkolben umgefüllt. Dieser wurde an eine Vakuumpumpe angeschlossen und für ca. eine Stunde entgast.

Um das Medium nach diesem Prozess wieder in einen sterilen Zustand zu überführen wurde es unter der Sterilbank sterilfiltriert und in sterile Schnappdeckgläschen umgefüllt, da nur diese in die vorgesehenen Halterungen der Messanlage passten.

### **3.2.4. Vorbereitung der Messanlage**

Bevor mit der Anlage Messungen durchgeführt werden konnten, musste das Schlauchsystem gereinigt und desinfiziert werden. An die Messzellen wurden kurze Zulaufschläuche angeschlossen, die eine Probenaufnahme ohne Umwege direkt aus dem gewünschten Schnappdeckelgläschen erlaubten. Des Weiteren mussten Transportschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm an die Pumpen angeschlossen werden. In die Messzellen wurden unbeschichtete Quarze eingebaut, damit die Messzellen verschlossen und ebenfalls gespült werden konnten.

Zur Sterilisierung der Fluidik wurde das Schlauchsystem mit 1%iger Natriumhypochlorit-Lösung gespült und für 10 Minuten inkubiert. Nach einem Spülschritt mit 10 ml sterilem bidestilliertem Wasser wurde die Fluidik mit sterilem Medium befüllt. Vor diesem letzten Schritt wurde die Anlage auf 37°C thermostatisiert.

### 3.2.5. Vorbereitung der Proben

Für den Versuch wurde eine aufgereinigte Probe aus der *Plasmodium falciparum*-Kultur benötigt mit einer Parasitämie von mindestens 90% (21). Eingesetzt wurden späte Trophozoiten und Schizonten, die mit Hilfe des magnetic cell sorting (MACS) Systems aus der gesamten Kultur separiert wurden.

Dazu wurde der gesamte Inhalt der Kulturflasche bei 1800 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Parallel wurde die Magnetsäule, die in den MACS Multistand befestigt wurde, mit 3 ml auf 37°C vorgewärmtem Medium ohne Carbonat befüllt. Bei der zentrifugierten Kultur wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in die Magnetsäule pipettiert. Die Eigenschaft der Trophozoiten und Schizonten eisenhaltiges Hämozoin zu bilden führt dazu, dass diese Stadien in der Magnetsäule verbleiben während nicht infizierte Erythrozyten und infizierte Erythrozyten mit früheren Stadien herausgespült werden (28). Im Folgenden wurde die Säule solange mit Kulturmedium gespült, bis der Durchfluss wieder die Farbe des Mediums erreichte. Danach wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, auf ein 15 ml Tube aufgesetzt und nochmals gespült.

Der Inhalt des Tubes wurde wie bereits oben beschrieben erneut zentrifugiert. Das dabei erhaltene Pellet wurde nach Entfernung des Überstandes mit 300 - 450 µl Medium verdünnt und in ein 1 ml Eppendorf Tube überführt. Ein Drittel dieser Probe wurde nachfolgend in ein separates Eppendorf Tube gegeben und über den gesamten Zeitraum der Messung bei 37°C im Inkubator aufbewahrt, während die restliche Probe in eine vorgesehene Vertiefung der Messanlage gestellt und dort den verschiedenen Temperaturänderungen ausgesetzt wurde.

Als Kontrolle wurde Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+, 1:10 in Medium ohne Carbonat verdünnt, für die Messung eingesetzt. Alle Proben sowie das zur Messung verwendete Medium wurden mit 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub> begast.

### **3.3. Versuchsdurchführung**

#### **3.3.1. Ankopplungsmessung zur Testung der Schicht**

Die Ankopplung auf der Poly-L-Lysin- Schicht wurde mit 1:10 verdünntem Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ getestet. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt.

Es wurden lange Zuleitungsschläuche, sowie Pumpschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm verwendet. Die Verwendung der Probenschleife wurde auf Grund von Blasenbildung verworfen.

Die Messkammer wurde mit einem PLL-beschichteten Quarz bestückt und mittels des Bajonettverschlusses luftdicht verschlossen. Über die gesamte Messung wurde die Messzelle mit Medium bei einer Pumpgeschwindigkeit von 100 µl/min gespült.

War der Quarz eingeschwungen, wurde zunächst die Pumpe gestoppt um einen blasenfreien Wechsel vom Medium zur Probe zu gewährleisten. Dann wurde eine Probe von 20 µl aufgezogen, welche über den Quarz geleitet wurde. Sobald sich die Frequenz stabilisiert hatte wurde die Messung beendet.

#### **3.3.2. Langzeitmessung zur Testung der Schichtstabilität**

Für die Langzeitmessung wurde die Anlage vorbereitet wie in Kapitel 3.3.1. beschrieben. Es wurde ebenfalls eine Probe 1:10 verdünntes Erythrozytenkonzentrat der Blutgruppe 0+ verwendet.

Zu Beginn wurde wie bei der Kurzzeitmessung die mit einem PLL- Quarz bestückte Messkammer mit Medium bei einer Pumpgeschwindigkeit von 100µl/min gespült. Hatte sich die Frequenz stabilisiert, wurde nach einem kurzen Pumpenstopp eine Probe von 20µl aufgezogen und über den Quarz geleitet.

Nach der Ankopplung wurde abgewartet bis sich das Signal abermals stabilisierte. Danach wurde die Pumpleistung auf 4µl/min herabgesetzt, die

Frequenz für die nächsten 20 Stunden beobachtet und auf ihre Abweichung hin geprüft.

### **3.3.3. Testung der Auswirkung der Temperatur auf die Frequenz**

Die Anlage wurde erneut vorbereitet wie in Kapitel 3.3.1. beschrieben, wobei für diesen Versuch Quarze verwendet wurden, die nicht beschichtet waren. Diese wurden bei zunächst 37°C bei einer Pumpgeschwindigkeit von 100µl/min mit Medium gespült.

Nachdem sich die Frequenz stabilisiert hatte wurde die Temperatur der Anlage um 5,5°C erhöht, und dabei die Frequenzveränderung beobachtet. Als sich das Signal erneut stabilisiert hatte wurde die Temperatur wieder auf ihren Ausgangswert gesenkt und erneut die Frequenzänderung beobachtet.

### **3.3.4. Langzeitankopplungsmessung mit *Plasmodium falciparum* und Temperaturrampe**

Die Anlage wurde mit langen Zuleitungsschläuchen und Pumpschläuchen mit einem Innendurchmesser von 0,25mm bestückt. Die Anfangstemperatur wurde auf 37°C eingestellt, als Medium wurde steriles und entgastes RPMI komplett (ohne Carbonat) verwendet.

Die beiden Messkammern wurden je mit einem PLL- Quarz bestückt und luftdicht verschlossen. Zu Beginn wurden die Messkammern mit Medium bei einer Pumpgeschwindigkeit von 100µl/min gespült, wobei jede Messkammer an jeweils eine eigene Pumpe angeschlossen war.

Zur Messung wurden drei verschiedene Proben verwendet, von denen zwei mit *P. falciparum* infiziert waren. Eine Parasitenprobe wurde in einer vorgesehenen Vertiefung der Anlage gestellt, die andere wurde im Inkubator bei 37°C aufbewahrt.

Bei der dritten Probe handelte es sich um 1:10 verdünntes Erythrozytenkonzentrat, das ebenfalls in der Anlage aufbewahrt wurde.

Dieses Erythrozytenkonzentrat diente als Negativkontrolle, da hier keine Veränderungen der Frequenz zu erwarten waren, auch wenn sich die Temperatur verändert, so wie es bei infizierten Erythrozyten, die bei 37°C inkubiert wurden, erwartet wurde. Infizierte Erythrozyten konnten deshalb nicht in der Anlage als Negativkontrolle verwendet werden, da die Temperatur nicht für jede Messzelle einzeln regelbar ist, sondern die Messkammern nur gemeinsam mit der gleichen Temperatur beheizbar sind.

Um den Zustand der infizierten Erythrozyten zu beurteilen, wurde vor der Messung zunächst ein Ausstrich der Parasitenprobe angefertigt, der mit Giemsa gefärbt wurde.

Nach dem Einschwingvorgang wurden wie bereits oben beschrieben 20µl Erythrozytenkonzentrat über den einen Quarz und 50µl Parasitenprobe über den anderen Quarz geleitet.

Nach Stabilisierung der beiden Frequenzen wurde die Temperaturreampe eingeleitet. Die Temperatur wurde entweder auf 39°C oder 41°C erhöht. Die Anstiegszeit betrug dabei 30 Minuten. Danach wurde die Temperatur konstant für 60, 90, 120, 240, 360 bzw. 480 Minuten gehalten. Nach dieser Inkubation wurde die Temperatur innerhalb von 15, 30 bzw. 60 Minuten wieder auf 37°C herabgesetzt.

Während der Temperaturreampe wurden in regelmäßigen Abständen Ausstriche angefertigt. Dabei wurde je ein Ausstrich von der Parasitenprobe, die der Temperaturveränderung ausgesetzt war und sich in einem Eppendorfgefäß in einer extra vorgesehenen Halterung in der Sensoreinheit befindet und damit die Temperaturveränderungen ebenfalls erfährt, und von jener, die über den gesamten Zeitraum bei 37°C aufbewahrt wurde, angefertigt. Die 37°C Probe befindet sich ebenfalls in einem Eppendorfgefäß in einem auf 37°C eingestellten Inkubator. Diese wurden anschließend mit Giemsa gefärbt, unter dem Lichtmikroskop ausgewertet und verglichen.

Nach Beendigung der Temperaturreampe wurde die Pumpgeschwindigkeit auf 4µl/min gesenkt und die Frequenz über Nacht weiter aufgezeichnet.

Am nächsten Morgen wurde erneut ein Ausstrich von beiden Proben angefertigt und die Messung beendet. Der mit infizierten Erythrozyten beschichtete Quarz wurde aus der Messzelle entnommen und die Beschichtung wurde mit PFA für 10 Minuten fixiert. Der Quarz wurde danach kurz mit Aqua bidest. abgespült und unter dem Stickstoffstrom getrocknet. Im Folgenden konnte er ebenfalls unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden und diente somit dem Vergleich, ob sich die 39°C-Probe im Probengefäß von der, in der Messkammer unterscheidet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ankopplungsmessung zur Testung der PLL- Schicht

Wie in Kapitel 3.3.1. beschrieben, wurde die Ankopplung von Erythrozyten auf einem mit Poly- L- Lysin beschichteten Goldquarz getestet. Ziel war es dabei, eine gleichmäßige Belegung der Sensoroberfläche mit Erythrozyten zu erreichen. Der Frequenzabfall war dabei proportional zur Menge der angekoppelten Erythrozyten auf dem Quarz.

Stellvertretend steht diese Messung für die Ankopplung von Erythrozyten, die mit *Plasmodium falciparum* infiziert sind, da davon ausgegangen wird, dass eine ausreichende Menge von Parasiten auf dem Quarz immobilisiert sein muss um später bei einem eintretenden Merozoitenaustritt einem Effekt zu sehen, der sich in einer Frequenzänderung niederschlägt(21).

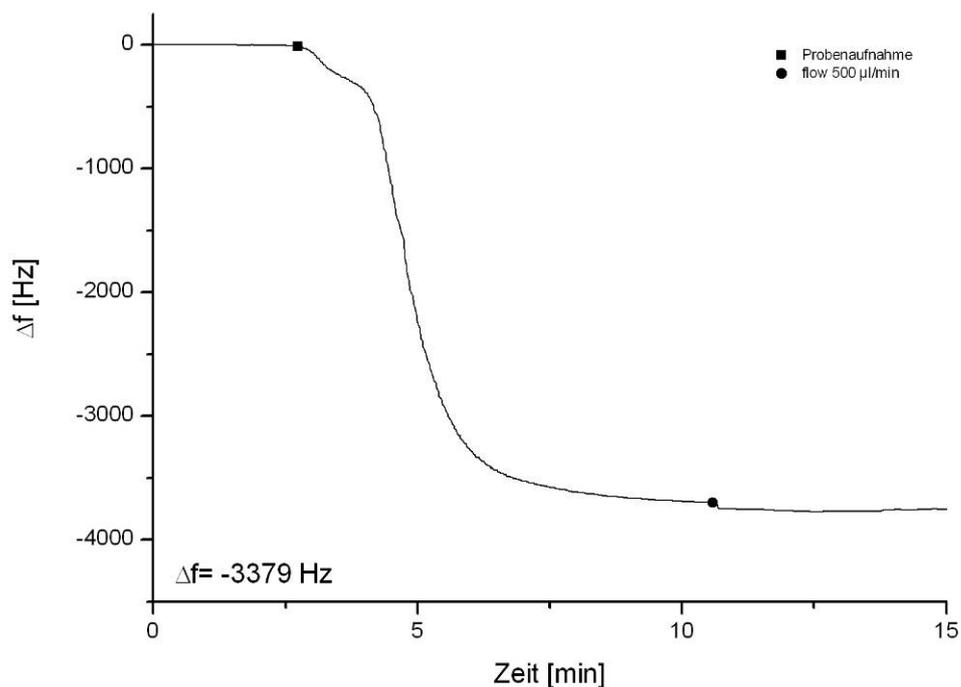
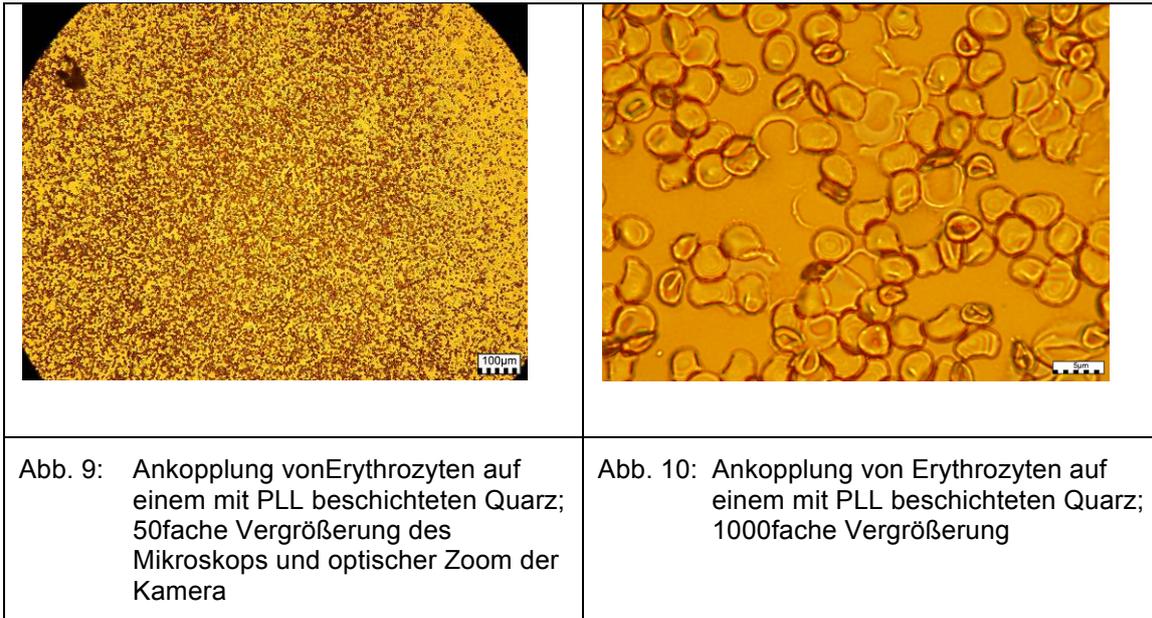


Abb. 8: Ankopplung von Erythrozyten auf einem mit PLL beschichtetem Quarz (eigene Messdaten)



Der Frequenzabfall betrug in dem in Abbildung 8 exemplarisch dargestellten Beispiel -3379 Hz, was auf eine starke Ankopplung und gleichmäßige Belegung des Quarzes hindeutet. Da sich das Signal im Anschluss wieder stabilisierte, kann eine stabile Bindung der Erythrozyten an das Poly- L- Lysin angenommen werden.

Die Belegung des Quarzes wurde im Nachhinein mikroskopisch kontrolliert, wie in Abbildung 6 und 7 zu sehen ist. Auch hier zeigte sich eine gleichmäßige und dichte Belegung mit Erythrozyten.

#### **4.2. Langzeitankopplungsmessung zur Testung der Schichtstabilität**

Auch hier wurden wieder Erythrozyten auf einem mit PLL beschichteten Quarz angekoppelt. Da jedoch keine Erfahrungen mit der Stabilität der Schicht über mehrere Stunden bei einer Temperatur von 37°C vorlagen, wurde dies ebenfalls getestet. Es wurde dabei geprüft ob sich im Laufe der Zeit Erythrozyten wieder vom Poly- L- Lysin lösen und ob am Ende des Experimentes noch eine Belegung des Quarzes mit Zellen vorliegt.

Dies war wichtig, um im späteren Experiment mit infizierten Erythrozyten den Zustand der Parasiten auf dem Quarz noch bestimmen zu können.

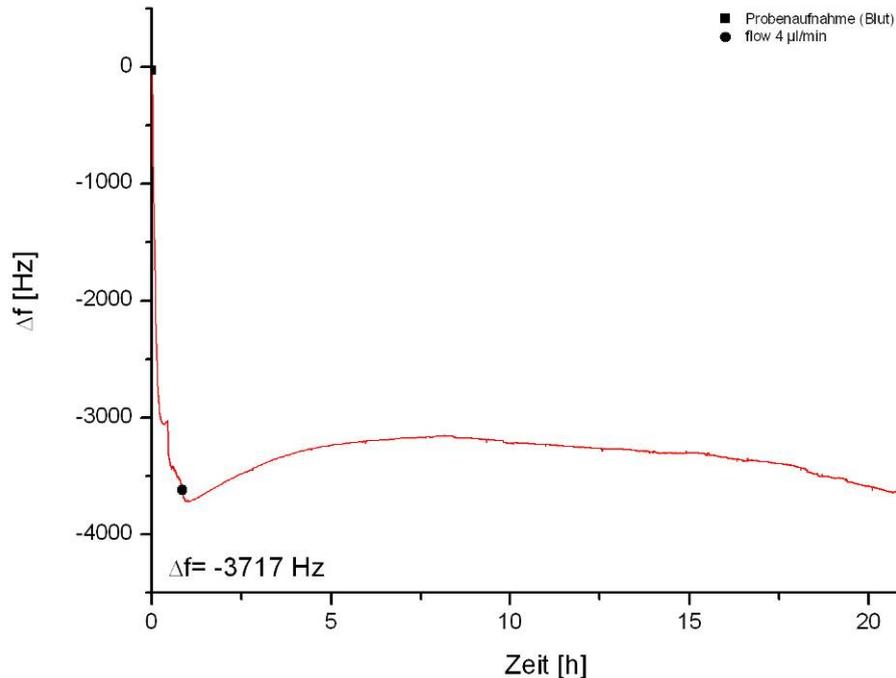


Abb. 11: Langzeitankopplung von Erythrozyten auf einem PLL-Quarz (eigene Messdaten)

Auch hier war wieder ein steiler Abfall der Frequenz bei Ankopplung zu erkennen, welcher mit -3717 Hz vergleichbar mit jenem der kürzeren Versuchsanordnung war. Danach folgte ein leichter Anstieg des Signals, der sich jedoch nach einiger Zeit wieder stabilisierte, dies könnte auf Veränderungen des Zytoskeletes der Erythrozyten durch die Bindung am PLL zurückzuführen sein(35). Dies zeigt, dass der überwiegende Teil der Erythrozyten auf dem Quarz verblieb.

### 4.3. Testung der Auswirkung von Temperaturveränderungen auf die Frequenz

Dieser Versuch wurde durchgeführt um festzustellen, ob sich die Frequenz in Zusammenhang mit Temperaturveränderungen in einem solchen Maße verändert, dass dies zu Effekten führt, die sich eventuell mit Frequenzänderungen auf Grund von Parasitenveränderungen überschneiden. Sie könnten also dazu führen, dass es zur Verstärkung, Abschwächung oder Vortäuschung, von zum Beispiel eines Merozoitenaustrittes, kommt.

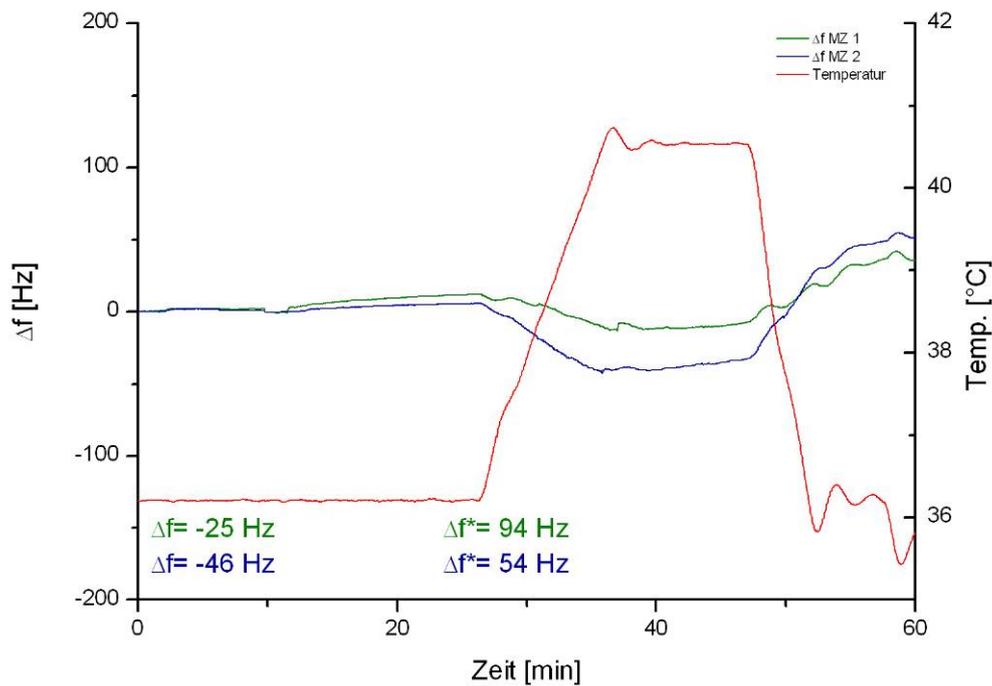


Abb. 12: Einfluss von Temperaturänderung auf die Frequenz (eigene Messdaten)

Zum Vergleich sieht man in Abbildung 12 die Frequenzänderung von beiden Messkammern der Fidget Type Fg T1 Anlage, bei einer Temperaturänderung von  $5,5^{\circ}\text{C}$ . Es zeigt sich, dass bei einem Temperaturanstieg die Frequenz leicht abfällt und im Gegenteil bei einem Temperaturabfall ansteigt. Dabei fällt und steigt die Frequenz um so steiler, je schneller die Temperatur steigt oder sinkt.

Da sich die Frequenzänderung bei Ankopplung zwischen  $-2000$  bis  $-3000$  Hz bewegt, ist dieser Effekt vernachlässigbar.

#### 4.4. Langzeitankopplungsmessung mit *Plasmodium falciparum* und Temperaturrampe

Mit den folgenden Versuchen sollte festgestellt werden, ob auf *Plasmodium falciparum* einwirkende gezielte Temperaturveränderungen den Merozoitenaustritt aus dem Erythrozyten herbeiführen können.

Zu diesem Zweck wurden mehrere Varianten von Temperaturrampen getestet. Das gewünschte Bild sollte einen Frequenzanstieg während oder nach der Durchführung der Temperaturrampe durch den Austritt von Merozoiten zeigen. Auf Grund die starke Synchronisierung der Kultur wurde erwartet, dass sich der Frequenzanstieg in einem ähnlichen Zeitrahmen wie die Ankopplung auf dem Quarz also im Minutenbereich abspielt.

Um die Entwicklung der Parasiten über die Messzeit hinweg zu dokumentieren, wurden die Kurvenverläufe mit dem Zustand der mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten während der Messung verglichen. Zu diesem Zweck wurden regelmäßig Ausstriche angefertigt. Um eine eventuelle und erhoffte Abweichung zum geregelten Lebenszyklus zu erkennen, wurden immer zum gleichen Zeitpunkt Ausstriche der Negativkontrolle (infizierte Erythrozyten bei 37°C) angefertigt. Diese Ausstriche wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet und bei 1000facher Vergrößerung mit digitalem Zoom photographiert. Das erhoffte Bild sollte nur Merozoiten und keine Schizonten mehr auf dem Ausstrich zeigen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen alle einen Temperaturanstieg auf eine Höchsttemperatur von 39°C. Zu Beginn wurden auch Experimente mit einem Temperaturanstieg auf 40 und 41°C durchgeführt. Dies führte allerdings stets zum Absterben der Plasmodien und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

#### 4.4.1. Rampe 1

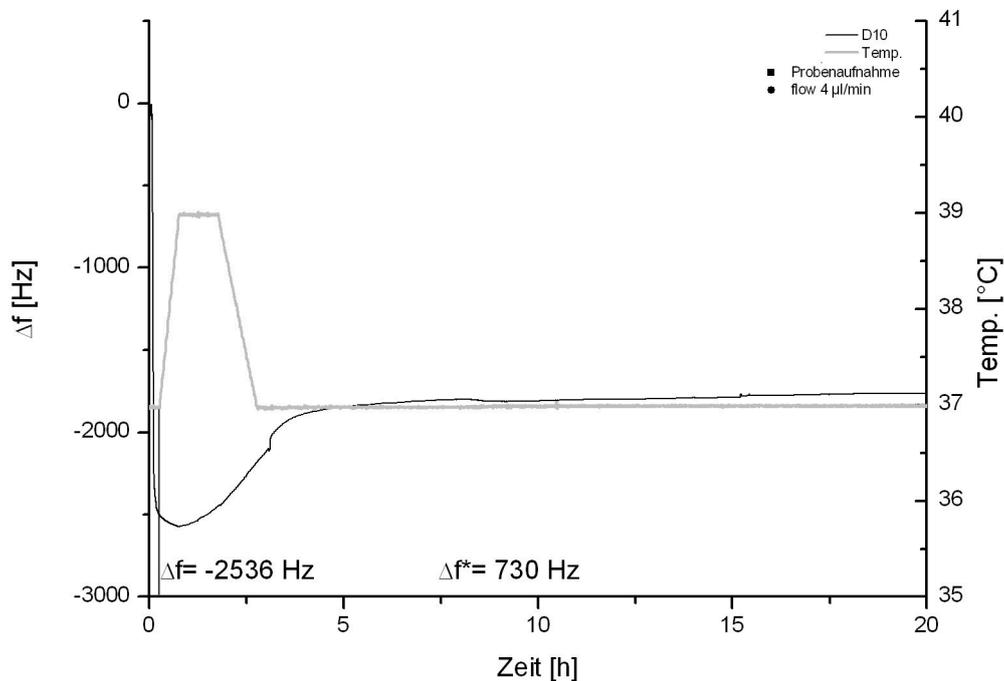


Abb. 13: Einfluss der Temperaturänderung auf die Frequenz eines mit PLL beschichteten und *Plasmodium falciparum* angekoppelten Goldquarzes, die senkrechte Linie zeigt den Startpunkt der Rampe, projiziert auf die Frequenzänderung zur Verdeutlichung der Basislinie (eigene Messdaten)

In Abb. 13 spiegelt der graue Graph die Temperaturveränderung der ersten Versuchsanordnung wider, die Ausgangstemperatur betrug 37°C. Innerhalb von 30 Minuten wurde die Temperatur auf 39°C erhöht und dann für 60 Minuten gehalten. Danach wurde sie wieder innerhalb von 30 Minuten auf 37°C abgesenkt und die Frequenzänderung für weitere 17 Stunden aufgezeichnet.

Der schwarze Graph zeigt die Frequenzänderung eines mit PLL beschichteten und mit infizierten Erythrozyten (Parasitenstamm: D10) belegten Goldquarzes. Nach Ankopplung der infizierten Erythrozyten sank die Frequenz um -2538 Hz, was für eine starke Belegung des Quarzes spricht.

Es ist bei allen allen Graphen der Rampen 1 bis 6 darauf zu achten, dass die Basislinie, also die Stabilisationslinie nach Ankopplung, durch die gedrängte Darstellung von 20 Stunden auf einer Zeitachse von 9,5cm nicht deutlich zu

erkennen ist. Es wurde aber nach Ankopplung immer ein stabiles Signal abgewartet bevor die Temperaturrampe begonnen wurde. Um den Zeitpunkt der stabilen Frequenz nach Ankopplung zu verdeutlichen wurde in alle Graphen eine Senkrechte eingefügt, deren Schnittpunkt mit der Kurve der Frequenzänderung den Beginn der Basislinie darstellt.

Nach Beginn der Temperaturrampe stieg die Frequenz wieder an, die Änderung betrug hierbei 730 Hz und dauert 315 Min, was mit einem Merozoitenaustritt verbunden sein könnte.

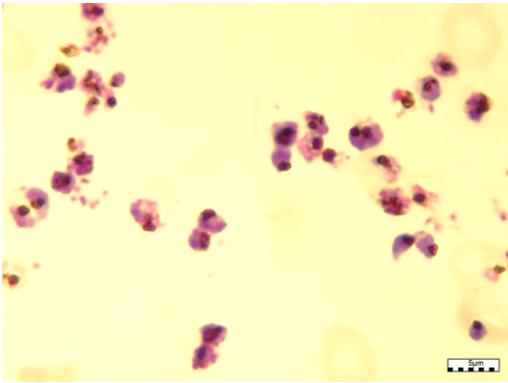


Abb. 14: Ausstrich vor Beginn der Temperaturrampe

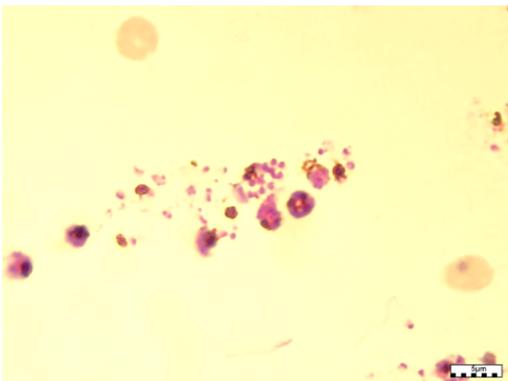


Abb. 15: Ausstrich nach Beendigung der Temperaturrampe

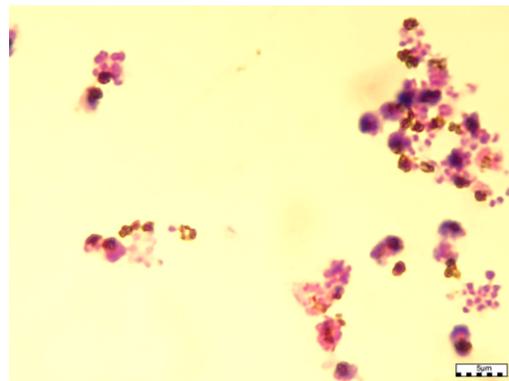


Abb. 16: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) nach Beendigung der Temperaturrampe

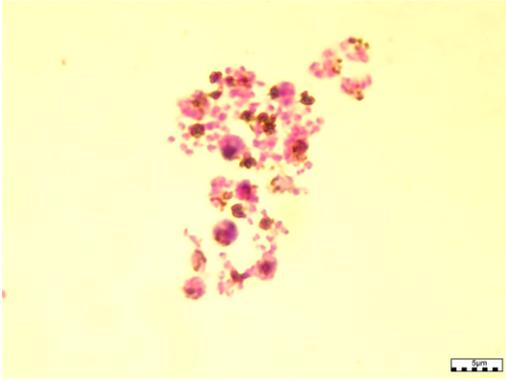


Abb. 17: Ausstrich am Ende des Experiments

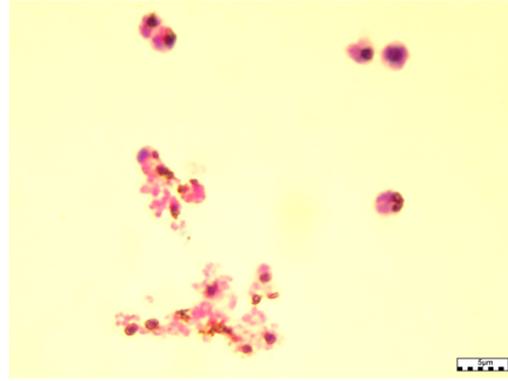


Abb. 18: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) Am Ende des Experiments

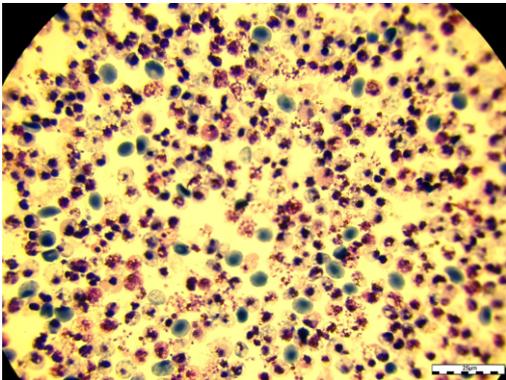


Abb. 19: Quarzbelegung am Ende des Experiments

Bei den Ausstrichen zeigte sich, dass sich die Parasiten vor dem Experiment im Schizontenstadium befanden. Nach der Temperaturrampe waren im Ausstrich der Probe, die der Temperaturrampe ausgesetzt waren, sowohl Schizontenstadien als auch freie Merozoiten zu erkennen.

Am Ende des Experimentes waren hauptsächlich freie Merozoiten erkennbar mit vereinzelt Schizonten. Das Erscheinungsbild unterschied sich zu beiden Zeitpunkten kaum von der Kontrollkultur, die nicht den 39°C ausgesetzt war, sondern konstant bei 37°C gehalten wurde, und somit eine regelrechte Entwicklung durchlief. Auf dem gleichmäßig aber nicht sehr dicht belegten Quarz zeigten sich ebenfalls freie Merozoiten und Schizonten.

#### 4.4.2. Rampe 2

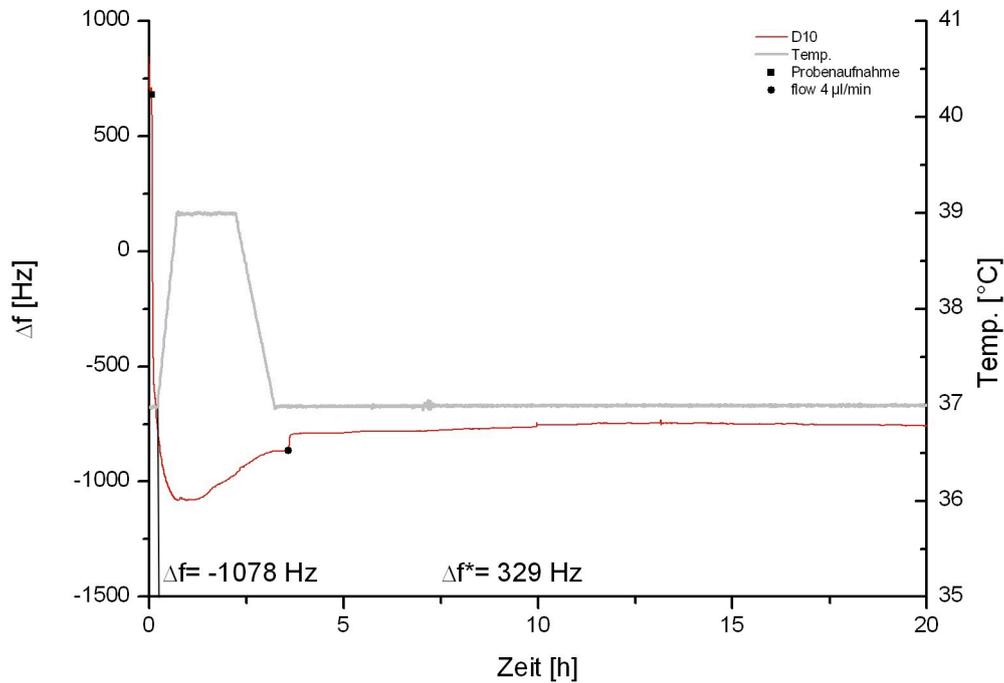


Abb. 20: Einfluss der Temperaturänderung auf die Frequenz eines mit PLL beschichteten und *Plasmodium falciparum* angekoppelten Goldquarzes, die senkrechte Linie zeigt den Startpunkt der Rampe, projiziert auf die Frequenzänderung zur Verdeutlichung der Basislinie (eigene Messdaten)

In Abb. 20, welche einen zweiten Versuchsablauf darstellt, zeigt die graue Kurve erneut die Temperaturveränderung auf. Ausgangspunkt waren wieder 37°C. Innerhalb von 30 Minuten wurde die Anlage auf 39°C aufgeheizt. Diese Temperatur wurde für 90 Minuten gehalten und wurde danach innerhalb von 60 Minuten wieder auf 37°C gesenkt.

Die rote Kurve stellt die Frequenzänderung des beschichteten Quarzes dar. Auch hier fällt die Frequenz bei Ankopplung ab, und steigt im Laufe der Messung wieder um 329 Hz in 132 Minuten an.

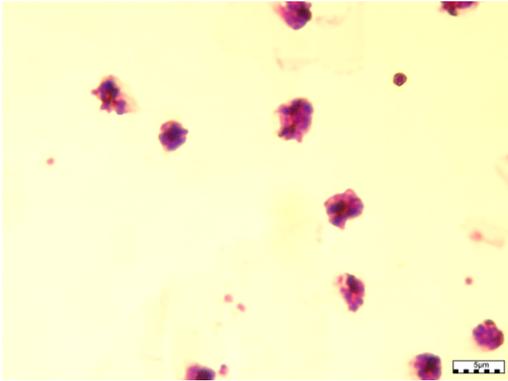


Abb. 21: Ausstrich vor Beginn der Temperaturrampe

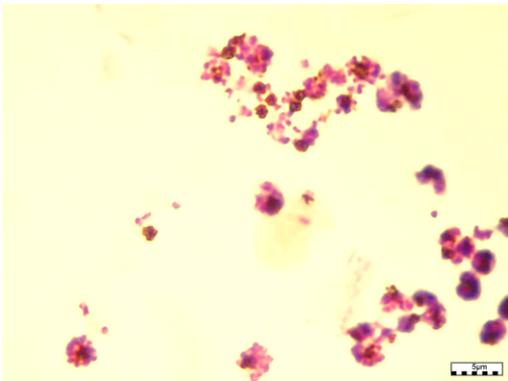


Abb. 22: Ausstrich nach Beendigung der Temperaturrampe

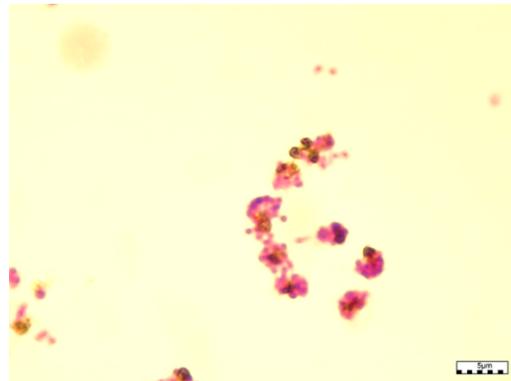


Abb. 23: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) nach Beendigung der Temperaturrampe

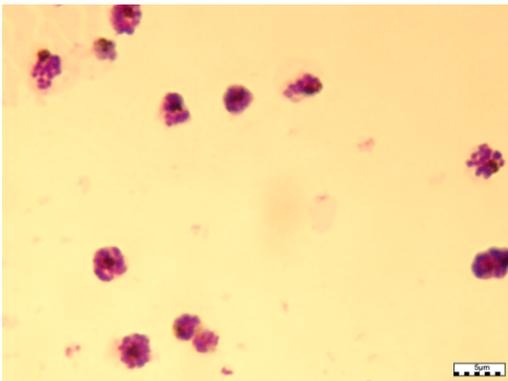


Abb. 24: Ausstrich am Ende des Experiments

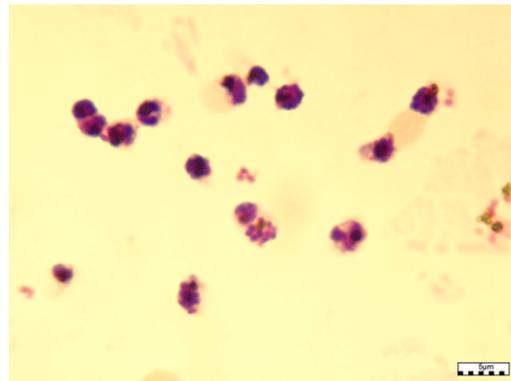


Abb. 25: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) am Ende des Experiments

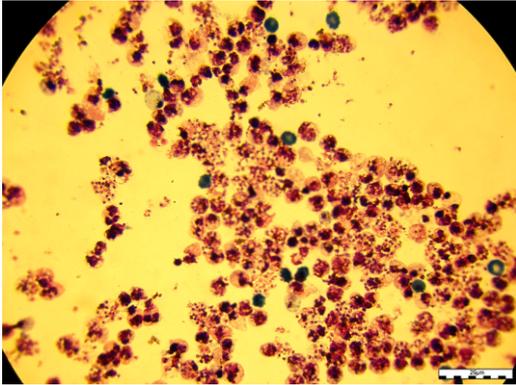


Abb. 26: Quarzbelegung am Ende des Experiments

Auch in diesem Fall befanden sich die Parasiten vor Beginn der Temperaturrampe im Schizontenstadium. Nach 20 Stunden waren sowohl bei der 39°C-Probe als auch bei der 37°C-Probe Schizonten und Merozoiten zu erkennen. Ebenso auf dem Quarz, bei allerdings ungleichmäßiger Belegung.

### 4.4.3. Rampe 3

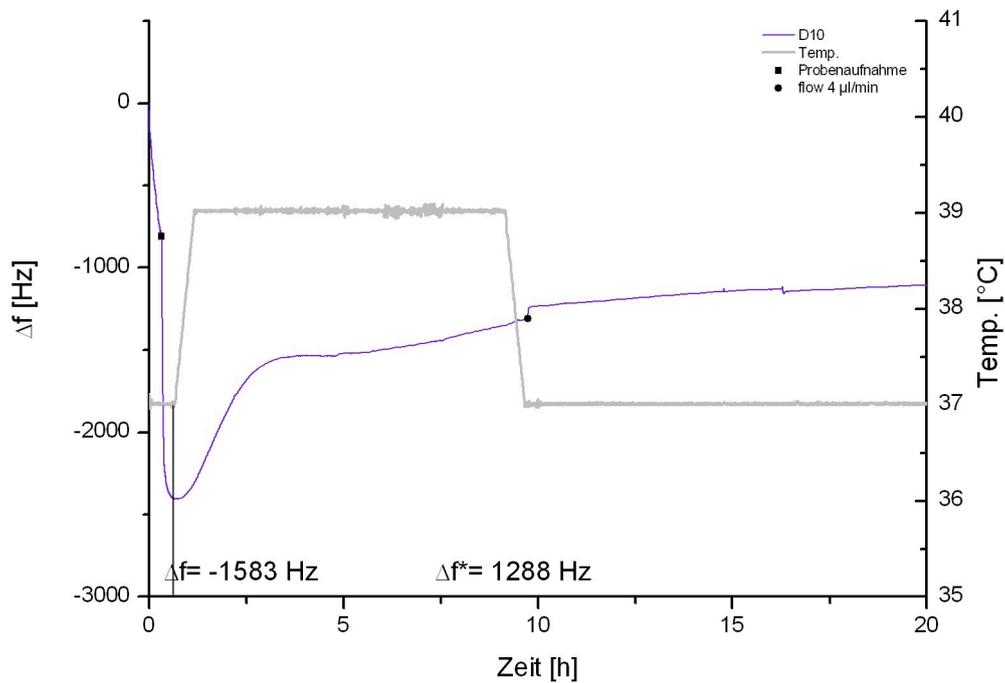


Abb. 27: Einfluss der Temperaturänderung auf die Frequenz eines mit PLL beschichteten und *Plasmodium falciparum* angekoppelten Goldquarzes, die senkrechte Linie zeigt den Startpunkt der Rampe, projiziert auf die Frequenzänderung zur Verdeutlichung der Basislinie (eigene Messdaten)

Wie auch bei den vorherigen Versuchen stellt auch in Abb. 27 die Graue Kurve wieder die Temperaturveränderung dar. Hierbei wurde die Temperatur innerhalb von 30 Minuten von 37°C auf 39°C erhöht und dann für 120 Minuten gehalten. Eine Absenkung der Temperatur auf erneut 37°C erfolgte innerhalb von 15 Minuten.

Bei diesem Experiment wurde bei Ankopplung der Parasiten auf dem Quarz ein Frequenzabfall von -1113 Hz verzeichnet. Der Anstieg der Frequenz betrug 710 Hz und dauerte 136 Minuten.

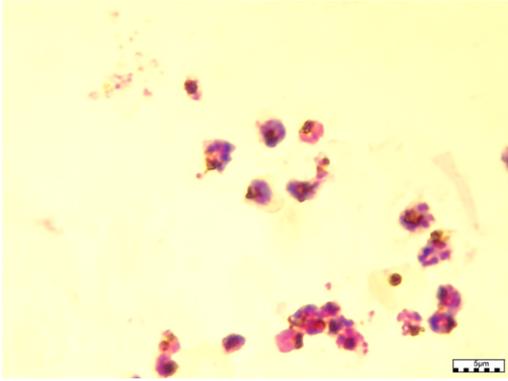


Abb. 28: Ausstrich vor Beginn der Temperaturrampe

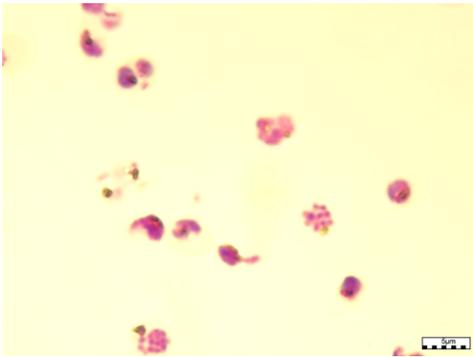


Abb. 29: Ausstrich nach Beendigung der Temperaturrampe

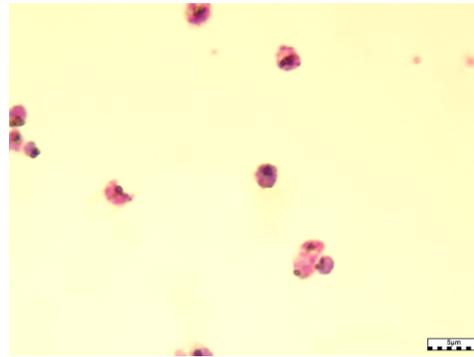


Abb. 30: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) nach Beendigung der Temperaturrampe

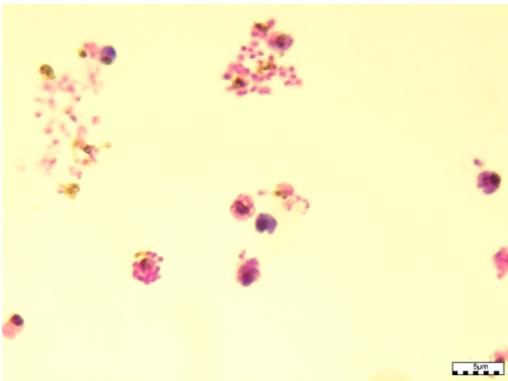


Abb. 31: Ausstrich am Ende des Experiments

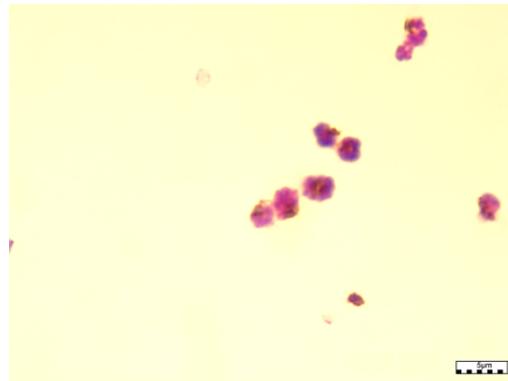


Abb. 32: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) am Ende des Experiments

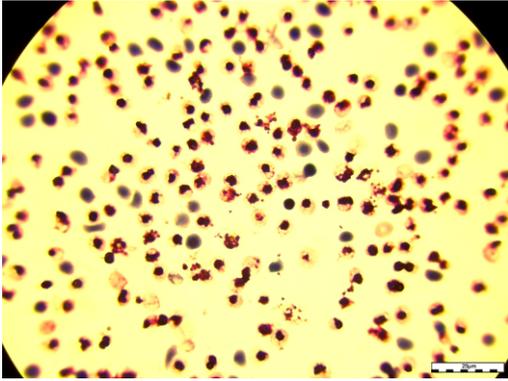


Abb. 33: Quarzbelegung am Ende des Experiments

Vor Beginn des Experiments befanden sich die Parasiten im Schizontenstadium. Nach dem Experiment wurden vor allem Schizonten und vereinzelt Merozoiten nachgewiesen. In der Kontrollkultur, die konstant bei 37°C gehalten wurde, lagen hingegen ausschließlich Schizonten vor. Auf dem Quarz waren ebenfalls Schizonten und Merozoiten nachweisbar. Die Belegung war gleichmäßig aber nicht sehr dicht.

## 4.4.4. Rampe 4

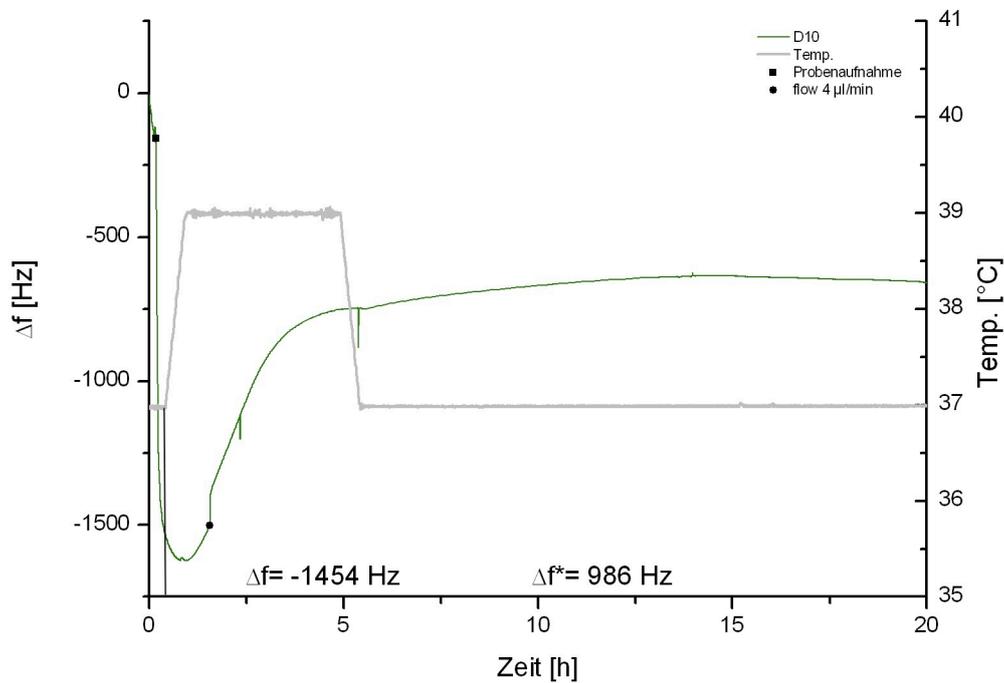


Abb. 34: Einfluss der Temperaturänderung auf die Frequenz eines mit PLL beschichteten und *Plasmodium falciparum* angekoppelten Goldquarzes, die senkrechte Linie zeigt den Startpunkt der Rampe, projiziert auf die Frequenzänderung zur Verdeutlichung der Basislinie (eigene Messdaten)

Bei dieser vierten Variante der Temperaturrampe wurde die Temperatur wieder in 30 Minuten von 37°C auf 39°C gesteigert und dann 240 Minuten konstant gehalten. Danach erfolgte wieder eine Absenkung in 30 Minuten auf 37°C (grauer Graph).

Der grüne Graph in Abbildung 34 stellt die Frequenzänderung des beschichteten Quarzes dar. Bei Ankopplung der Zellen sank die Frequenz um -1454 Hz und stieg nach Beginn der Temperaturrampe wieder um 986 Hz in 275 Minuten an.

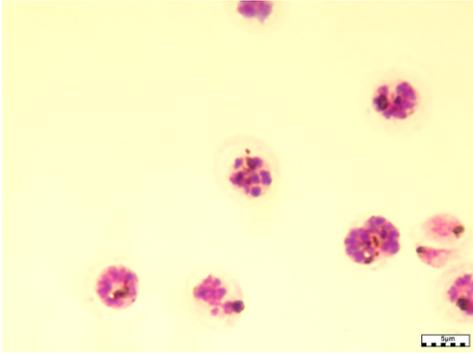


Abb. 35: Ausstrich vor Beginn der Temperaturrampe

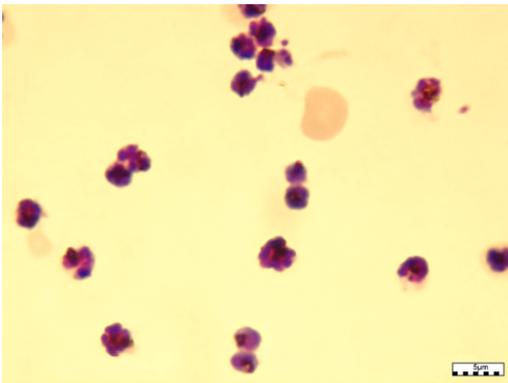


Abb. 36: Ausstrich nach Beendigung der Temperaturrampe

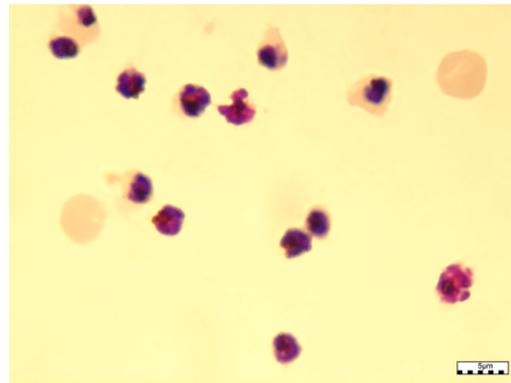


Abb. 37: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) nach Beendigung der Temperaturrampe

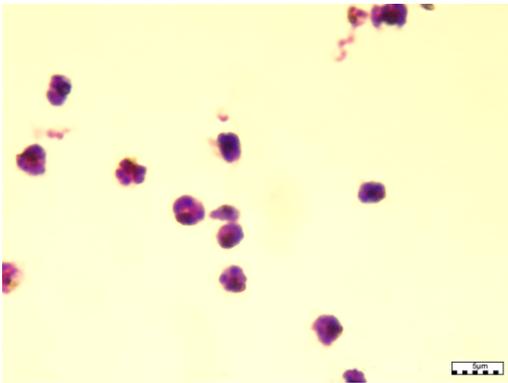


Abb. 38: Ausstrich am Ende des Experiments

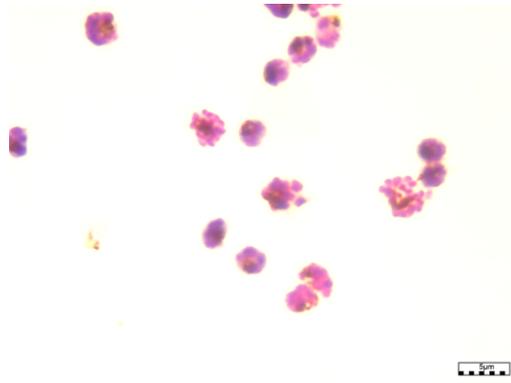


Abb. 39: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) am Ende des Experiments

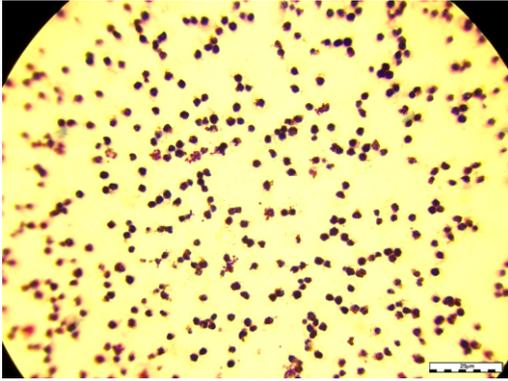


Abb. 40: Quarzbelegung am Ende des Experiments

An den Ausstrichen ist zu erkennen, dass vor dem Experiment nur Schizonten in der Probe vorhanden waren. Am Ende des Experiments waren ebenfalls nur Schizonten zu erkennen. Auch konnte kein Unterschied zur Kontrollkultur (37°C) festgestellt werden. Der Quarz war auch hier gleichmäßig aber nicht sehr dicht mit Zellen belegt.

## 4.4.5. Rampe 5

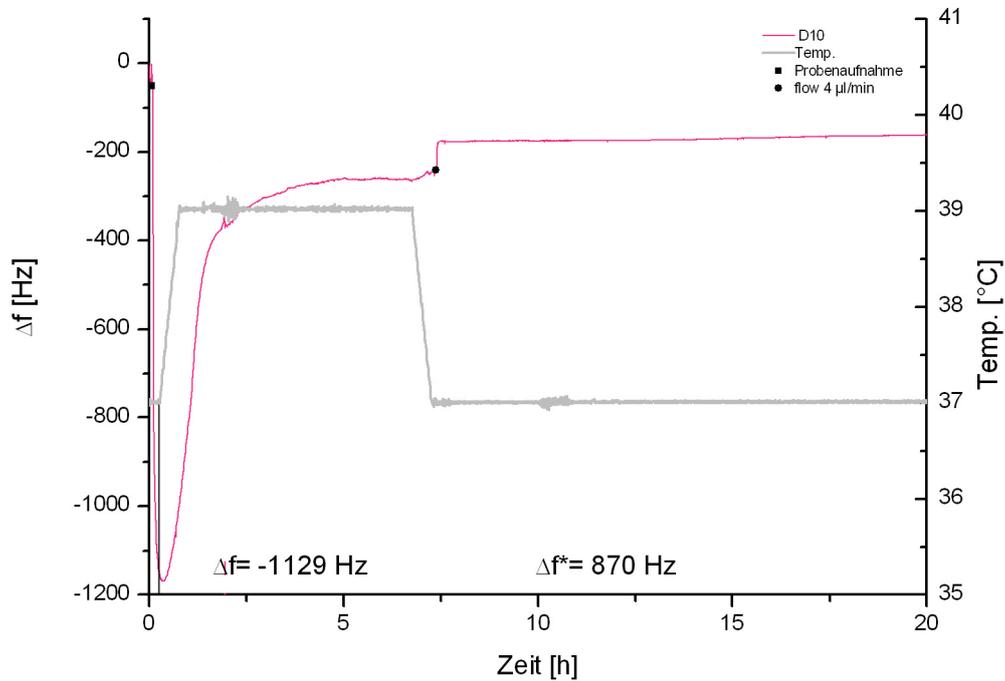


Abb. 41: Einfluss der Temperaturänderung auf die Frequenz eines mit PLL beschichteten und *Plasmodium falciparum* angekoppelten Goldquarzes, die senkrechte Linie zeigt den Startpunkt der Rampe, projiziert auf die Frequenzänderung zur Verdeutlichung der Basislinie (eigene Messdaten)

Bei der in Abb. 41 dargestellten Variante des Temperaturverlaufs erfolgte der Anstieg von 37°C auf 39°C in 30 Minuten. Dann folgte ein Plateau von 360 Minuten und zuletzt der Abstieg auf 37°C in 30 Minuten.

Der rosa Graph zeigt die Frequenzänderung des beschichteten Quarzes. Bei der Ankopplung von Zellen fiel die Frequenz um -1129 Hz und stieg nach Beginn der Temperaturrampe wieder um 870 Hz in 192 Minuten an.

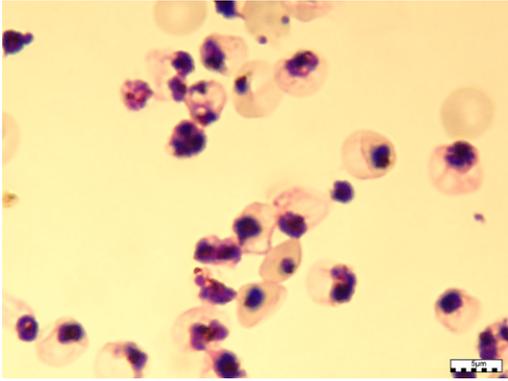


Abb. 42: Ausstrich vor Beginn der Temperaturrampe

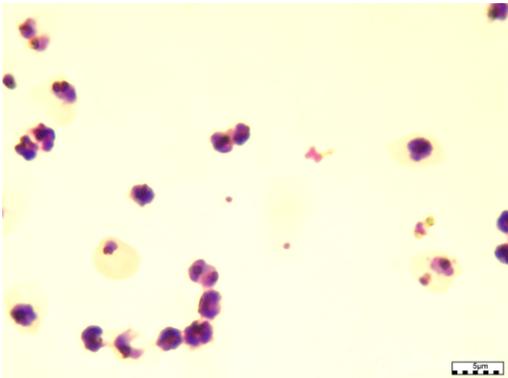


Abb. 43: Ausstrich nach Beendigung der Temperaturrampe

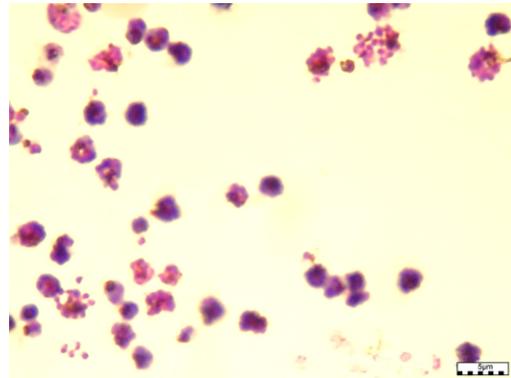


Abb. 44: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) nach Beendigung der Temperaturrampe

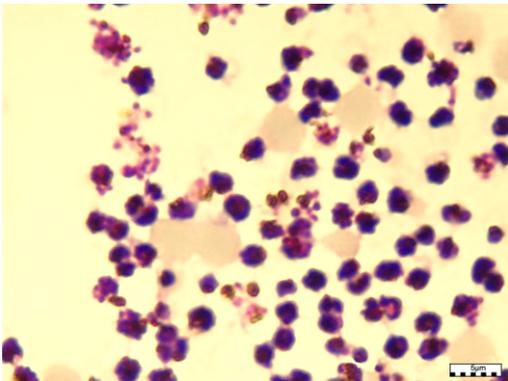


Abb. 45. Ausstrich am Ende des Experiments

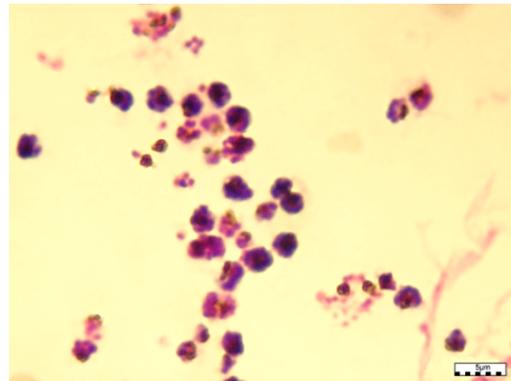


Abb. 46: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) am Ende des Experiments

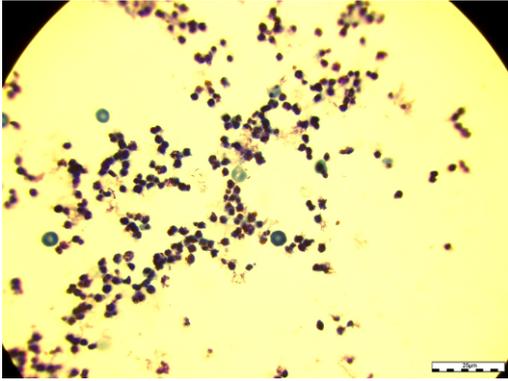


Abb. 47: Quarzbelegung am Ende des Experiments

Die Ausstriche zeigten, dass sich die Parasiten vor Beginn des Experiments im Schizontenstadium befanden. Nach Beendigung der Messung waren immer noch hauptsächlich Schizonten zu erkennen, es zeigten sich nur vereinzelt Merozoiten. Das gleiche Bild zeigte sich auf dem Quarz, dessen Belegung unregelmäßig und nicht sehr dicht war.

## 4.4.6. Rampe 6

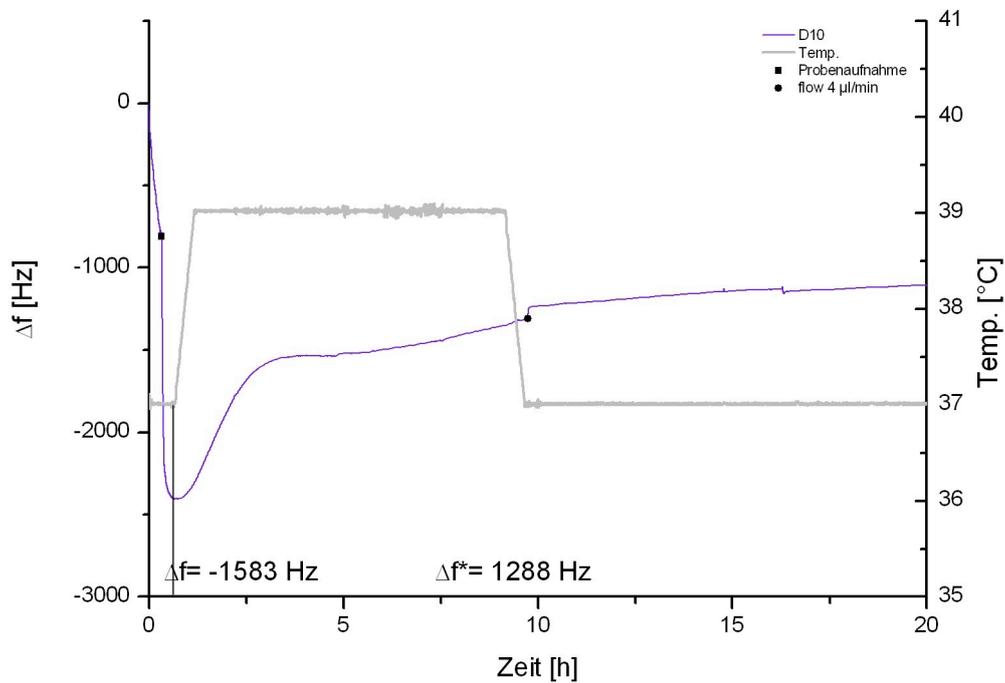


Abb. 48: Einfluss der Temperaturänderung auf die Frequenz eines mit PLL beschichteten und *Plasmodium falciparum* angekoppelten Goldquarzes, die senkrechte Linie zeigt den Startpunkt der Rampe, projiziert auf die Frequenzänderung zur Verdeutlichung der Basislinie (eigene Messdaten)

Die Temperaturrampe in diesem letzten Beispiel wies zunächst ebenfalls einen Anstieg von 37°C auf 39°C innerhalb von 30 Minuten auf. Dann folgte ein Plateau von 480 Minuten und dann der Abstieg auf 37°C in 30 Minuten (grauer Graph).

Die Frequenzkurve zeigt die Schwingungsänderung des beschichteten Quarzes. Die Frequenz fiel bei Ankopplung der Zellen um -1583 Hz und stieg nach Beginn der Temperaturrampe wieder um 1288 Hz in 480 Minuten.

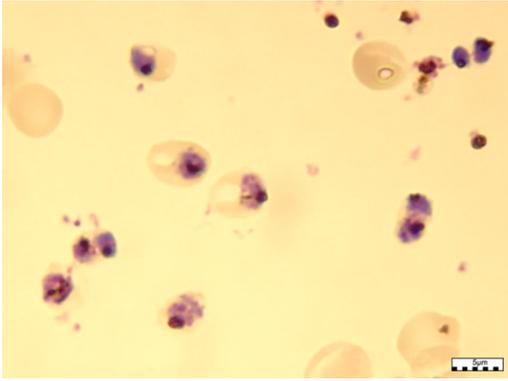


Abb. 49: Ausstrich vor Beginn der Temperaturrampe

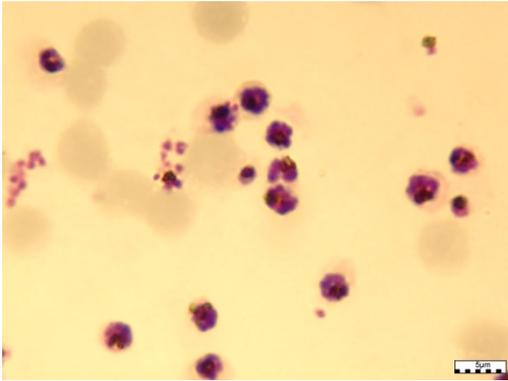


Abb. 50: Ausstrich nach Beendigung der Temperaturrampe

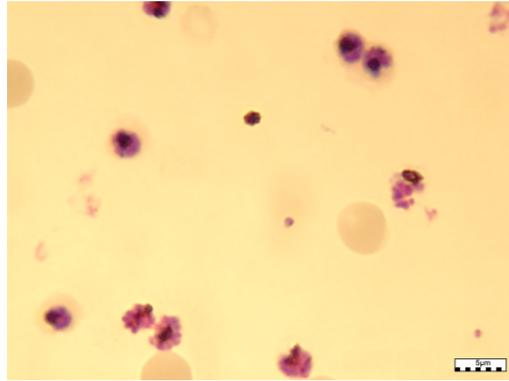


Abb. 51: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) nach Beendigung der Temperaturrampe

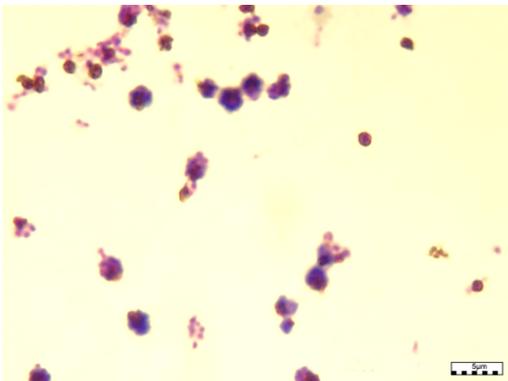


Abb. 52: Ausstrich nach Beendigung des Experiments

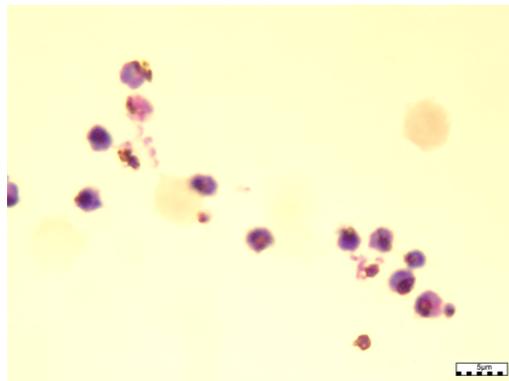


Abb. 53: Ausstrich der Kontrollkultur (37°C) Nach Beendigung des Experiments

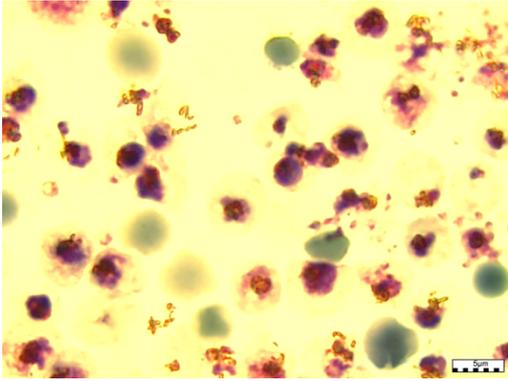


Abb. 54: Quarzbelegung nach Ende des Experiments

Die Ausstriche zeigten, dass die Parasiten vor Beginn des Experiments im Schizontenstadium vorlagen. Nach Beendigung waren immer noch hauptsächlich Schizonten und nur vereinzelt Merozoiten vorhanden. Das gleiche Bild zeigte sich in der Negativkontrolle und auf dem Quarz. Die Quarzbelegung war gleichmäßig, aber nicht sehr dicht.

#### **4.4.7. Frequenzschwankungen bei Probenaufnahme**

Bei der Probenaufnahme zu Beginn der Messung, bei der die Probe infizierter Parasiten über den Quarz geleitet werden soll, kam es zu Frequenzschwankungen, die hier kurz erläutert werden sollen.

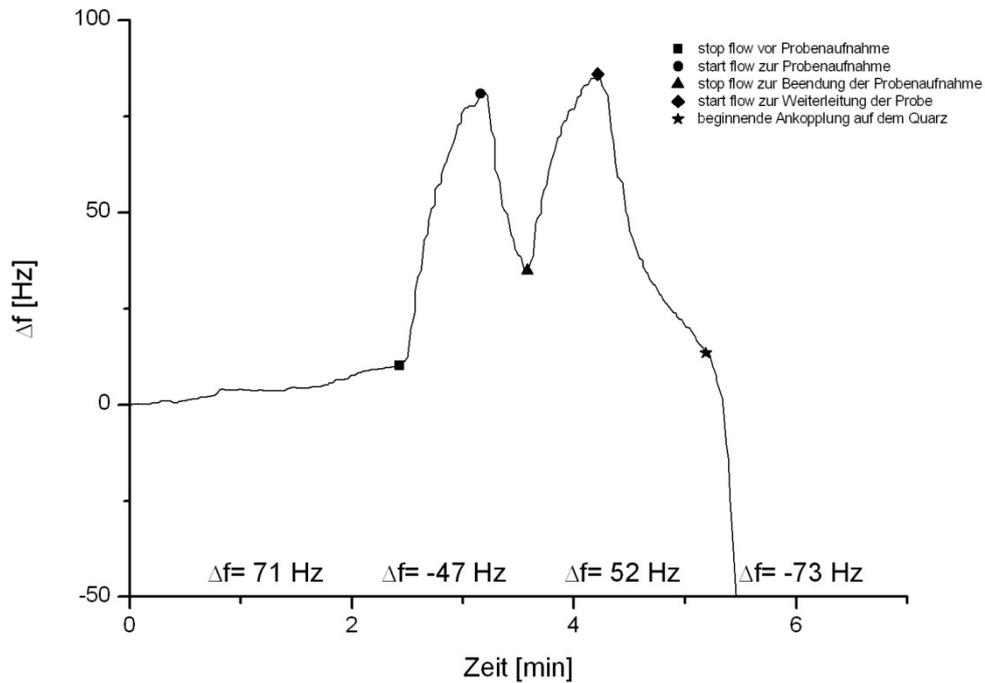


Abb. 55: Frequenzschwankungen bei Probenaufnahme (eigene Messdaten)

Nachdem sich der mit Poly-L-Lysin beschichtete Quarz in der Messkammer eingeschwungen hatte und es zu einer stabilen Frequenz kam, wurde die Peristaltikpumpe abgestellt. Durch den stoppenden Mediumfluss über den Quarz kam es aufgrund der daraus resultierenden Druckminderung zu einem Frequenzanstieg. Nun wurden 50  $\mu$ l Probe aufgezogen, indem die Pumpe wieder gestartet wurde. Durch den erneut einsetzenden Fluss kam es durch die nun wieder erhöhten Druckverhältnisse zur Frequenzabnahme. Nachdem das gewünschte Volumen aufgezogen war wurde die Pumpe erneut gestoppt, was wiederum in einem Frequenzanstieg resultierte. Nun wurde erneut Medium über den Quarz geleitet und die Pumpe wieder angestellt. Sobald die Probe über das Schlauchsystem den Quarz erreichte, kam es zur Ankopplung und ein rapider Frequenzabfall wurde initiiert.

#### 4.4.8. Zusammenfassung

Zusammenfassend sollen alle Ergebnisse der Langzeitmessung mit Parasiten und stellvertretend für eine Messung mit Parasiten bei 37°C eine Langzeitmessung mit nicht infizierten Erythrozyten verglichen werden.

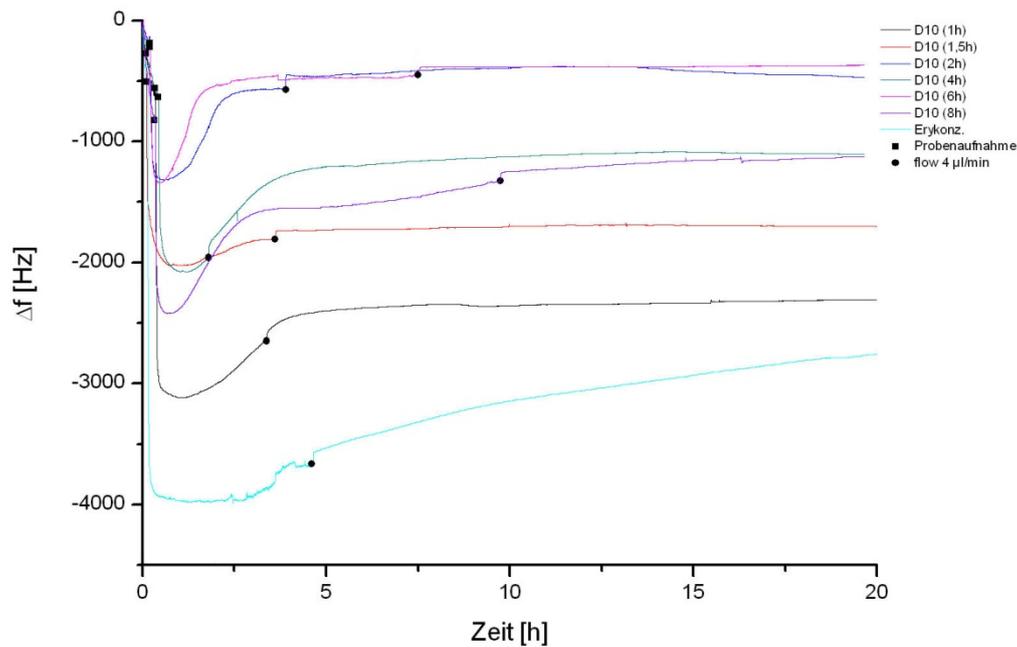


Abb. 56: Zusammenfassung Rampe 1 bis 6 und Negativkontrolle des Erythrozytenkonzentrats

Die D10-Frequenzkurven stellen die Langzeitmessungen mit Parasiten dar. Sie unterscheiden sich in ihrem Verlauf nur unwesentlich. Bei allen Messungen fand bei der Parasitenankopplung auf der Sensoroberfläche ein Frequenzabfall statt. Der Durchschnittswert betrug hierbei -1482 Hz. Dabei bewegte sich der Abfall in einem Rahmen von -1078 Hz bis -2536 Hz. Bei allen Graphen war ebenfalls ein Frequenzanstieg zu erkennen, der nach Beginn der Temperaturrampe begann. Durchschnittlich stieg die Frequenz um 818 Hz an. Dabei betrug der kleinste Anstieg 329 Hz und der größte 1288 Hz. Danach stabilisierte sich die Frequenz wieder und blieb bis zum Ende der Messung konstant. Entgegengesetzt der erwarteten Zeit der Anstiege betrug diese im Durchschnitt 4,25 Stunden, also weitaus mehr als erwartet.

Da im Verlauf aller Versuche Ausstriche angefertigt wurden, die lichtmikroskopisch ausgewertet wurden, ist zu erkennen, dass alle Experimente mit *Plasmodium falciparum* in Schizontenstadium begonnen wurden. Im Verlauf konnten auch bei den Parasitenstadien keine großen Unterschiede festgestellt werden. Nach Abschluss der Messungen zeigte sich immer ein gemischtes Bild aus Schizonten und Merozoiten. Im Vergleich zur Negativkontrolle, die die gesamte Versuchszeit bei 37°C gehalten wurde und keinen Temperaturunterschieden ausgesetzt wurde, ergab sich ebenfalls vom Erscheinungsbild kein Unterschied. Auch hier zeigte sich ein gemischtes Bild aus Schizonten und Merozoiten,

Die türkise Erykonz.-Frequenzkurve zeigt eine Langzeitmessung von einem mit nicht infizierten Erythrozyten beschichteten Quarz parallel zu einer Messung mit Temperaturrampe. Im Unterschied zu der gezeigten Erythrozytenlangzeitmessung auf Seite 31, die die ganze Zeit bei 37°C gehalten wurde. Sie soll stellvertretend für eine Messung mit infizierten Erythrozyten bei 37°C stehen. Da die Messkammern des FidgeType FgT1 nicht getrennt beheizt werden können, konnte keine parallele Messung von infizierten und nicht infizierten Erythrozyten bei verschiedenen Temperaturen unternommen werden.

Bei Ankopplung zeigte sich erwartungsgemäß ein Frequenzabfall. Auch bei dieser Kontrolle steigt die Frequenz im Laufe der Stunden an, jedoch mit einer deutlich anderen Kinetik. Vor allem fehlt der schnelle Wiederanstieg innerhalb der ersten 3 bis 4 Stunden. Den späteren langsamen kontinuierlichen Frequenzanstieg können wir nicht eindeutig erklären. Möglicherweise kommt es bei der sehr dichten, unter Umständen auch mehrschichtiger Belegung des Quarzes mit Erythrozyten zur Ablösung nicht ausreichend stark gebundener Zellen.

## **4.5. Fehlerbreite**

### **4.5.1. Fehler bei der Quarzbeschichtung mit PLL**

Da die Beschichtung der Goldquarze mit Poly-L-Lysin ein händisches Verfahren ist (siehe 3.2.2.), ist sie anfällig für Fehler. Zu starker Stickstoffstrom oder zu kurzer Abstand des Stroms zum Quarz können zu einer schlechte Beschichtung führen, ebenso wie eine unzureichend gekühlte PLL-Lösung. Dadurch kommt es zur Denaturierung des Proteins und es kommt keine Schicht zustande. Des Weiteren können unzureichende Spülungen der Quarze oder ein falsch eingestellter Inkubator zu insuffizienter Beschichtung führen.

### **4.5.2. Luftblasenproblematik**

Da Luftblasen im Schlauchsystem des FidgeType FgT1 zum Versiegen des Mediumstromes zum Quarz führen oder den Medienstrom über den Quarz verhindern und, wenn sie in der Messkammer entstehen, auch zur Zerstörung der darauf befindlich Zellen führen, sind sie zu vermeiden. Zu Luftblasen führen Undichtigkeiten im Schlauchsystem, vor allem an Verbindungsstücken, die häufig aus Desinfektionszwecken gewechselt werden. Außerdem führt ungenügende Entgasung des Mediums zu vermehrter Blasenbildung. Dies ist besonders bei Messungen oberhalb der Raumtemperatur aufgetreten.

### **4.5.3. Kontaktierung am FidgeType FgT1**

Eine ungenügende Kontaktierung zwischen den Elektroden des Quarzes und der Anlage in der Messkammer führen zum Abbruch des Stromflusses zwischen der Anlage und dem Goldquarz. Somit kommt keine Schwingung des Quarzes zustande und es kann keine Frequenz aufgezeichnet werden. Des Weiteren können nicht mittig geklebte Quarze im Haltering oder zu fest und zu locker verschlossene Messkammern zu einer schlechten Kontaktierung und damit zu einer instabilen Frequenzübertragung führen.

Da die Quarze manuell eingebracht werden, konnte eine 100% exakte Positionierung nicht in allen Fällen bewerkstelligt werden, wodurch es teilweise

zu ungenügender Kontaktierung und zu Verspannungen durch das Einbringen in die Messkammer kam. Dies spiegelt sich in instabilen Frequenzverläufen wieder. Für die Messungen wurden diese Quarze aussortiert.

#### **4.5.4. *Plasmodium falciparum*- Kultur**

Die Kultivierung von *Plasmodium falciparum* ist ein sehr diffiziles Verfahren und bedarf eines guten Timings wenn Plasmodien eines bestimmten Stadiums für einen Versuch benötigt werden. Bereitet man also die Parasiten zu früh für den Versuch vor, dauert er wesentlich länger, da das Schizontenstadium noch nicht erreicht ist. Wird mit der Vorbereitung zu spät begonnen ist das Schizontenstadium bereits überschritten und es sind bereits Merozoiten vorhanden, wodurch ein Versuch nicht mehr möglich ist. Des Weiteren sind Plasmodien sehr anfällig für niedrigere Temperaturen als 37°C. Die Wärmekette darf also nicht unterbrochen werden, sonst führt dies zum Absterben der Parasiten.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Temperatureinfluss auf den Merozoitenausritt untersucht werden mit der Aussicht einer Synchronisierung des Austrittes durch thermische Trigger. Dieser Vorgang wurde mit Hilfe des FidgeType FgT1 Analysegerätes, das sich der Methode der Schwingquarzsensoren bedient, untersucht und aufgezeichnet.

### 5.1. Ankopplungsmessung zur Testung der PLL- Schicht

Um Messungen mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten vornehmen zu können, musste zunächst ein Weg gefunden werden, Erythrozyten auf dem Goldquarz zu binden. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin hatte sich bereits zur Adsorption von Proteinen und Zellen bewährt (23).

Daher wurde sie hier zuerst an gesunden Erythrozyten erprobt, die stellvertretend für infizierte Erythrozyten verwendet wurden. Durch die positive Ladung des PLL (23) kam eine stabile Bindung der negativ geladenen Erythrozytenmembran zustande (24).

Die Versuche haben gezeigt, dass es bei gesunden Erythrozyten zu einer sehr dichten und gleichmäßigen Belegung des Quarzes kommt. Dies wurde durch einen optischen Nachweis mit dem Lichtmikroskop bestätigt.

Es erfolgte ein durchschnittlicher Frequenzabfall von -3000 Hz, der gleichgesetzt werden kann mit einer starken Belegung des Quarzes mit Erythrozyten. Beim auszählen ergab sich ein Durchschnitt von 634 Erythrozyten im Mikroskopfeld bei 50facher Vergrößerung.

Die Entscheidung zur Immobilisierung von Erythrozyten auf dem Goldquarz mittels Poly-L-Lysin stellte sich also als äußerst praktisch und erfolgversprechend dar. Des Weiteren war die Versuchsdurchführung und Aufzeichnung mittels FidgeType FgT1 sehr gut möglich und es konnte eine stabile und gleichmäßige Ankopplung der Erythrozyten nachgewiesen werden.

## **5.2. Langzeitankopplungsmessung zur Testung der Schichtstabilität**

Im Vorfeld wurde weiterhin getestet, ob die Bindung der Erythrozyten am Poly-L-Lysin über mehrere Stunden konstant bleibt und es zu keiner Ablösung von Zellen nach einem gewissen Zeitraum kommt. Dies war nötig, da in dieser Arbeit Fieberschübe im Stundenbereich erprobt wurden.

Es sollte ausgeschlossen werden dass es zu einer derartigen Zellreduktion auf dem Sensor kommt, wodurch Frequenzschwankungen durch einen Merozoitenaustritt nicht mehr erkennbar werden.

Zu diesem Zweck wurde eine normale Ankopplungsmessung vorgenommen und dann unter konstantem Mediumfluss durch die Messkammer über einen Zeitraum von 20 Stunden die Frequenz aufgezeichnet. Es wurde erwartet, dass die Frequenz über den gesamten Messzeitraum konstant bleibt, da es zu keinerlei Massenveränderungen auf dem Quarz kommt. Bei Messungen mit nicht infizierten Erythrozyten zeigte sich keine relevante Reduktion der Belegung, was auch durch lichtmikroskopische Untersuchungen der eingesetzten Quarze belegt wurde, da sich hier stets eine dichte Belegung darstellte. Auch waren nur leichte Schwankungen der Frequenz zu verzeichnen, die tolerierbar waren.

Des Weiteren dienten diese Langzeitmessungen zur Erprobung aller weiteren Parameter, die von Bedeutung sein könnten. So stellte sich vor allem die Bildung von Luftblasen in der Messkammer als Problem heraus, da es dadurch zu erheblichen Frequenzschwankungen kam. Es zeigte sich, dass es vor allem bei den Messperioden der erhöhten Temperaturen von 39 bis 41°C zur Blasenbildung kam. Eine gründliche Entgasung des Mediums vor Messbeginn ist somit für die Gewährleistung einer guten Messung unabdingbar. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, als das Medium eine Stunde bei 0 bar im Vakuum entgast wurde. Die Gefahr der Blasenbildung ist ebenfalls beim Aufziehen der Probe gegeben, da hier die Zuleitungsschläuche aus dem mediumgefüllten Schnappdeckgläschen in das Probeneppendorfgesäß überführt werden

müssen. Es ist also darauf zu achten, dass die Pumpen komplett zum Stillstand gekommen sind, bevor die Schläuche aus dem jeweiligen Gefäß entfernt werden.

Trotz der zeitweise schwierigen Sicherstellung eines blasenfreien Medienstromes konnte nachgewiesen werden, dass eine stabile Ankopplung der Erythrozyten auch nach einer Versuchsdauer von 20 Stunden noch gegeben ist.

### **5.3. Testung der Auswirkung von Temperaturveränderungen auf die Frequenz**

Dass Temperaturveränderungen einen Einfluss auf die Frequenz von Schwingquarzen haben, war bereits bekannt (17), für unsere Versuche wurden jedoch nochmals Messungen mit unbeschichteten Quarzen unternommen, die einer Temperaturveränderung ausgesetzt wurden, welche über der für die Parasitenversuche benötigten lagen. Getestet wurde eine Veränderung von 5,5 °C. Die höchste getestete Temperaturveränderung bei Parasitenmessungen waren 4°C. Es sollte also der maximale Effekt getestet werden, damit davon ausgegangen werden konnte, dass er bei den Parasitenmessungen minimiert ist.

Bei einem Temperaturanstieg von 5,5°C war eine Frequenzabnahme zu beobachten, die jedoch nicht größer als -50 Hz war. Bei einer Temperaturabnahme von 5,5°C kam es hingegen zu einer Frequenzzunahme, die 100 Hz nicht überstieg.

Im Vergleich zu Frequenzänderungen bei Ankopplung von gesunden oder infizierten Erythrozyten, die sich im Bereich von -1000 bis -3000 Hz befinden, ist diese Auswirkung ergebnisunschädlich und daher vernachlässigbar.

#### **5.4. Langzeitankopplungsmessung mit *Plasmodium falciparum* und Temperaturreampe**

Ziel dieser Messung war es herauszufinden, ob die *Plasmodium falciparum* Kultur durch thermische Trigger synchronisiert und so zum gleichzeitigen, innerhalb von Minuten stattfindenden Austritt aller Merozoiten angeregt werden kann. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 3.3.4. beschrieben.

Der erwartete Kurvenverlauf im Falle eines erfolgreichen Experiments sollte so aussehen, dass es bei Überleitung der Parasitenprobe über den Quarz zu einer Ankopplung an die Poly-L-Lysin Schicht kommt und damit zu einer Abnahme der Frequenz. Dies war auch bei allen Messungen der Fall, allerdings in einem geringeren Maß als bei Ankopplungsmessungen mit gesunden Erythrozyten.

Lag der Frequenzabfall bei gesunden Erythrozyten durchschnittlich bei -2000 bis -3000 Hz, so konnte der Abfall bei infizierten Erythrozyten nur mit durchschnittlich -1500 Hz verzeichnet werden. Klärungsversuche folgen später.

Im weiteren Verlauf wurde abgewartet, bis sich die Frequenz stabilisierte. Dann wurde die Temperaturreampe eingeleitet. Im Idealfall sollte während oder nach der Temperaturreampe ein Frequenzanstieg erfolgen, der Ausdruck des Merozoitenaustritts aus dem Erythrozyten wäre. Durch den kontinuierlichen Mediumstrom über den Quarz würden mögliche freie Membranbestandteile und freie Merozoiten vom Quarz gespült. Dadurch käme es zu einer Massenreduktion auf dem Quarz und somit zu einem Frequenzanstieg.

Im aufgezeichneten Kurvenverlauf der Experimente kam es in der Tat auch zu einem Frequenzanstieg um durchschnittlich 818 Hz. Allerdings erfolgte dieser nicht in einer steilen Zacke, sondern über durchschnittlich 4,25 Stunden hinweg. Da der Quarz die Veränderung der Masse an seiner Oberfläche in Echtzeit anzeigt, kann man also sagen, dass es nicht wie für eine Synchronisation zu hoffen gewesen wäre zu einem sofortigen kompletten Merozoitenaustritt als Reaktion auf die Temperaturerhöhung kam. Wohl aber spricht die Kurve für eine Beschleunigung des Austritts über die ersten 2-4

Stunden hinweg. In der Kontrolle ist während dieser Zeit kein Anstieg zu verzeichnen.

Um die genaue Entwicklung von *Plasmodium falciparum* nachvollziehen zu können, wurden parallel zu jeder Messung Ausstriche angefertigt, die mit Giemsa gefärbt und dann lichtmikroskopisch ausgewertet wurden.

Diese Auswertung zeigte kein eindeutiges Bild. Alle Experimente wurden mit Plasmodien im Schizontenstadium begonnen. War dieses Stadium noch nicht erreicht, wurde auch kein Experiment begonnen. Die Ausstriche nach Beendigung der Temperaturrampe zeigten bei allen Messungen ein einheitliches Bild. Es waren immer noch Plasmodien im Schizontenstadium sichtbar und nur vereinzelt waren ausgetretene Merozoiten zu erkennen. Ein einheitliches Bild von ausschließlich Merozoiten war in keinem Experiment nachzuweisen. Da nicht wie erwartet die Schizonten alle in einem sehr kurzen Zeitfenster platzten und ihre Merozoiten freigaben, sondern es sich wohl über einen länger andauernden Prozess handelt ist eine Aussage über die ausgetretene Merozoitenzahl schwierig, da wahrscheinlich viele durch Versterben auf dem Ausstrich nicht mehr nachzuweisen sind, da wie bereits erwähnt freie Merozoiten nur sehr kurz überleben können. Wäre es zu einer schnellen, schlagartigen Freisetzung gekommen, hätte im Moment des Frequenzanstieges ein Ausstrich angefertigt werden können, der nur Merozoiten zeigt.

Um zu vergleichen ob sich die Temperaturrampe auf die Entwicklung der Plasmodien auswirkt, wurden ebenfalls Ausstriche von der gleichen Kultur angefertigt, die die ganze Zeit über bei 37°C im Inkubator gehalten wurde.

Verglich man also die Ausstriche der Probe, die Temperaturveränderungen ausgesetzt wurde mit der Probe, die keine Temperaturveränderung erfuhr, so stellte man in der Entwicklung der Plasmodien keinen Unterschied fest. Sowohl nach der Temperaturrampe als auch zum Ende des Experiments waren in allen Ausstrichen hauptsächlich Schizonten zu erkennen. Es waren aber ebenfalls immer freie Merozoiten nachzuweisen.

Ein unmittelbarer Vergleich ist dennoch schwierig, da eine genaue Quantifizierung von verbliebenen Schizonten, gerade ausgetretenen Merozoiten und bereits verstorbener Merozoiten nicht durchgeführt wurde. Es ist also zu diesem Zeitpunkt nicht feststellbar ob sich durch die Temperatureinwirkung vermehrt Schizonten zu Merozoiten entwickelten und damit den Erythrozyten zum Platzen brachten. Im Ausstrich ist lediglich das Verhältnis von Schizonten zu Merozoiten zu erkennen, welches nicht als sicherer Beweis herangezogen werden kann, insbesondere da ein beschleunigter Merozoitenausritt, wenn er erfolgte, nicht schlagartig sondern protrahiert verlief. Eine genaue Quantifizierung, ob durch den Einfluss der Temperaturrampe mehr Merozoiten freigesetzt werden als ohne müsste noch unter Einsatz weiterer Methoden erbracht werden.

Die Testung anderer Temperaturen unter 38°C führten zu keinem anderen Ergebnis. Dennoch bleibt die genaue Verifizierung durch eine genauere Auswertung der Zellzahlen aus. Des Weiteren führen Temperaturen von 40 und 41°C zu weitgehender Wachstumshemmung und zum Tod der Plasmodien (25, 26, 27). Dies scheint aber vor allem bei *Plasmodium falciparum* im Trophozoiten- und Schizontenstadium der Fall zu sein. Diese Stadien sind besonders anfällig für Temperaturveränderungen, da hier besonders wenig PfHSP70-I exprimiert wird (25). Dieses heat shock protein ist dafür verantwortlich, dass alle Proteine der Zelle richtig gefaltet und funktionstüchtig sind und wird vor allem als Antwort auf thermischen Stress gebildet (28).

Dies führt also dazu, dass Schizonten besonders anfällig für Veränderungen in ihrer Entwicklung sind, im Gegensatz zu Ringstadien, wo febrile Temperaturen den gegenteiligen Effekt aufweisen (29).

Dies führte zu der Entscheidung sich bei den Messungen hauptsächlich auf febrile Temperaturen von 39°C zu beschränken. Ebenfalls schien es nicht lohnenswert mit anderen Stadien als Schizonten zu arbeiten, da zu frühe Stadien nicht auf die Temperaturrampen reagieren würden und es ebenfalls zu einer zu langen Messdauer kommen würde. Dies wiederum hätte die Fehlerquote massiv erhöht, wie vor allem in Kapitel 5.2. beschrieben.

Der durch die QCM aufgezeichnete Kurvenverlauf entsprach nur teilweise den Erwartungen. Wie erhofft zeigte sich nach abgeschlossener Ankopplung der infizierten Erythrozyten ein Anstieg der Frequenz. Doch stieg die Frequenz durchschnittlich 4,25 Stunden an und es verblieben immer Schizonten in der Probe. Ein schneller Anstieg innerhalb von Sekunden oder Minuten, mit ausschließlich verbleibenden Merozoiten konnte nicht erzielt werden. Dennoch schien eine Merozoitenfreisetzung, möglicherweise durch die Einwirkung der 39°C verlangsamt, statt zu finden.

Aber auch andere Faktoren könnten bei dem stattgefundenen Frequenzanstieg eine Rolle gespielt haben, da dieser zum Teil sehr ausgeprägt war.

Auch war es erstaunlich zu beobachten, dass die bei gesunden Erythrozyten nachgewiesene Schichtstabilität und Ankopplung am PLL so nicht auf mit *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten übertragen werden konnte.

Es ist bekannt, dass durch die Infektion der Erythrozyten mit Plasmodien weitreichende Veränderungen der Erythrozytenmembranstruktur zustande kommen. Es kommt vor allem zur Ausbildung von knobs an der Erythrozytenmembran durch Integrierung von parasitären Proteinen, wie zum Beispiel PfEMP1 und 3 (*Plasmodium falciparum* erythrozyte membrane protein 1 und 3), MESA (mature parasite- Infected erythrozyte surface antigen) oder KAHRP (knob associated-histidin rich protein) (30). Dies führt zu einer Erhöhung des Zeta-Potentials der Erythrozytenmembran von -15,7mV auf -4,64mV und somit wird die Fähigkeit zur elektrostatischen Bindung beeinflusst (31).

Dies könnte dazu führen, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenem Poly-L-Lysin und der nun abgeschwächten negativen Ladung der infizierten Erythrozytenmembran gestört sind. Es kommt zwar zur anfänglichen Ankopplung aber die Bindung kann nicht entsprechend lang genug aufrecht erhalten werden, es kommt zur Ablösung von Erythrozyten vom Quarz und damit zu einer Massenreduktion auf dem Sensor und dementsprechend zu einem Frequenzanstieg. Aber auch die anfängliche

Ankopplung scheint gestört zu sein, denn im Vergleich zu gesunden Erythrozyten erzielten die infizierten Zellen wesentlich schlechtere Werte wie oben bereits beschrieben.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass es durch die Temperaturrampe zu Veränderungen am Poly-L-Lysin selbst kommt. Es ist vom Hersteller Sigma-Aldrich beschrieben, dass es bei Temperaturunterschieden zu Stabilitätsproblemen kommen kann. Dies ist aber nicht genauer spezifiziert. Durch die längere Einwirkung von 39°C könnte es aber zur Denaturierung des Proteins kommen und damit zum Verlust der Bindung zum Erythrozyten.

Andere Möglichkeiten der Immobilisierung von *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten auf dem Goldquarz sind also in Betracht zu ziehen.

Es scheint also zu einer langsamen Freisetzung der Merozoiten zu kommen. Allein durch die Ausstriche ist keine genaue Verfolgung der tatsächlichen Ereignisse nachzuvollziehen. Sie wurde zu diesem Zeitpunkt verwand, da sich die Erwartungshaltung gegenüber der Ergebnisse deutlich vom tatsächlichen Ergebnis unterschied.

Gleichzeitig ließ sich eine sofortige massive Freisetzung von Merozoiten nach Wärmebehandlung anhand der QCM Kinetik ausschließen.

## 6. Zusammenfassung

Malaria ist eine der am weitesten verbreiteten Erkrankungen der Welt. Fast 3 Millionen Menschen sterben jedes Jahr an den Folgen dieser Erkrankung. Ausgelöst wird sie unter anderem vom *Plasmodium falciparum*. In dieser Arbeit wurde erprobt, ob bei einer *Plasmodium falciparum* Kultur mit Hilfe von thermischen Triggern ein synchroner Merozoitenaustritt ausgelöst werden kann. Getestet wurde dies unter Verwendung einer Quarzmikrowaage, dem FidgeType FgT1, mit der man geringste Masseveränderungen auf einem Sensor als Frequenzänderung ablesen kann. Mit Hilfe von Biosensoren in Form von goldbeschichteten SiO<sub>2</sub> Quarzen auf denen eine Poly-L-Lysin Schicht aufgebracht wurde, wurden mit *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten auf dem Quarz immobilisiert. Die Messkammern des Gerätes sind vollständig thermostatisierbar. Die Grundtemperatur befand sich bei 37°C, da dies zwingend für das Überleben der Kultur nötig war. Waren die infizierten Erythrozyten erfolgreich auf dem Quarz immobilisiert, wurde die Temperatur auf 39°C erhöht und dann zwischen einer und acht Stunden konstant gehalten. Anschließend wurde sie wieder auf 37°C abgesenkt und die Frequenz wurde weiter bis zur 20sten Stunde aufgezeichnet. Zur Überprüfung des Entwicklungszyklus wurden regelmäßig dünne Ausstriche angefertigt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Als Negativkontrolle diente eine Probe der gleichen Kultur, die die ganze Zeit bei 37°C inkubiert wurde und von der ebenfalls Ausstriche angefertigt wurden. Bei Ankopplung von Erythrozyten auf dem Sensor kam es zum Abfall der Frequenz. Es wurde erwartet, dass es bei einem synchronen Merozoitenaustritt wieder zu einem Frequenzanstieg kommt. Im Kurvenverlauf zeigte sich ein Frequenzanstieg der einen Merozoitenaustritt vermuten ließ und sich über durchschnittlich 4,25 Stunden erstreckte. Es handelte sich also um keine abrupte schnelle Freisetzung aller Merozoiten, wie im Sinne einer Synchronisierungsmöglichkeit erhofft, sondern möglicherweise um eine verlangsamte Freisetzung, die allerdings mit der durchgeführten Methode der Ausstrichanfertigung nicht bestätigt werden konnte, da eine genaue Quantifizierung der verschiedenen Zellen fehlt.

## 7. Literaturangaben

1. Fritz H. Kayser, Kurt A. Bienz, Johannes Eckert, Rolf M. Zinkernagel, 2001.  
Medizinische Mikrobiologie. 10. Auflage.  
Stuttgart: Georg Thieme Verlag
2. Jiraprapa Wipasa, Salenna Elliott, Huji Xu, Michael F. Good, 2002.  
Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches.  
Immunology and Cell Biology 80: 401- 414
3. R. Marre, Th. Mertens, M. Trautmann, W. Zimmerli (Hrsg.), 2008.  
Klinische Infektiologie. 2. Auflage.  
München: Elsevier GmbH
4. Joel G. Breman, 2001. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinations, and estimates of the malaria burden.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 64(1, 2)S: 1-11
5. Stephen M. Todryk, Adrian V. S. Hill, 2007. Malaria vaccines: the stage we are at. Nature Reviews: Microbiology 5: 487- 489
6. Jürgen Knobloch (Hrsg.), 1996.  
Tropen- und Reisemedizin, 1. Auflage  
Jena: Gustav Fischer Verlag
7. Lucius, Loos- Frank, 2008.  
Biologie von Parasiten, 2. Auflage  
Berlin, Heidelberg: Springer Verlag

8. H. Mehlhorn, D. Eichenlaub, T. Löscher, W. Peters, 1995.  
Diagnostik und Therapie der Parasitosen des Menschen, 2. Auflage  
Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag
9. Köhler, Eggers, Fleischer, Marre, Pfister, Pulerer, 2001.  
Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage  
München, Jena: Urban & Fischer Verlag
10. Mark E. Wickham, Melanie Rug, Stuart A. Ralph, Nectarios Klonis, Geoffrey I. McFadden, Leann Tilley, Alan F. Cowman, 2001.  
Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum- infected human erythrocytes.  
The EMBO Journal Vol. 20 No. 20 S. 5636- 5649
11. Peter Wenk, Alfons Renz, 2003.  
Parasitologie- Biologie der Humanparasiten, 1. Auflage  
Stuttgart: Georg Thieme Verlag
12. Miguel Prudêncio, Ana Rodriguez, Maria M. Mota, 2006.  
The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage.  
Nature Reviews Vol. 4 S. 849- 856
13. Masamichi Aikawa, Louis H. Miller, James Johnson, John Rabbege, 1978.  
Erythrocyte entry by malarial parasites- A Moving Junction between Erythrocyte and Parasite.  
J. Cell Biology Vol. 77 S. 72- 82
14. Marcus C S Lee, David A Fidock, 2008.  
Arresting malaria parasites egress from infected red blood cells.  
Nature Chemical Biology Vol. 4 Number 3

15. Sharon Yeoh, Rebecca A. O'Donnell, Konstantinos Koussis 2007.  
Subcellular Discharge of a Serine Protease Mediates Release of Invasive Malaria Parasites from Host Erythrocytes.  
Cell 131, 1072- 1083
  
16. Andreas Janshoff, Hans-Joachim Galla, Claudia Steinem, 2000.  
Mikrofravimetrische Sensoren in der Bioanalytik- eine Alternative zu optischen Biosensoren?  
Angew. Chem. 112, 4164- 4195
  
17. Frank Karl Gehring 2005.  
Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten –Entwicklung eines Blutanalysegerätes  
Dissertation Technische Universität Kaiserslautern
  
18. Matthew A. Cooper, Victoria T. Singleton 2007.  
A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions.  
Journal of molecular recognition 20: 154- 184
  
19. Michael F. Good 2001.  
Towards a blood- stage vaccine for malaria: are we following all the leads?  
Nature reviews immunology volume 1
  
20. Ljungström I., Perlmann H., Schlichtherle M., Scherf A. und Wahlgren M. (2004).  
Methods in Malaria Research. Manassas, Virginia.
  
21. 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

22. Ribaut C. (2008), Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human Plasmodium species.  
Malar. J. 2008(7): 7:45
23. W. M. Huang, S. J. Gibson, P. Facer, J. Gu, J. M. Polak 1983.  
Improved Section Adhesion for Immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-Lysine as a Slide Coating
24. Stefan Richter 1997.  
Resttransport von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> an HUMANERYTHROZYTEN- ein elektroneutraler Austauschprozess.  
Dissertation Humboldt- Universität zu Berlin.
25. Long, Huayan 1999.  
Die Auswirkung von febrilen Temperaturen auf das Wachstum des Malariaparasiten Plasmodium falciparum und die Produktion von Zytokinen durch mononukleäre Leukozyten.  
Dissertation Eberhard- Karls- Universität Tübingen
26. Kwiatkowski, D. 1989.  
Febrile temperatures can synchronize the growth of Plasmodium falciparum in vitro.  
J. Exp. Med. 169: 357- 361
27. Porter H., Gamette M.J., Cortez-Hernandez D.G., Jensen J.B. 2008.  
Asexual blood stages of Plasmodium falciparum exhibits signs of secondary necrosis, but not classical apoptosis after exposure to febrile temperatures (40°C).  
J. Parasitol. 94(2): 473-80.

28. Shonhai A., Boshoff A., Blatch G.L. 2005.  
Plasmodium falciparum heat shock protein 70 is able to suppress the thermosensitivity of an Escherichia coli Dank mutant strain.  
Mol. Genet. Genomics 274(1): 70-8.
29. Soundara Raghavan Pavithra, Gowrishankar Banumathy 2004.  
Recurrent fever promotes Plasmodium falciparum development in human Erythrocytes.  
J. Biol. Chem. 279: 46692-46699
24. Stefan Richter 1997.  
Resttransport von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> an Humanerythrozyten- ein elektroneutraler Austauschprozess.  
Dissertation Humboldt- Universität zu Berlin.
30. Karena L. Waller, Brian M. Cooke 1999.  
Mapping the binding domain involved in the interaction between the Plasmodium falciparum knob-associated histidin-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1).  
J. Biol. Chem. 274: 23808- 23813
31. Tokumasu F., Ostera G.R., Amaratunga C., Fairhurst R.M. 2012.  
Modification in erythrocyte membrane zeta potential by Plasmodium falciparum infection.  
Exp. Parasitol. 131(2): 245-51.
32. Bass C.C., Johns F.M. 1912.  
The cultivation of malarial plasmodia (plasmodium vivax and plasmodium falciparum) in vitro.  
From the Laboratory of Tropical medicine and Hygiene, Medical Department, Tulane University, New Orleans, Louisiana

33. Douglas H. Kerlin, Michelle L. Gatton 2013.  
Preferential Invasion by Plasmodium Merozoites and the Self- Regulation  
Of parasite Burden.  
PLoS One. 2013; 8(2): e57434
  
34. Lambros C., Vanderberg J.P. 1979.  
Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture.  
J Parasitol. 1979 Jun; 65(3): 418-20.
  
35. Tiaan Zhou, Kenneth A. Marx, Susan J. Braunhut 2012.  
Dynamic cell adhesion and viscoelastic signatures distinguish normal from  
normal from malignant human mammary cells using quartz crystal  
microbalance.  
Analytical Biochemistry, Vol.421, Issue1:164-171

## 8. Abbildungen

Abb. 1: Joel G. Breman, 2001. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinations, and estimates of the malaria burden.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 64(1, 2)S: 1-11

Abb. 2: World Health Organisation 2004

Abb. 3: Jürgen Knobloch (Hrsg.), 1996.

Tropen- und Reisemedizin, 1. Auflage

Jena: Gustav Fischer Verlag

Abb. 4: R. Marre, Th. Mertens, M. Trautmann, W. Zimmerli (Hrsg.), 2008.

Klinische Infektiologie. 2. Auflage. München: Elsevier GmbH

Abb.5: Lucius, Loos- Frank, 2008.

Biologie von Parasiten, 2. Auflage

Berlin, Heidelberg: Springer Verlag

Abb. 6: Fotoarchiv der Biosensorikgruppe, Tübingen

Abb. 7: Fotoarchiv der Biosensorikgruppe, Tübingen

## 9. Danksagungen

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Tübingen und besonders bei Prof. Dr. H. Northoff für die Annahme als Doktorandin.

Des Weiteren gilt besonderer Dank an Dr. Frank Gehring und allen Mitarbeitern der Biosensorikgruppe, die alle immer mit Rat und Tat und viel Elan zur Seite standen, vor allem die liebe Daniela.

Außerdem gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Tropenmedizin für die freundliche Hilfe bei der Unterhaltung meiner Plasmodium falciparum-Kultur.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und Freunden in Tübingen und Dresden für jegliche Art von Unterstützung und Motivationshilfen.

## 10. Lebenslauf

Name	Katrin Julia Wirth
Geburtsdaten	28.11.1984 in Dresden
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Schulbildung: 1991- 1995  1995- 1997  1997- 2003	Grundschule Johanna in Dresden  Romain- Rolland- Gymnasium in Dresden  Marie- Curie- Gymnasium in Dresden
Auslandserfahrung 2003- 2004	Work & Travel Australien
Praktika 2004-2005	Zahnarztpraxis Dr. Katrin Wirth in Dresden
Studium 2005- 2010  Dissertation 2008- 2013	Eberhard- Karls- Universität Tübingen  Zahnmedizin  Staatsexamen 26. Mai 2010  Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin IKET Tübingen
Berufstätigkeit 2010- jetzt	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Katrin

