

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
Leiter: Prof. Dr. med. Michael Hölscher

**Nachweis von *Plasmodium falciparum* Gametozyten-RNA in Malaria-
Patienten-Proben mittels QT-NASBA**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Katharina Marlene Kast

aus
Hannover, Deutschland
2017

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Löscher

Mitberichterstatter: Prof. Sören Schubert

Prof. Lesca Holdt

Mitbetreuung durch die Dr. med. Nicole Berens-Riha

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Michael Pritsch

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2017

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kast, K., Berens-Riha, N., et al. (2013). "Evaluation of *Plasmodium falciparum* Gametocytes in different Patient Material." *Malaria Journal* 12:438.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in Kurzvorträgen auf Kongressen vorgestellt:

K. Kast (10.09.2013). "Evaluation of *Plasmodium falciparum* gametocytes in different patient material". Vortrag auf dem ECTMIH13 (8th European Congress for Topical Medicine and International Health). Kopenhagen, Dänemark.

K. Kast (25.05.2013). „Nachweis von Gametozyten-spezifischer mRNA in Urin-, Speichel-, Mundschleimhaut-, Fingerprick- und venösen Blutproben von mit *Plasmodium falciparum* Infizierten mittels der NASBA Methode“. Vortrag bei dem Abschlussseminar der Förderung für Forschung und Lehre, Stipendienprogramm der Ludwig-Maximilians-Universität. Herrsching, Deutschland.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Malaria tropica	1
1.1.1 Verbreitung der Malaria tropica.....	1
1.1.2 Vektoren	4
1.1.3 Lebenszyklus des <i>Plasmodium falciparum</i> im Menschen	4
1.1.4 Lebenszyklus des <i>Plasmodium falciparum</i> in der Mücke	8
1.1.5 Pathophysiologie und Krankheitsbild	8
1.1.6 Diagnostik und Therapie	10
1.1.7 Geschichte der Bekämpfung von Malaria	11
1.2 Gametozyten	12
1.2.1 Biologie und Morphologie	12
1.2.2 Moderne molekulare Detektionstechniken	13
1.3 Zielsetzung der Arbeit	14
2. Patienten, Material und Methoden	16
2.1 Patientenakquise und Proben	16
2.1.1 Studiengebiet Äthiopien	16
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	17
2.1.3 Rekrutierungsablauf	17
2.1.4 Ethische Gesichtspunkte	17
2.1.5 Bestimmung der Parasitendichte.....	18
2.1.6 Probenentnahme und Lagerung	18
2.2 Material	19
2.2.1 Nukleotide	19
2.2.2 Kits	20
2.2.3 Chemikalien und Labormaterial	21
2.2.4 Geräte	21
2.3. Methoden.....	22
2.3.1 Herstellung von Verdünnungsreihen	22
2.3.1.1 <i>In vitro</i> -Kultur nach Trager und Jenson	22
2.3.1.1.1 Prinzip.....	22
2.3.1.1.2 Durchführung.....	23

2.3.1.2 DNA Extraktion	23
2.3.1.2.1 Prinzip	23
2.3.1.2.2 Durchführung	24
2.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion	24
2.3.1.3.1 Prinzip	24
2.3.1.3.2 Durchführung	25
2.3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.3.1.4.1 Prinzip	26
2.3.1.4.2 Durchführung	27
2.3.1.5 DNA-Gelextraktion	28
2.3.1.5.1 Prinzip	28
2.3.1.5.2 Durchführung	28
2.3.1.6 Transformation durch Elektroporation	29
2.3.1.6.1 Prinzip	29
2.3.1.6.2 Herstellung elektrokompeter Zellen.....	30
2.3.1.6.3 Durchführung	31
2.3.1.7 Übernacht-Kultur	32
2.3.1.7.1 Prinzip	32
2.3.1.7.2 Durchführung	32
2.3.1.8 Plasmid-Extraktion und Überprüfung der Sequenz.....	32
2.3.1.8.1 Prinzip	32
2.3.1.8.2 Durchführung	33
2.3.1.8.3 Überprüfung der Sequenz	33
2.3.1.9 Aufreinigung von PCR Produkten	35
2.3.1.9.1 Prinzip	35
2.3.1.9.2 Durchführung	35
2.3.1.10 T7 <i>In vitro</i> -Transkription	35
2.3.1.10.1 Prinzip	35
2.3.1.10.2 Durchführung	35
2.3.1.11 Anfertigung der Verdünnungsreihen	36
2.3.1.12 Analyse der künstlichen RNA mittels Bioanalyzer	37
2.3.1.12.1 Prinzip	37
2.3.1.12.2 Durchführung	38

2.3.1.12.3 Ermittlung der mRNA Kopien-Anzahl	39
2.3.1.13 Analyse der künstlichen RNA mittels NanoDrop.....	40
2.3.1.13.1 Prinzip	40
2.3.1.13.2 Durchführung	41
2.4 Analyse der Patientenproben	41
2.4.1 RNA Extraktion	41
2.4.1.1 Prinzip	41
2.4.2.1 Durchführung	42
2.4.2 QT-NASBA	42
2.4.2.1 Prinzip	42
2.4.2.2 Durchführung	44
2.5 Datenanalyse	45
3. Ergebnisse	47
3.1 Probenkollektiv.....	47
3.2 Qualitative Ergebnisse für die Detektion von Pfs16-mRNA.....	48
3.3 Qualitative Ergebnisse für die Detektion von Pfs25-mRNA.....	49
3.4 Qualitative Ergebnisse für die Detektion von 18S-rRNA.....	49
3.5 Quantitative RNA Detektion in den Patientenproben.....	51
3.6 Theoretisches Detektionslimit.....	51
3.7 Quantitativer Vergleich von Fingerprick- und venösem Blut von Pfs16 und Pfs25	51
4. Diskussion.....	54
4.1 Diskussion der qualitativen Ergebnisse.....	54
4.1.1 Pfs16-mRNA.....	54
4.1.2 Pfs25-mRNA.....	54
4.1.3 18S-rRNA.....	55
4.2 Diskussion der quantitativen Ergebnisse.....	57
4.3 Diskussion der Methoden	58
4.3.1 Umgang mit RNA.....	58
4.3.2 Quantifizierung der RNA.....	59
4.3.3 Konservierung der Proben auf Filterpapier	60
4.3.4 QT-NASBA.....	60

4.4 Schwachpunkte der Studie	61
4.5 Schlussfolgerung	62
5. Zusammenfassung	64
6. Literaturverzeichnis	66
7. Abkürzungsverzeichnis	78
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	80
9. Anhang	81
9.1 Aufklärung und Einverständniserklärung auf Englisch	81
9.2 Aufklärung und Einverständniserklärung auf Amharisch	82
9.3 Aufklärung und Einverständniserklärung auf Oromiffa	83
9.4 Fragebogen	84
9.5 Ethikkommission Deutschland	85
9.6 Ethikkommission Äthiopien	86
9.7 Danksagung	87
9.8 Eidesstaatliche Versicherung	88

1. Einleitung

1.1 Malaria tropica

1.1.1 Verbreitung der Malaria tropica

Malaria ist eine parasitäre Infektionskrankheit, die durch Stechmücken der Gattung Anopheles übertragen wird. Sie hat nicht nur in der Geschichte zahlreiche Opfer gefordert, sondern stellt auch gegenwärtig ein führendes Gesundheitsproblem dar. Verursacht wird sie durch einzellige Protozoen der Gattung Plasmodium, welche zu den Haemospororida der Gruppe Apicomplexa gehören. Von den über 200 bekannten Plasmodium Erregern wurden derzeit sechs humanpathogene Erreger festgestellt: *Plasmodium malariae*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* und *P. falciparum* (Win et al. 2004, Sutherland et al. 2010, Oguike et al. 2011). *P. vivax* und die beiden *P. ovale* Arten sind Erreger der sogenannten Malaria tertiana, *P. malariae* Erreger der Malaria quartana, welche beide einen milderen Verlauf haben als die Malaria tropica, die durch *P. falciparum* ausgelöst wird. Malaria tropica verursacht den aggressivsten Krankheitsverlauf und die meisten Todesfälle. *P. knowlesi* ist ein Erreger, der bevorzugt in malaysischen Makaken-Affen auftritt, von dem aber seit 1965 bekannt war, dass er auch natürlicherweise im Menschen vorkommen kann (Chin et al. 1965). Nachdem 40 Jahre keine weiteren Fälle bekannt wurden, wurde von Singh et al. 2004 von einem großen Fokus berichtet. (Cox-Singh et al. 2008, Singh and Daneshvar 2013). Das Verbreitungsgebiet des *P. knowlesi* beschränkt sich aufgrund des Hauptwirtes und spezieller Anopheles Vektoren derzeit auf Südostasien.

Schon der Papyrus Ebers (ca. 1570 v. Chr.) aus dem alten Ägypten, der zu den ältesten medizinischen Texten zählt, beinhaltet Beschreibungen der typischen Malaria-Symptomatik wie z.B. Milzvergrößerung und Wechselfieber. Der bislang früheste genetische Nachweis von *P. falciparum* Desoxyribonukleinsäuren (DNS) gelang 2010 in vier ägyptischen Mumien (Hawass et al. 2010). Darunter befand sich auch der ägyptische Pharao der 18. Dynastie Tutanchamun, der von 1332 bis 1323 v. Chr. regierte und bereits im Alter von 19 Jahren starb.

Auch in frühen griechischen Gedichten wurde Malaria erwähnt. So schrieb beispielsweise der antike Geschichtsschreiber Herodot von Halikarnassos (484–425 v. Chr.) nach einer Ägyptenreise:

„Das Land wird von Schwärmen von Stechmücken befallen, und die Menschen bedienen sich verschiedener Methoden um mit ihnen fertig zu werden... Jedermann ist mit einem Netz ausgestattet, welches er tagsüber zum Fischen gebraucht, nachts über seinem Bett festmacht und darunter schläft. In einen Mantel oder Tuch eingehüllt zu schlafen, hält die Stechmücken nicht fern, aber diese versuchen nicht einmal, durch das Netz zu gelangen.“

Auch heute noch gelten Mosquitonetze als wichtigste Präventionsmaßnahme gegen Malaria, und das Verwenden Insektizid-imprägnierter Bettnetze wird von der World Health Organisation empfohlen (WHO Pesticide Evaluation Scheme). Sehr detailliert beschrieb auch der wohl berühmteste Arzt des Altertums, Hippokrates von Kos (460-377 v. Chr), das Auftreten von Fieberschüben und stellte erstmals den Zusammenhang der Erkrankungen mit Sumpfgebieten her:

„Wenn es keine Flüsse gibt und das Wasser, welches die Menschen trinken, sumpfig, abgestanden und morastig ist, so wird der Körper des Menschen einen aufgetriebenen Bauch und eine vergrößerte Milz aufweisen.“ (Berenbaum 1992)

Auch im alten Rom war Malaria von großer Bedeutung. So wurden Tempel in sumpfigen Gegenden Mittelitaliens der Fiebergöttin *Dea Febris* gewidmet. Der Begriff Malaria kommt aus dem italienischen „mal aria“, was übersetzt „schlechte Luft“ bedeutet (Hempelmann and Krafts 2013). Man ging lange Zeit davon aus, dass die Krankheit durch schlechte Luft und Dämpfe aus Sümpfen übertragen wurde. Bis ins 19. Jahrhundert trat Malaria auch in Deutschland, wahrscheinlich eingeschleppt durch die römische Besetzung Germaniens, in gemäßigten Klimaregionen auf. In Norddeutschland war Malaria als sogenanntes Marschenfieber bekannt. Zu berühmten Malariapatienten zählten beispielsweise der deutsche Künstler Albrecht Dürer (1471-1528 n. Chr.) und der deutsche Dichter und Philosoph Friedrich Schiller (1759-1805 n. Chr.). Das Trockenlegen von Sumpfgebieten, die Entwicklung von Kanalisationssystemen und zunehmend höherer hygienischer Standard führten schließlich zur Ausrottung von Malaria in Deutschland (Trautmann (1913).

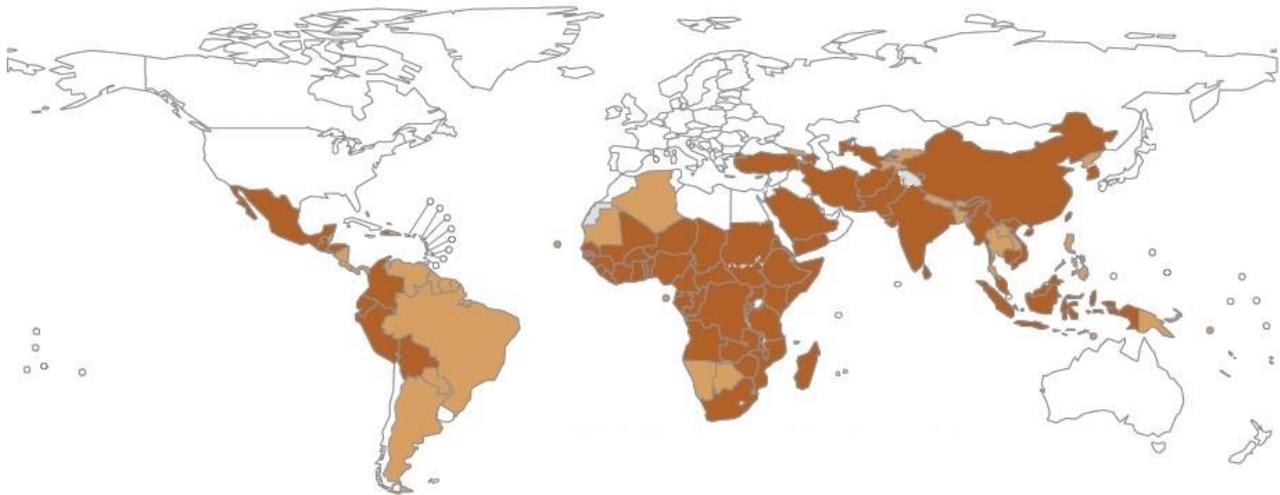


Abbildung 1: Weltkarte mit Ländern, die von Malaria betroffen sind (Stand 2012). Dunkelbraun sind die Länder markiert, in denen eine fortlaufende Malariatransmission stattfindet und bei denen eine Resistenz gegen mindestens ein Insektizid vorliegt. Von den hellbraun markierten Ländern wurden bisher trotz fortlaufender Transmission noch keine Resistenzen berichtet. Weiß markiert sind zertifiziert malariafreie Länder oder Länder, in denen seit einer Dekade kein Malariafall mehr aufgetreten ist. Aus den grauen Bereichen liegen keine Daten vor. *Quelle: Global Malaria Programme (GMP), World Health Organisation*

Auch heute noch stellt Malaria ein zentrales, weltweites Gesundheitsproblem dar. Nach Schätzungen der WHO gab es im Jahr 2013 198 Millionen Malariafälle (WHO Fact Sheet 2014) mit ca. 584.000 Todesfällen (Murray et al. 2012). 2004 erreichte die Malariasterblichkeit mit 1,8 Millionen Fällen ihren bisherigen Höhepunkt (Murray et al. 2012). Schätzungen zu Folge sind 2,4 Milliarden Menschen dem Risiko ausgesetzt, an Malaria zu erkranken (Guerra et al. 2008). 90 % der Todesfälle entfallen auf den afrikanischen Kontinent südlich der Sahara, der Rest auf Südostasien und Südamerika (Abbildung 1). Besonders betroffen sind Kinder unter 5 Jahren, Schwangere und HIV-Infizierte. Durch verbesserte Diagnostik- und Behandlungsmethoden konnte die Inzidenz zwischen 2000 und 2013 schon um 30 % global und um 34 % in afrikanischen Regionen gesenkt werden (WHO Fact Sheet 2014). Dennoch schlugen bisherige Versuche die Krankheit auszurotten fehl.

1.1.2 Vektoren

Die Malaria tropica wird von den weiblichen *Anopheles* Mücken übertragen (Talman et al. 2004, Baker 2010, Bousema and Drakeley 2011), die eine Gattung der Familie der *Culicidae* (Stechmücken) ist. Dies entdeckte der englische Mediziner Ronald Ross (1857-1932) 1897 und erhielt dafür 1902 den Nobelpreis für Medizin. Von den über 400 bekannten *Anopheles* Mücken können etwa 30-40 die Krankheit an den Menschen übertragen. Darunter ist *A. gambiae* die bisher am besten erforschte Art (Subbarao and Sharma 1997, Riehle et al. 2006). Nur die weiblichen Mücken ernähren sich von Blutmahlzeiten, während die Männchen sich von Nektar

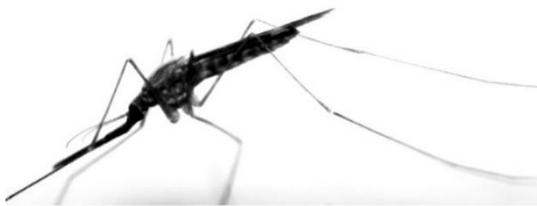


Abbildung 2: Anopheles Mücke

Quelle: modifiziert <http://www.chobesafari.com>

und anderen Flüssigkeiten ernähren (Löscher and Burchart 2010). Die *Anopheles* Mücke lässt sich morphologisch von anderen Mücken durch typische Merkmale unterscheiden, die sie von anderen häufig vorkommenden Stechmücken wie *Culex* und *Aedes* unterscheidet. Sie nimmt eine typische

Körperhaltung ein, bei der sie den Körper mit 30-45° zum Untergrund abwinkelt (Abbildung 2), der Kopf wird in Ruheposition tiefer als der Rumpf gehalten, die Flügel weisen Flecken auf, und das Rückenschildchen ist gerade und gleichmäßig rund. Sie brüten in sauberen, stehenden Gewässern jeglicher Größe und legen 50-200 1mm große Eier einzeln auf die Wasseroberfläche (Löscher and Burchart 2010). Über das Larven- und Puppenstadium entwickeln sich die Eier abhängig von Temperatur und Art innerhalb von 5-14 Tagen zur adulten Mücke, die fähig ist Malariaerreger zu übertragen (Centers for Disease, Control and Prevention). Die Übertragung von Malaria ist außerdem durch Bluttransfusionen, transplazentar und sehr selten durch Nadelstichverletzungen möglich (Bledsoe 2005).

1.1.3 Der Lebenszyklus des *Plasmodium falciparum* im Menschen

Der französische Armee-Chirurg Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922) entdeckte 1880 *P. falciparum* erstmals im Blutaussstrich eines infizierten Soldaten aus Algerien und erhielt dafür 1907 den Nobelpreis für Medizin. Die Parasiten durchlaufen während ihrer Entwicklung verschiedene Stadien (Abbildung 3). Aus der Speicheldrüse der infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke werden 10-100 sichelförmige Sporozoiten in den Menschen inokuliert (Abbildung 3 Punkt 1) (Frischknecht et al. 2004, Amino et al. 2006), während diese ihr Blutmahl nimmt und die Phase der asexuellen Sporogonie eingeleitet wird. Die Sporozoiten gelangen

innerhalb weniger Minuten zur Leber und dringen dort unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole in Hepatozyten ein (Mota et al. 2001, Daily and Waldron 2003, Bledsoe 2005). Die parasitophore Vakuole ist eine vom Parasiten gebildete intrazelluläre Membranbegrenzung, in der der Parasit das intrazelluläre Milieu seinen Bedürfnissen anpasst und somit sein Überleben ermöglicht. In dem Leberstadium, auch präerythrozytäres Stadium genannt, reifen die Sporozoiten 6-16 Tage zu Leberschizonten, welche schließlich aufplatzen und viele einkörnige Merozoiten bilden, die in den Blutstrom gelangen (Girard et al. 2007). Die Replikationsrate im Leberstadium ist dabei sehr hoch, und innerhalb weniger Tage können auf diesem Weg bis zu 30.000 Merozoiten entstehen (Bano et al. 2007).

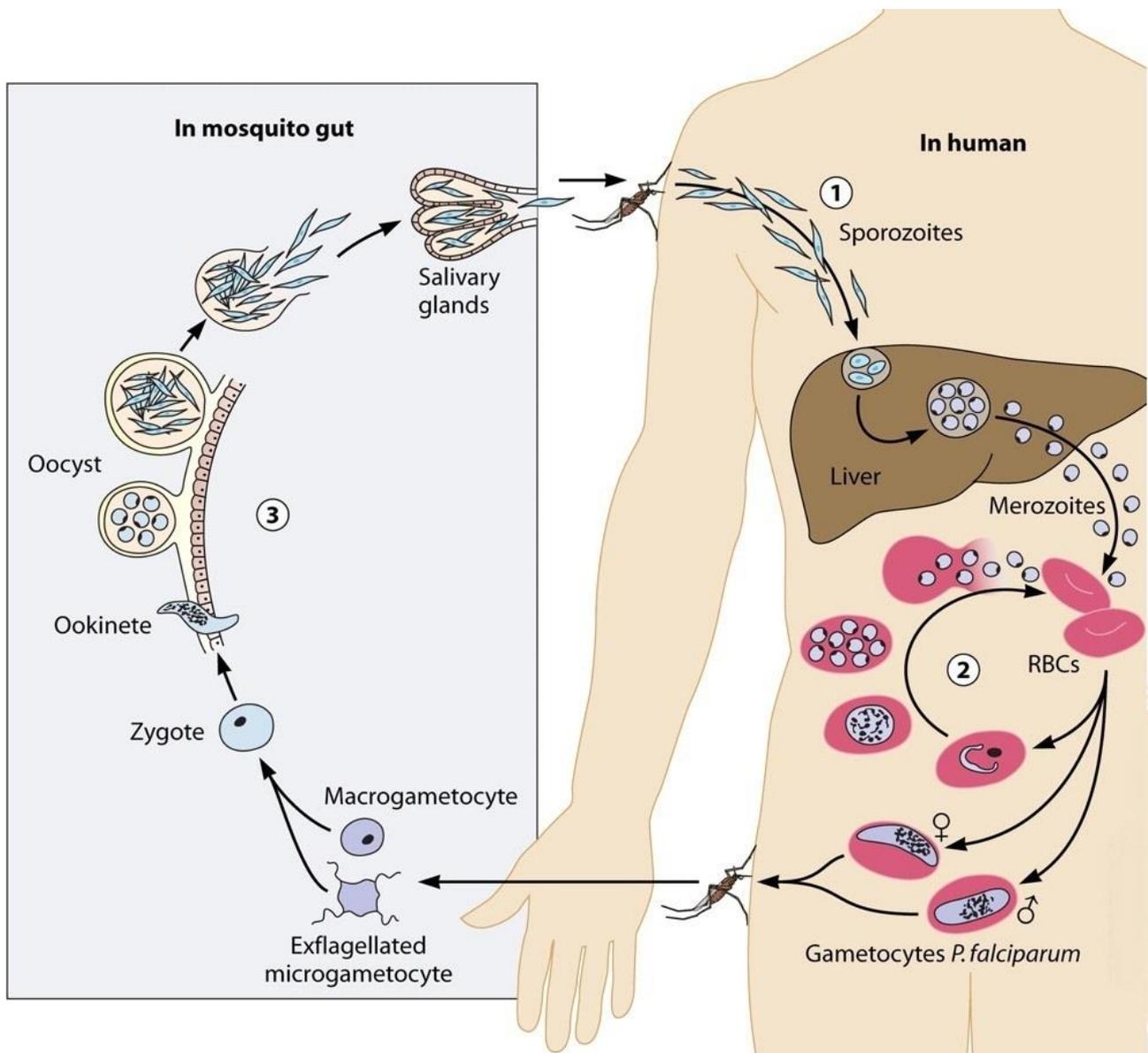
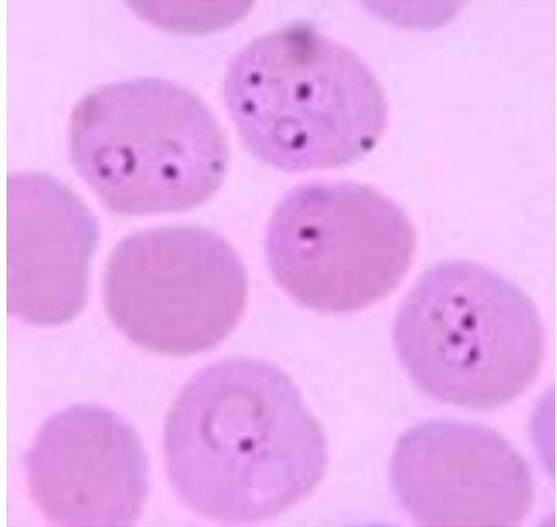


Abbildung 3: Der Lebenszyklus des *P. falciparum*. Quelle: Modifiziert von Bousema and Drakeley 2011.

Im Gegensatz zu *P. ovale* und *P. vivax* werden bei *P. falciparum* keine Schlafformen, die sogenannten Hypnozoiten, in der Leber hinterlassen. Im Blutstrom beginnt nun der erythrozytäre Kreislauf (Punkt 2 in Abbildung 3), bei dem die Merozoiten erneut unter Bildung einer parasitophoren Vakuole Erythrozyten befallen, sich in ihnen teilen und binnen 48 Stunden über ein Ringstadium (Abbildung 4) zu Trophozoiten und schließlich zu Schizonten reifen, die wiederum in bis zu 32 Merozoiten zerfallen, welche die Erythrozytenmembran lysieren und im Blutstrom erneut Erythrozyten befallen (Girard et al. 2007, Bousema and Drakeley 2011). Zum Wachsen verdauen die Parasiten das in den Erythrozyten vorhandene Hämoglobin und spalten dieses durch Proteasen in Häm und Aminosäuren. Während die Aminosäuren verwendet werden, wird das toxische Häm durch Dimerisierung inaktiviert. So entsteht das



Malaria-typische bräunliche Pigment Hämozoin (Goldie et al. 1990). Die reiferen Formen, also Trophozoiten und Schizonten, sind nicht im peripheren Blut detektierbar, da sie die Oberflächen der befallenen Erythrozyten so verändern, dass diese aus der Blutbahn in tiefer gelegene Gewebe gelangen. Dieser Vorgang wird Sequestration genannt und wurde erstmals 1890 von Bignami und Bastianelli beschrieben (Sherman et al. 2003). Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie zeigten, dass auf der Oberfläche der Erythrozyten, die mit Trophozoiten oder Schizonten befallen waren, ca. 25 nm große knopfartige Strukturen, die PfEMP-1 Proteine (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1), zu finden waren, die beim Anheften an Endothelzellen und der Sequestration aus dem Blutstrom beteiligt sein sollen (Day et al. 1998, Hayward et al. 1999, Nagao et al. 2000). PfEMP-1 Proteine werden von der Familie der *var*-Gene codiert (Smith et al. 1995, Barry et al. 2007) und können sich an Rezeptoren des Wirtes, wie beispielsweise ICAM-1, einem Leukozyten-Rezeptor, binden (Hasler et al. 1990, Ockenhouse et al. 1991, Hayward et al. 1999) und über diese Bindung den infizierten Erythrozyten an das Endothel heften. Es konnte jedoch auch schon eine erfolgreiche Sequestration ohne die knopfartigen Proteine gezeigt werden, und so ist davon auszugehen, dass weitere Liganden und Rezeptoren bei diesem Prozess von großer Bedeutung sein müssen (Biggs et al. 1990). Es wird vermutet, dass sich die Parasiten durch die Sequestration vor der

Abbildung 4: Ringform im Blutaussstrich.

Quelle: www.vaccineorb.com

Immunantwort des Wirtes schützen, so z.B. vor dem Abbau der befallenen Erythrozyten in der Milz. 2009 wurde von einem Patienten berichtet, splenektomiert und mit *P. falciparum* Malaria infiziert, bei dem sich im peripheren Blut nicht nur die Ringformen, sondern auch reife Trophozoiten, Schizonten und unreife Gametozyten nachweisen ließen (Bachmann et al. 2009). Ein erythrozytärer Kreislauf ist oft asynchron, dauert jedoch 48 Stunden und pro Kreislauf wird jeweils 20-fach amplifiziert (Trampuz et al. 2003). Diese ungeschlechtliche Teilung der asexuellen Stadien ist für die Krankheitssymptomatik der Malaria tropica verantwortlich (Baker 2010). Die mittlere Inkubationszeit bis zum Auftreten der typischen Symptomatik beträgt 11 Tage (6-16 Tage), wobei jedoch gezeigt wurde, dass die Inkubationszeit durch vorherige Infektionen, eingenommene Malariaprophylaxe oder medikamentöse Teilbehandlung in die Länge gezogen werden kann (Taylor and Hoffman 2000, Trampuz et al. 2003). Ein Teil der Merozoiten folgt nicht dem erythrozytären Kreislauf, sondern entwickelt sich zu der sexuellen parasitären Form: den Gametozyten (Abbildung 5). Dabei entwickeln sich alle Merozoiten, die von einem Schizonten ausgehen, entweder zu asexuellen oder zu sexuellen

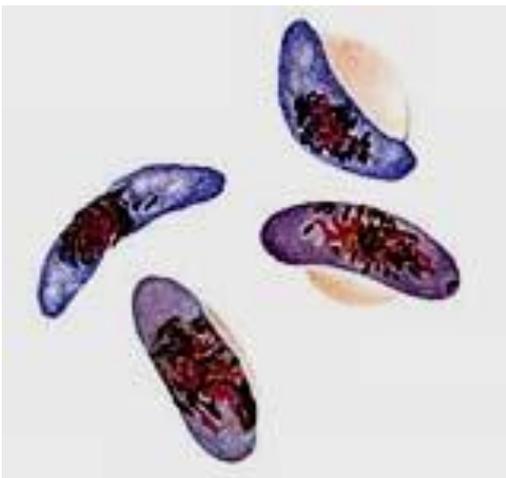


Abbildung 5: Männliche und weibliche Gametozyten im Blutaussstrich.

Quelle: www.scinexx.de

Parasiten (Bruce et al. 1990, Talman et al. 2004); alle sexuellen Parasiten eines Schizonten entwickeln sich entweder zu männlichen oder zu weiblichen Gametozyten (Silvestrini et al. 2000, Smith et al. 2000). Es zeigte sich, dass verhältnismäßig drei- bis viermal mehr weibliche Gametozyten gebildet werden (Robert et al. 1996). Untersuchungen des *P. berghei*, einem nicht humanpathogenen Erreger, haben gezeigt, dass sich Gametozyten auch direkt aus Merozoiten, die aus der Leber freigesetzt wurden, entwickeln können (Killick-Kendrick and Warren 1968). Durchschnittlich entwickelt sich ein Gametozyt pro 156 asexuellen

Erregern (Eichner et al. 2001). Gametozyten bringen keine Symptome hervor (Bousema et al. 2004), sondern sind alleinig für die Transmission der Erkrankung zuständig. Sie durchlaufen fünf morphologische Reifungsstadien, ehe sie nach 7 bis 15 Tagen als reife Gametozyten im peripheren Blut detektierbar sind (Day et al. 1998, Eichner et al. 2001). Wie auch bei den asexuellen Parasiten sequestrieren Gametozyten in Stadien II-IV aus der Blutbahn und reifen zum Teil im Knochenmark (Alano 2007). Eine erfolgreiche Transmission kann erfolgen, wenn eine weibliche Anopheles-Mücke bei einem Blutmahl männliche und weibliche Gametozyten

aufnimmt. Dabei sind für eine erfolgreiche Transmission schon submikroskopische Gametozyten-Dichten ausreichend (Schneider et al. 2007).

1.1.4 Der Lebenszyklus des *Plasmodium falciparum* in der Mücke

Im Darm der Mücke beginnt die Phase der sexuellen Sporogonie (Abbildung 3 Nr. 3) durch die Aufnahme reifer Gametozyten und die plötzlichen Veränderungen der Umgebung. Die Dauer dieser Phase ist stark temperaturabhängig und schwankt zwischen 10 und über 30 Tagen (Lardeux et al. 2008, Paaijmans et al. 2013). Der abrupte Abfall der Temperatur von 2°-5° C durch Übergang vom warmblütigen Menschen auf die wechselwarme Mücke, Anstieg des pH's und Änderung der Xanthurinsäure-Konzentration induzieren die Gametogenese (Nijhout and Carter 1978, Ogwan'g et al. 1993, Billker et al. 1997, Templeton et al. 1998). Innerhalb kurzer Zeit runden die Gametozyten ab, rupturieren und zerstören die Erythrozytenmembran. Der weibliche Gametozyt reift zum Makrogameten. Währenddessen replizieren sich die männlichen Gametozyten, bis sie innerhalb von ca. 15 Minuten ein oktaploides Genom besitzen (Janse et al. 1986) und 8 Mikrogameten, die jeweils eine Geißel tragen, entstehen. Dieser Prozess der Freisetzung der begeißelten und somit beweglichen Mikrogameten aus dem Erythrozyten wird als Exflagellation bezeichnet und kann *in vitro* induziert werden (Rada et al. 2008). Dann erfolgen die Fusion eines Mikrogameten mit dem Makrogameten und die Entwicklung zur Zygote, die sich zur beweglichen Ookinete weiterentwickelt (Janse et al. 1986). Die Ookinete durchdringt die Darmwand der Mücke (Guttery et al. 2012), wo sie sich zur Oozyte weiterentwickelt und massenhaft Sporozoiten bildet. Die Sporozoiten werden in den Darm entleert und gelangen schließlich in die Speicheldrüsen der Mücke, aus denen sie bei einem weiteren Blutmahl in den Menschen injiziert werden können. Für eine erfolgreiche Übertragung von Malaria muss die Mücke demnach mindestens zweimal stechen: Einmal um die Gametozyten aufzunehmen und einmal um die Sporozoiten zu inokulieren.

1.1.5 Pathophysiologie und Krankheitsbild

Eine Infektion mit *P. falciparum* stellt einen medizinischen Notfall dar, der ohne Behandlung zu schweren Komplikationen mit Todesfolge führen kann (Lamparter et al. 2001, Trampuz et al. 2003). Je nach Ausprägung der Symptome kann man dabei nach WHO-Klassifikation (WHO 1990, WHO 2000) zwischen unkomplizierter und schwerwiegender Malaria unterscheiden (Nadjm and Behrens 2012). Bei der unkomplizierten Malaria ähneln die Symptome häufig der einer Grippe mit Fieber, Übelkeit, Kopf- und Gliederschmerzen (Bledsoe 2005). Die

schwerwiegende Malaria hat auch bei Behandlung Mortalitätsraten von bis zu 30% (Clark and Schofield 2000) und ist zum einen in der unbegrenzten Parasitämie und zum anderen in der Fähigkeit, parasitäre Erythrozyten an Kapillaren und postkapillären Venolen zu binden, begründet (Löscher and Burchart 2010). Diese Faktoren sind Besonderheiten der Malaria tropica und bringen Komplikationen mit sich, die nachfolgend beschrieben werden. In der erythrozytären Zyklusphase werden während der Freisetzung von Merozoiten in die Blutbahn auch Toxine freigesetzt, die Zytokinproduktion in Makrophagen und Monozyten stimulieren. Der Tumornekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha) spielt dabei eine wesentliche Rolle. Er ist ein akute-Phase-Protein aktivierendes Zytokin, was bei Entzündungsreaktionen synthetisiert wird. Die Höhe der produzierten Zytokine korreliert dabei mit der Krankheitssymptomatik (Deloron et al. 1994). Ein Hauptsymptom der Malaria ist das periodisch auftretende, oft hohe **Fieber** (>38,5° C), wobei die Periodik bei der Malaria tropica nicht so regelmäßig verläuft wie bei anderen Malaria-Formen und hier Vorsicht vor Fehldiagnosen geboten ist (Löscher and Burchart 2010). Durch die mangelnde Verformbarkeit (Schumacher 1979) der befallenen Erythrozyten und durch die Fähigkeit der Sequestration kann es zu mikrovaskulären Thromben mit Minderperfusion des betroffenen Organs kommen. Besonders bei der gefürchteten zerebralen Malaria kann es von **Bewusstseinsstörungen** über Bewusstlosigkeit und Krämpfen bis hin zum Koma kommen (Wurster et al. 1972). Die Mikrothromben und Superinfektionen können außerdem eine **respiratorische Insuffizienz** bis hin zum ARDS oder **Nierenversagen** auslösen (Eiam-Ong and Sitprija 1998). Durch anaerobe Glykolyse der Parasiten und Zytokin-Wirkung kann es zu **Hypoglykämien** und **Laktatazidose** kommen, was durch ähnliche Symptomatik eine zerebrale Malaria vortäuschen kann (Löscher and Burchart 2010). Ein weiteres häufiges Symptom ist die **Anämie**, die zum einen durch die Zerstörung vieler parasitenbefallener Erythrozyten und zum anderen durch Suppression der Erythropoese durch TNF-Alpha und andere Zytokinen hervorgerufen wird. Auch andere Zellreihen im Knochenmark sind von der Suppression betroffen. So zeigt sich im Blutbild der Patienten häufig eine **Thrombozytopenie**. Eine massive Hämolyse kann zur Schwarzfärbung des Urins und einem Ikterus führen. Häufig wird durch den erhöhten Erythrozyten-Abbau eine **Splenomegalie** beobachtet. Oft treten außerdem **gastrointestinale Beschwerden** in Form von blutigen Durchfällen und Übelkeit auf, die eine Enteritis vortäuschen können (Wernsdorfer and Wernsdorfer 1969, Bledsoe 2005, Löscher and Burchart 2010).

1.1.6 Diagnostik und Therapie

Der Goldstandard in der Malariadiagnostik ist die Untersuchung eines mittels Giemsa angefärbten Blutausstrichs und eines dicken Tropfens unter dem Mikroskop (Giemsa 1904, Kilian et al. 2000, Fancony et al. 2013). Die verschiedenen Malaria-Formen und die Parasitendichte lassen sich aufgrund morphologischer Unterschiede der Plasmodien im Ausstrich unterscheiden (Wernsdorfer and Wernsdorfer 1969, Backmund et al. 1999). Diese Methode ist kostengünstig und gut im Feld durchführbar, ist jedoch abhängig von der Erfahrung des Untersuchers und büßt so an Sensitivität ein. In den letzten Jahren wurden auch immer mehr Schnelltests zur Malariadiagnostik entwickelt, die ähnliche Ergebnisse wie die Mikroskopie liefern, jedoch von verschiedenen Faktoren wie Transmissionsrate, Temperatur und Luftfeuchtigkeit abhängig sind (Hopkins et al. 2008) und falsche positive Ergebnisse liefern können, wenn noch Antigen aus vorangegangenen Infektionen im menschlichen Körper vorhanden sind (Kyabayinze et al. 2008). Die WHO empfiehlt daher Schnelltests nur zusätzlich zur Mikroskopie zu verwenden und diese nicht zu ersetzen. Eine weitere Methode ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die am sensitivsten ist und auch Infektionen mit geringer Parasitendichte zuverlässig detektiert (Snounou et al. 1993, Tham et al. 1999, Mens et al. 2007), jedoch zeitaufwändig und teuer ist und daher in der Standarddiagnostik nur eine untergeordnete Rolle spielt (Fancony et al. 2013).

Für die Therapie der *Malaria tropica* stehen unterschiedliche Medikamente zur Verfügung. Zunehmende Resistenzentwicklung der Erreger stellt jedoch ein wachsendes Problem dar (Abbildung 1). Zur Behandlung der unkomplizierten Malaria empfiehlt die WHO (WHO 2010) eine 3-tägige Kombinationstherapie mit einem Artemisinin-Kombinationspräparat (ACT) wie z.B. Artemether und Lumefantrin oder Dihydroartemisinin und Piperaquin. Die Kombination zweier Wirkstoffe soll dabei der Resistenzentwicklung entgegenwirken. In beiden Kombinationen sind Artemisinine enthalten, ein halbsynthetisches Arzneimittel aus der Pflanze *Artemisia annua* (Einjähriger Beifuß), das in der traditionellen chinesischen Medizin schon seit Jahrhunderten gegen Malaria eingesetzt wird. Bei Zeichen der schwerwiegenden Malaria ist eine stationäre Aufnahme des Patienten auf der Überwachungsstation notwendig. Medikamentös werden bevorzugt Artesunat, ein Artemisininderivat, oder Chinin intravenös eingesetzt, wobei Artesunat dem Chinin überlegen ist. Es wurden jedoch gehäuft Komplikationen in Form von hämolytischen Anämien nach Therapie beobachtet (Rolling et al. 2012, Sinclair et al. 2012, Rolling et al. 2013).

1.1.7 Geschichte der Bekämpfung von Malaria

In den Vereinigten Staaten wurde von 1947 an das *National Eradication Program* mit dem Ziel der Ausrottung der Malaria in den USA durchgeführt. Der erfolgreiche Ausgang des Programmes ermutigte, weshalb die WHO 1955 Grundzüge der Strategie übernahm und das *Global Eradication of Malaria Program* (WHO 1959) entwarf, das bis 1969 lief. Das Programm verzeichnete zunächst Erfolge und Malaria wurde aus zahlreichen Ländern in gemäßigten Klimazone, wie z.B. in Europa und Australien, erfolgreich ausgerottet (Carter and Mendis 2002, Lopez et al. 2006), weniger Erfolge zeigte die Aktion allerdings durch zunehmende DDT-Resistenzen und Fehlmanagement in den zumeist betroffenen tropischen Ländern (Packard 1997, Najera et al. 2011). 1972 wurde das Programm weltweit offiziell als gescheitert beurteilt. Strategie war, die Wohnungswände 2-mal jährlich mit Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) zu besprühen, da die Mücken sich nach einem Stich für gewöhnlich auf diesen niederließen. DDT war ein seit Anfang der 40er-Jahre zahlreich eingesetztes Insektizid, das sich jedoch am Ende der Nahrungskette in Mensch und Tier anreichert und in den Verdacht geriet kanzerogen zu wirken. Der Gebrauch wurde schließlich 1977 in Deutschland verboten und wird heute nur sehr gezielt und nicht flächendeckend eingesetzt (Perkow and Ploss 2007). In den darauffolgenden Jahren änderte sich die Strategie von Eradikation zu Kontrolle der Malaria, die im Wesentlichen auf frühzeitiger Diagnose und Behandlung basierte (WHO Malaria control strategies 1978). Seit dem Gates Malaria Forum 2007, initiiert von der Bill & Melinda Gates Foundation, entwickeln die WHO, die Roll Back Malaria Partnership (RBM) und viele weitere Institutionen neue Pläne zur Eradikation (Tanner and de Savigny 2008). Die Plasmodien Erreger werden durch mehr als 30 Spezies der Anopheles-Mücken mit unterschiedlichen Brütungseigenschaften und Gewohnheiten übertragen, was in unterschiedlichen Krankheitsverläufen, Zielpopulationen und epidemiologischen Umgebungen resultiert. Auch Finanzierung, politische Unterstützung der betroffenen Staaten und unterdurchschnittlich ausgebildete Gesundheitssysteme stellen eine große Herausforderung für die Entwicklung von Strategien dar (Alonso et al. 2011). Um den derzeitigen Wissensstand zusammenzufassen, Wissenlücken aufzudecken und neue Ideen für die Eradikation zu entwickeln, wurden 2008 die Malaria Eradication Research Agenda (malEra Consultative Group on Monitoring and Surveillance) durch finanzielle Mittel der Bill & Melinda Gates Foundation und anschließend 2011 die Malaria Eradication Scientific Alliance (MESA) gegründet.

1.2 Gametozyten

1.2.1 Morphologie und Biologie

Die sexuelle Erregerform des *P. falciparum* sind die Gametozyten. Sie sind nicht für die Krankheitssymptomatik eines Infizierten verantwortlich, sondern alleinig für Transmission der Erkrankung (Baker 2010). Morphologisch lassen sich die Gametozyten in 5 Stadien unterteilen (Abbildung 5) (Hawking et al. 1971). Die charakteristische Sichelform der Gametozyten hat dem *P. falciparum* seinen Namen gegeben, so leitet sich das Wort „*falciparum*“ vom lateinischen *Falx* für Sichel ab. Die Form kommt durch ein mikrotubuläres Zytoskelett und einer den Gametozyten umgebenden Doppelmembran zu Stande (Meszoely et al. 1987, Talman et al. 2004).

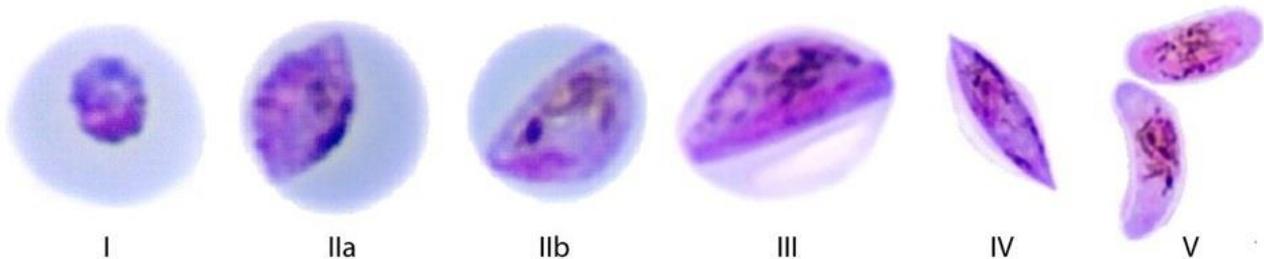


Abbildung 6: Reifungsstadien der Gametozyten. Quelle: Modifiziert von Bousema and Drakeley 2011.

Während der Reifung sequestrieren die Gametozyten der Stadien II-IV aus dem Blutstrom in das Knochenmark, um dort in Schutz vor Elimination durch die Milz weiter zu reifen (Smalley et al. 1981, Bachmann et al. 2009). Ab Stadium IV (Abbildung 6) lassen sich männliche und weibliche Gametozyten morphologisch unterscheiden. Weibliche Gametozyten weisen einen kleinen Nucleus, mit einem Nucleolus und konzentriertem Pigment auf. Männliche Gametozyten hingegen haben einen größeren Nucleus und das Pigment ist diffuser verteilt (Bousema and Drakeley 2011). Reife Gametozyten verbleiben in der G₀-Phase (Sinden et al. 1996), in der die Replikation eingestellt ist und sich die Nucleinsäuresynthese auf Synthese von Ribonucleinsäuren (RNA) beschränkt (Raabe et al. 2009). Sie bleiben bis zur Aufnahme durch die Mücke im Zellarrest. Der bisher früheste bekannte Marker für Gametozytogenese ist der Nachweis des Pfs16 Proteins, welches bis zur Gametozytenaktivierung auf der Membran der parasitophoren Vakuole zu finden ist (Bruce et al. 1994, Schneider et al. 2004, Baker 2010). Die Gametozyten präparieren sich schon *in vivo* für die Weiterentwicklung nach Aufnahme durch

die Mücke, und Transkripte von dafür notwendigen Proteinen wie Pfs25 und Pfs28 werden synthetisiert, ihre Translation aber inhibiert (Hall et al. 2005). Die Pfs25-messengerRNA (mRNA) ist nur in weiblichen Stadium V Gametozyten nachweisbar (Schneider et al. 2004, Pritsch et al. 2012, Delves et al. 2013). Transkriptom-Analysen zeigten, dass 250-300 spezielle Gene während der Gametozytenreifung auf messenger-RNA (mRNA) Ebene hochreguliert werden (Silvestrini et al. 2005, Young et al. 2005), wobei viele Gene speziell entweder bei weiblichen oder bei männlichen Gametozyten hochreguliert sind (Khan et al. 2005). Die Gametozytogenese findet nicht bei allen Individuen (Talman et al. 2004) statt, und ist von vielen Faktoren abhängig: In Studien konnte gezeigt werden, dass Gametozytendichten in Kindern größer sind als in Erwachsenen (Dunyo et al. 2006), dass die Produktion am Anfang der Transmissionssaison höher ist (Ouedraogo et al. 2008) und dass sich das Vorhandensein von Retikulozyten und jungen Erythrozyten sich auf sie positiv auswirkt (Trager 2005). Ein weiterer Stimulus für die Gametozytogenese ist Erythropoetin, das bei anämischen Patienten vermehrt gebildet wird (Drakeley et al. 1999, Reece et al. 2005). Gametozyten treten 7 bis 15 Tage nach der initialen asexuellen Welle auf (Day et al. 1998, Eichner et al. 2001) und zirkulieren im Durchschnitt zwischen 4,6 und 6,5 Tagen im peripheren Blut (Bousema et al. 2010), wobei die tatsächliche Lebensdauer von der Neusynthese von Gametozyten aus asexuellen Stadien abhängt. Es hat sich gezeigt, dass sie ohne medikamentöse Artemisinin-Kombinations-Therapie durchschnittlich 55 Tage lang nachgewiesen werden konnten (Bousema et al. 2010).

1.2.2 Moderne molekulare Detektionstechniken

Die Bildung und das Tragen von Gametozyten bestimmen das infektiöse Reservoir der Malaria. Bedingt durch die geringe Anzahl von Gametozyten werden sie häufig unter dem Mikroskop nicht detektiert (Babiker et al. 2008). Es hat sich jedoch gezeigt, dass für eine erfolgreiche Transmission der Malaria tropica vom Menschen zur Mücke submikroskopische Gametozytendichten (< 1 Gametozyt/ μl) ausreichend sind (Schneider et al. 2007). In der Routine-Diagnostik werden durchschnittlich bis zu 1 μl dicke Tropfen unter dem Mikroskop analysiert (100 Gesichtsfelder bei 100-facher Vergrößerung) (Greenwood and Armstrong 1991, Bejon et al. 2006), dabei können Dichten unter 20-50 Gametozyten/ μl verfehlt werden (Moody 2002, Bousema and Drakeley 2011). Aufgrund dieser Tatsachen war es notwendig, neue Detektionstechniken als Alternative zum Mikroskop zu entwickeln:

Es stehen drei moderne molekulare Techniken zur Verfügung, bei denen man sich die Biologie der Gametozyten zu nutzen macht, in dem man die spezifisch in der Gametozytogenese gebildete messenger-RNA (mRNA) nachweist (Babiker et al. 1999, Schneider et al. 2006). Der Nachweis von DNA würde keine Unterscheidung zwischen asexuellen und sexuellen Stadien erlauben, da diese das gleiche Genom tragen. Die Bildung zahlreicher Transskripte beschränkt sich jedoch auf die Gametozyten durch während ihrer Reifung hochregulierte Gene (Silvestrini et al. 2005, Young et al. 2005). Zwei sensitive Methoden sind die „*reverse-Transcriptase-Polymerase-Chainreaction*“ (RT-PCR) und die „*nucleic-acid-sequenced-based amplification*“ (NASBA), die ein Detektionslimit von 0,02 Gametozyten/µl aufweisen (Ciceron et al. 1999, Schoone et al. 2000, Schneider et al. 2005). Im direkten Vergleich hat sich die NASBA im Vergleich zur RT-PCR jedoch als praktisch handhabbarer erwiesen (Schneider et al. 2005). Das direkte Einsetzen von RNA, ohne dass das Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA) notwendig ist, eine schnelle und effektive RNA-Extraktion und ein isothermaler Amplifikationsprozess begrenzen die Analysezeit inklusive Extraktion auf ca. 4 Stunden (Boom et al. 1990, Schneider et al. 2005). Eine dritte Technik ist die „*reverse-Transcriptase-loop-mediated isothermal amplification*“ (RT-LAMP), die zwar durch einen isothermalen Amplifikationsprozess auch kürzere Analysezeiten mit sich bringt, jedoch ebenso wie die RT-PCR das Umschreiben der RNA in cDNA erfordert (Buates et al. 2010).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Nachdem der Fokus im Umgang mit Malaria über 35 Jahre lang auf Kontrolle durch schnelle Diagnose und Behandlung lag, entstehen seit 2007 erneut Pläne zur weltweiten Ausrottung der Erkrankung (Mendis et al. 2009). Damit dies gelingen und die Transmission durchbrochen werden kann, ist es wichtig, das menschliche infektiöse Reservoir einzuschätzen (Bousema and Drakeley 2011). In groß angelegten Prävalenzstudien in endemischen Malariagebieten möchte man so herausfinden, wie viele Menschen Träger von reifen Gametozyten sind, um dort gezielt zu intervenieren. Populationsbezogene Prävalenzstudien existieren bisher kaum (Babiker et al. 2008). Da schon submikroskopische Level an Gametozyten für die Transmission vom Menschen zur Mücke ausreichend sind, braucht es hierfür moderne, molekulare Detektionstechniken (Schneider et al. 2007). Da die sexuelle Parasitenform jedoch lediglich für die Transmission verantwortlich ist und keine Krankheitssymptomatik verursacht, gibt es zahlreiche asymptomatische Gametozytenträger. Dies wird durch verschiedene Faktoren wie Teilimmunitäten, Infektionen mit sehr geringer Parasitendichte oder durch die Behandlung der

Malaria mit Medikamenten, die zwar die asexuelle Parasitenform abtöten, die sexuellen jedoch nicht, begünstigt. Das einzige Malaria Medikament, das derzeit auf dem Markt ist und Gametozyten ausreichend abtötet, ist Primaquin (Shekalaghe et al. 2007). Der klinische Gebrauch von Primaquin ist durch seine potentielle hämatologische Toxizität, die besonders bei Patienten mit angeborenem Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel zur Ausprägung kommt, jedoch limitiert (Reeve et al. 1992). Alle weiteren Malaria Medikamente haben unzureichende Wirkung auf reife Gametozyten, weshalb diese noch einige Wochen nach Malaria-Behandlung im Blut nachgewiesen werden können (Bousema et al. 2006, Okell et al. 2008). Bisherige Studien über die Anzahl asymptomatischer Gametozytenträger in endemischen Malariagebieten mit verschiedenen hohen Transmissionsrate ergaben mittels molekularer Detektionsverfahren Prävalenzen zwischen 15 und 70 % (Ouedraogo et al. 2007, Shekalaghe et al. 2007). Um das infektiöse Reservoir in zukünftigen Prävalenzstudien ermitteln zu können, müssten also auch potentiell gesunde Menschen auf das Vorhandensein von Gametozyten getestet werden. Bisher sind dafür nur Verfahren bekannt, bei denen eine Blutentnahme entweder aus der Vene oder aus der Fingerbeere erforderlich ist. Jeder invasive Eingriff bringt jedoch die Gefahr von Infektionen mit sich, gerade bei den häufig von Malaria betroffenen Immungeschwächten, Kleinkindern und Schwangeren. In vielen Kulturen bricht diese Art des invasiven Eingriffs Tabus und gerade bei mehrfachen Blutentnahmen ist daher die Komplianz gering. In vorangegangenen Studien konnte für DNA von asexuellen Stadien ein signifikanter Nachweis in Speichel und eine positive Korrelation in Urin im Vergleich zur Mikroskopie nachgewiesen werden (Mharakurwa et al. 2006, Nwakanma et al. 2009). Der Nachweis von Gametozyten-spezifischer mRNA wurde bisher noch nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher Urin, Speichel und Mundschleimhautproben auf das Vorhandensein von Gametozyten-spezifischer-mRNA zu untersuchen und bezüglich der Sensitivität mit Blutproben zu vergleichen, um ein möglichst nicht-invasives Verfahren zur Erfassung des infektiösen Reservoirs zu entwickeln. Ein weiteres Ziel war es, Fingerprick-Blutproben und venöse Blutproben bezüglich ihres mRNA-Gehaltes quantitativ zu vergleichen, um das bestmögliche Patientenmaterial für zukünftige Prävalenzstudien im Feld zu bestimmen.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patientenakquise und Proben

2.1.1 Studiengebiet Äthiopien

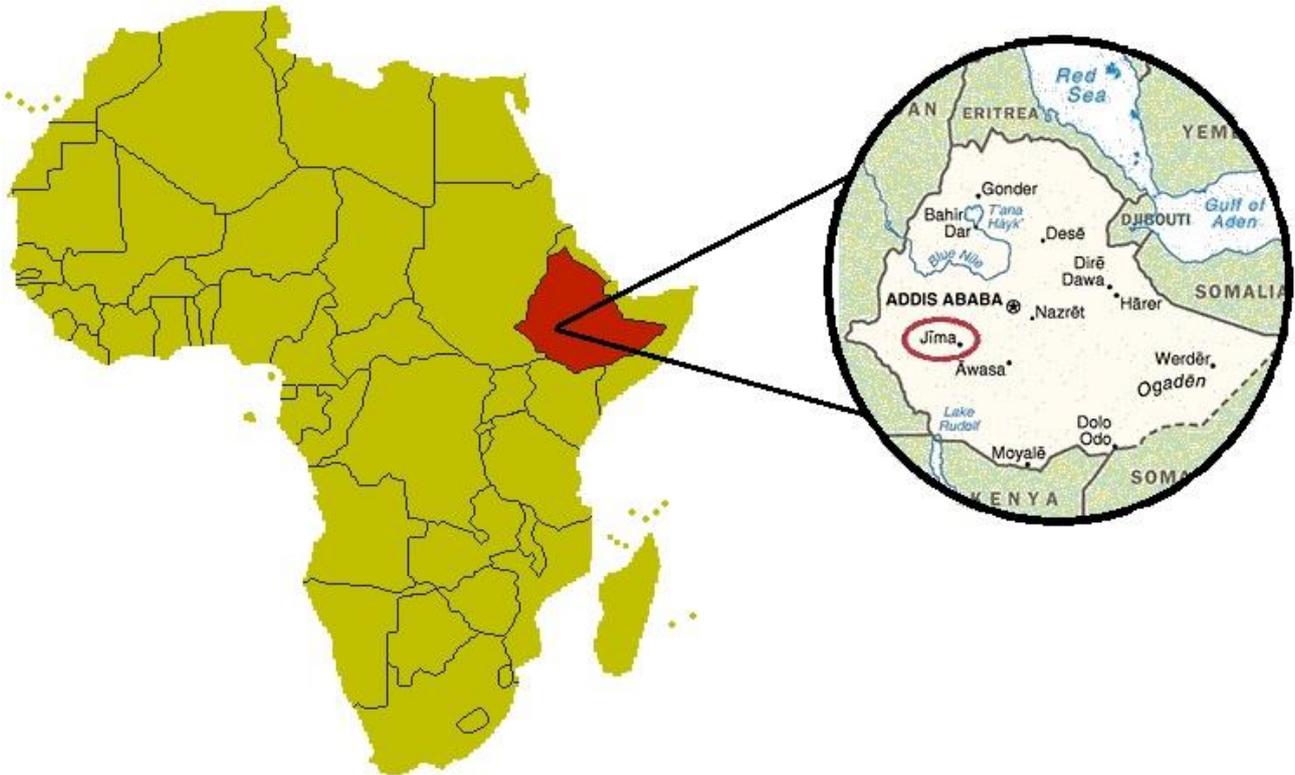


Abbildung 7: Studiengebiet Jimma, südwestlich der Hauptstadt Addis Abeba.
Quellen: http://www.dahw.de/media/image/6438.aethiopien_arsi_dahw.jpg und <http://www.flaggen-server.de/afrika1/aethiopien.php>

Das Studiengebiet liegt im Südwesten Äthiopiens nahe der Stadt Jimma (Abbildung 7), welche mit ca. 135.000 Einwohnern zu den größten Städten des westlichen Äthiopiens zählt. Jimma liegt ca. 250km von der Hauptstadt Addis Abeba entfernt und ist Hauptstadt der Region Oromiyaa (auch Oromia). Äthiopien besteht aus 9 Verwaltungsregionen, von denen Oromiyaa mit der Volksgruppe Oromo die größte bildet. Es ist eines der höchstgelegenen Länder Afrikas und hat drei Klimazonen. Die Region um Jimma liegt auf 1650m Höhe, gehört der gemäßigten Klimazone an und ist Malaria-Endemiegebiet. Am häufigsten ist das Auftreten von *Plasmodium falciparum*, gefolgt von *Plasmodium vivax* Infektionen. Im Hochland gibt es zwei Regenzeiten zwischen Februar und April sowie von Juni bis September. Die meisten Malariafälle treten nach

der Hauptregenzeit zwischen September und Dezember auf. Die Patientenrekrutierung hat im September 2012 in dem Health-Center in K'Och'e, einem kleinen Dorf 30 km nordwestlich Jimmas, stattgefunden.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Erfüllung folgender Kriterien war für den Einschluss in die Studie erforderlich:

- Patientenalter >14 Jahre
- Mikroskopisch gesicherte Monoinfektion mit *Plasmodium falciparum*
- Parasitämie bis zu 100.000 asexuellen Parasiten pro μL

Bei folgenden Kriterien erfolgte ein Ausschluss aus der Studie:

- Schwerwiegende Malaria
- Schwangerschaft

2.1.3 Rekrutierungsablauf

Von Patienten, die anamnestisch eine Malaria typische Symptomatik zeigten oder die von Fieber in den letzten Tagen berichteten, wurde ein Blutausschlag und ein dicker Tropfen aus der Fingerbeere entnommen, die mittels Giemsa angefärbt und mikroskopisch untersucht wurden. Bestätigte sich unter dem Mikroskop eine Infektion mit *Plasmodium falciparum*, so wurden die Patienten, sofern sie die Kriterien erfüllten, über die Studie in ihrer Sprache aufgeklärt und gefragt, ob sie als Proband teilnehmen würden. Nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung und Ausfüllen eines Fragebogens (Anhänge 9.1, 9.2 und 9.3) wurde den Patienten eine Blutprobe aus der Vene des Armes entnommen und eine Kapillarblutprobe aus der Fingerbeere. Anschließend wurden die Patienten gebeten, eine Urin- und Speichelprobe abzugeben, und zwei Mundschleimhautabstriche wurden von der Innenseite der Wange entnommen.

2.1.4 Ethische Gesichtspunkte

Jeder Patient wurde mündlich über die Studie aufgeklärt und hat zusätzlich einen schriftlichen Aufklärungsbogen über den Hintergrund der Studie erhalten (Anhänge 9.1 und 9.2). Die Aufklärung erfolgte in der Sprache des Patienten durch einen Dolmetscher. Die Teilnahme oder Nichtteilnahme an der Studie hatte keinerlei Auswirkungen auf Qualität und Durchführung der Diagnose und Behandlung. Den Patienten wurde Bedenkzeit gelassen und sie hatten die

Möglichkeit Fragen zu stellen, die mit Hilfe des Dolmetschers beantwortet wurden. Bei minderjährigen Patienten <18 Jahren musste zusätzlich ein Erziehungsberechtigter in die Teilnahme einwilligen. Ethische Genehmigungen wurden sowohl durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in Deutschland, als auch durch das „Ethical Review Board of Jimma University“ des „College of Public Health and Medical Sciences“ erhalten. Die Bestätigungen der Ethikkommissionen von Deutschland und Äthiopien sind dieser Arbeit als Anhang beigefügt (Anhänge 9.4 und 9.5).

2.1.5 Bestimmung der Parasitendichte

Zur Bestimmung der Parasitämie, also der Parasiten-Dichte asexueller Stadien im Blut, wurde je ein dicker Blutropfen getrocknet, 20 Minuten mittels 10%iger Giemsa-Lösung angefärbt und anschließend unter dem Mikroskop untersucht. Die asexuellen Stadien wurden dann im Verhältnis zu 200 Leukozyten ausgezählt. Dabei wurde von einem Leukozytennormwert von 8.000/ μ L ausgegangen. Die Parasitämie wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$\text{Gezählte Parasitenzahl} \times \frac{8.000 \frac{\text{Leukozyten}}{\mu\text{L}}}{200 \text{ Leukozyten}} = \text{Parasitämie}/\mu\text{L}$$

2.1.6 Probenentnahme und Lagerung

Von jedem in die Studie eingeschlossenem Patienten wurden folgende Proben entnommen:

- 2,5 ml EDTA Blut aus der Vene
- 25 μ l Fingerprick Blut
- Urin
- Speichel
- 2 Mundschleimhautabstriche

Alle Proben wurden mit der Identifikationsnummer des Patienten pseudonymisiert versehen. Das venöse Blut, Urin und der Speichel wurden in 100 μ l Mengen auf jeweils Whatman 3MM Chromatographie Filterpapier (Pritsch et al. 2012) pipettiert (Abbildung 8). Auf ein Filterpapier wurden 25 μ l Fingerprick Blut pipettiert. Einer der Mundschleimhautabstriche wurde direkt nach Entnahme auf ein Filterpapier gestrichen, der andere Abstrich blieb unverändert. Das überflüssige Patientenmaterial wurde direkt entsorgt. Die Filterpapiere trockneten 3-5 Stunden, bevor sie jeweils in einer kleinen Plastiktüte verpackt und anschließend bei -30° C

gelagert wurden. Alle Proben wurden innerhalb eines Monats in Deutschland weiterverarbeitet.

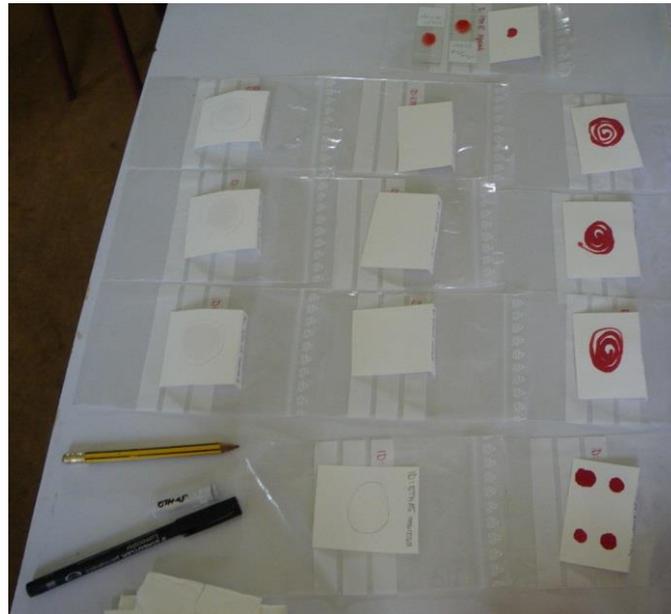


Abbildung 8: Patientenproben auf Filterpapier. K. Kast

2.2 Material

2.2.1 Nukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Oligonukleotid	Sequenz 5' zu 3'
Pfs16.F WT	5'-AGT TCT TCA GGT GCC TCT CTT CA-3'
Pfs16.R WT	5'-T7-AGC TAG CTG AGT TTC TAA AGG GCA-3'
Pfs16.F Q	5'-CAA CAT GAA TAT TCG AAA GTT CAT ACC-3'
Pfs16.R Q	5'-AGA ATC ATC TCC TTC GTC TTC TTC-3'
Pfs16 probe	5'-6-FAM-CGATCG-GCT GTT GGA CCT AAT CTA ATC TAG GTG GA-CGATCG-Dabsyl-3'
Pfs25.F WT	5'-GAC TGT AAA TAA ACC ATG TGG AGA-3'
Pfs25.R WT	5'-T7-CAT TTA CCG TTA CCA CAA GTT A-3'
Pfs25.F Q	5'-GAA TTC GAC TGT AAA TAA ACC ATG TGG AGA-3'
Pfs25.R Q	5'-AAG CTT CAT TTA CCG TTA CCA CAA GTT A-3'

Pfs25 probe	5'-Texas Red-CGATCG-CCC GTT TCA TAC GCT TGT AA-CGATCG – Dabsyl-3'
18S.F WT	5'-GTC ATC TTT CGA GGT GAC TT-3'
18S.R WT	5'-AAC TTT CTC GCT TGC GCG AA-3'
18S probe	5'-6-FAM-CGATCG-GAG AAA TCA AAG TCT TTG GG-CGATCG- Dabsyl-3'
T7-Promotor	5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AAG G-3'
M13.F	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13.R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

Tabelle 1: Liste der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide

2.2.2 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Kit	Verwendung	Firma
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Bioanalyser Analyse	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien
AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit	<i>In vitro</i> -Transkription	Epicentre@ Biotechnologies, Madison, Wisconsin
Gentra Puregene Blood Kit	DNA-Extraktion	Qiagen, Venlo, Niederlande
NucliSENS EasyQ® Basic Kit	QT-NASBA	BioMérieux, Lyon, Frankreich
NucliSENS Magnetische Extraktions Reagenzien	RNA-Extraktion	BioMérieux, Lyon, Frankreich
QIAGEN PCR Purification Kit	PCR-Aufreinigung	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmid-Aufreinigung	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAquick Gel Extraction Kit	Gel-Aufreinigung	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy MinElute cleanup Kit	RNA-Aufreinigung	Qiagen, Venlo, Niederlande
TOPO® TA Cloning® Kits	Klonierung	Invitrogen, Karlsbad, Kalifornien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Kits mit Verwendungszweck

2.3.3 Chemikalien und Labormaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Labormaterialien sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Material	Firma
100 bp, 50 bp, 1kb Leiter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
dNTP's	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Ethidiumbromid	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Filterpapier Whatman 3MM	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB Flüssigkultur	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
LB Medium	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Magnesiumchlorid	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
RNase freie Pipettenspitzen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
RNase freies H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNase ZAP	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
RPMI-Medium Puffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
TAE Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Labormaterialien

2.2.4 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Gerät	Firma
BioAnalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien
Elektroporator	Sciencz Biotechnology, Ningbo, China
Foto Drucker P93D	Mitsubishi, Minato, Japan
Gelelektrophorese	Peqlab, Erlangen, Deutschland

Inkubator Cytoperm2	Heraeus, Hanau, Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
NucliSENS EasyQ® System	BioMérieux, Lyon, Frankreich
NucliSENS® miniMAG®	BioMérieux, Lyon, Frankreich
pH-Meter PB-11	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator Multitron	INFORS HT, Einsbach, Deutschland
Sterilbank HERA safe KS12	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Thermocycler PCR GeneAmp PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Thermomixer comfort	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima L-90K	Beckman Coulter, Pasadena, Kalifornien
Vortex Tischschüttler MS2	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Zentrifugen 5810R, 5417C, 5417R, Sorvall Super T21	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Geräte

2.3 Methoden

2.3.1 Herstellung von Verdünnungsreihen

Um die Patientenproben bezüglich ihres RNA Gehaltes zu quantifizieren, wurden für die Zielsequenzen Pfs16 und Pfs25 Verdünnungsreihen von künstlich hergestellter RNA angefertigt. Pro Amplifikationsprozess mittels QT-NASBA lief eine Verdünnungsreihe als Standard mit.

2.3.1.1 *In vitro*-Kultur nach Trager und Jenson

2.3.1.1.1 Prinzip

Das Anlegen einer *in vitro*-Kultur dient dazu, Plasmodien außerhalb des menschlichen Körpers anzuzüchten und somit wachsen zu lassen. Die erste erfolgreiche, kontinuierliche Anzucht von *Plasmodium falciparum* gelang 1976 Trager und Jenson (Trager and Jensen 1976). Bei der

Kultivierung werden infizierte Erythrozyten bei 37°C in einer Kulturschale mit Nährmedium und Plasma oder Serum inkubiert (Basco 2003). Während der Inkubation werden die Zellen mit einem speziellen, stickstoffhaltigen Gasmisch begast (Trigg 1985), oder alternativ wird in den Inkubator eine Kerze gestellt, die Sauerstoff verbraucht und Kohlenstoffdioxid produziert. Bei einem Kohlenstoffdioxid-Gehalt von erforderlichen 5% der Umgebungsluft erlischt die Kerze und die Kultur kann wachsen. Die Parasitendichten können mittels Blutausschrieb unter dem Mikroskop ermittelt werden und durch Aufteilen der Kultur und Waschen mit neuem Nährmedium kontrolliert werden.

2.3.1.1.2 Durchführung

Für die Herstellung der Verdünnungsreihe war es notwendig, die gewünschten DNA-Abschnitte, die für die Zielsequenzen Pfs16 und Pfs25 codieren, aus dem Genom einer *Plasmodium falciparum in vitro*-Kultur zu gewinnen. Hierfür wurden Parasiten aus dem K1 Stamm gewählt, welche in sterilem, gefiltertem Nährmedium wachsen gelassen wurden. Das Nährmedium bestand aus RPMI-1640 Medium, welches mit 25 mM HEPES, 25 mM Natriumbicarbonaten, 2% D-Glucose und 10% humanem Serum der Blutgruppe AB ergänzt wurde. Das Medium hatte einen pH-Wert von 7,4 und wurde mit zusätzlichen Erythrozyten versehen, um einen Hämatokrit von 5% aufrechtzuerhalten. Zweimal täglich wurde der Kultur neues Nährmedium hinzugefügt, um das fortschreitende Wachsen zu ermöglichen. Die Kultur wurde mit einem Gasmisch aus 3 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid und 92 % Stickstoff begast (Trager and Jensen 1976, Fivelman et al. 2007). Die Kulturen wurden bei einer Parasitämie von ca. 10 % geerntet. 100 ml Endvolumen wurden bei 1700 g für 10 Minuten zentrifugiert; das entstandene Pellet wurde in 10 ml purem und erwärmtem RPMI Medium resuspendiert. Das verdünnte Pellet wurde anschließend durch MACS® Kolumnen für Zellseparation (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gefiltert (Ribaut et al. 2008). Dieser Vorgang ergab 250 µL einer angereicherten Zelllösung, die für die Weiterverarbeitung genutzt werden konnte.

2.3.1.2 DNA-Extraktion

2.3.1.2.1 Prinzip

Um die DNA aus der *in vitro*-Kultur weiterverarbeiten zu können, muss sie zunächst aus dem Medium isoliert, also extrahiert werden. Dies kann nach verschiedenen Methoden erfolgen, jedoch basieren diese dabei auf denselben Prinzipien. Zunächst müssen die Zellen physikalisch

oder chemisch lysiert werden, damit der Zellinhalt zugänglich wird und unerwünschte Zellbestandteile getrennt werden. Zur Trennung wird Chloroform hinzugegeben, wobei die Lösung verschiedene Phasen bildet. Während sich Proteine, Polysaccharid-Komplexe und fettlösliche Substanzen in Zwischen- und Unterphase sammeln, befindet sich die DNA in Wasser gelöst an der Oberphase. Anschließend kann die Lösung durch Ribonukleasen (RNasen) von RNA gereinigt und die DNA mittels einer Alkohol-Fällung gewonnen werden. Nukleinsäuren sind negativ geladen und daher in Wasser gut löslich. In apolaren Lösungsmitteln, wie 70%-80%igem Ethanol oder Isopropanol, sind sie weniger gut löslich und können ausgefällt werden. Die DNA muss schließlich durch eine Waschlösung gereinigt und in Puffer oder Wasser eluiert werden.

2.3.1.2.2 Durchführung

Um die *Plasmodien*-DNA der *in vitro*-Kultur zu isolieren, wurde die DNA-Extraktion mit Hilfe des Genra Puregene Blood Kits (Qiagen, Venlo, Niederlande) wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt. Je nachdem, wie viele Zellen eingesetzt werden, können dadurch 2-300µg DNA gewonnen werden.

2.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

2.3.1.3.1 Prinzip

Kary Mullis entwickelte 1983 die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die es ermöglicht, *in vitro* DNA in großen Mengen zu vervielfältigen (Mullis 1990), damit diese in mehreren Schritten weiterverarbeitet werden kann. Dabei entstehen innerhalb von drei bis vier Stunden über eine Millionen Amplifikate (Saiki et al. 1988). Für die Methode muss die Sequenz des zu amplifizierenden Genabschnittes bekannt sein. Ist die Sequenz bekannt, kann der gewünschte DNA Abschnitt durch ca. 20 Basenpaar (bp) lange komplementäre Oligonukleotide, auch Primer genannt, flankiert werden und ermöglicht somit eine selektive Amplifikation dieses Abschnittes. Die zwei je einen Strang flankierenden Primer müssen zuvor hergestellt werden. Die in die Reaktion eingesetzte Doppelstrang-DNA wird in jedem Zyklus verdoppelt und dient im darauffolgenden Zyklus erneut als Vorlage. Daraus ergibt sich ein exponentieller Anstieg der DNA Abschnitte.

Ein Zyklus ergibt sich aus 3 Phasen, die nacheinander ablaufen:

1. Denaturierung
2. Hybridisierung (auch Annealing)
3. Amplifikation (auch Elongation)

In der ersten Phase (Denaturierung) wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt, was die Auftrennung der Doppelstränge zu Einzelsträngen zur Folge hat. Dies ist notwendig, damit in der zweiten Phase (Hybridisierung) die Primer nach rascher Abkühlung des Reaktionsansatzes auf 48°-60°C an die zu ihrer Sequenz komplementären DNA binden können. Die Temperatur ist dabei abhängig von der Sequenz der gewählten Primer und wird zuvor berechnet. In der dritten Phase (Amplifikation) erfolgt die Amplifikation bei 72°C durch das Enzym DNA-Polymerase von 5' nach 3'.

Damit die Reaktion stattfinden kann sind folgende Komponenten notwendig:

- Die 4 Desoxyribonukleosidtriphosphate: dATP (A), dTTP (T), dCTP (C) und dGTP (G)
- Pufferlösung
- Mg²⁺ Ionen
- DNA-Polymerase
- Forward und Reverse Primer
- Die zu amplifizierende DNA

2.3.1.3.1 Durchführung

Die aus der *in vitro*-Kultur extrahierte DNA wurde in die PCR eingesetzt, um die Genabschnitte für die Herstellung der Verdünnungsreihen in großen Mengen zu amplifizieren. Für die Zielabschnitt Pfs16 und Pfs25 wurde dafür jeweils ein 7-facher PCR Ansatz gewählt.

Um die gewünschten Genabschnitte für die Herstellung der Verdünnungsreihen aus der zuvor extrahierten DNA zu erhalten, wurden die Primer wie zuvor beschrieben (Schneider 2004) verwendet. Die Primer für Pfs16 amplifizieren eine 481 bp und die für Pfs25 eine 156 bp Region.

Für diese und darauffolgende PCR-Ansätze wurden der Reaktionsansatz (Tabelle 5) und die Reaktionsbedingungen (Tabelle 6), wie folgt, verwendet:

Substanz	Konzentration	Volumen
Forward Primer	20 pmol/μl	1 μL
Reverse Primer	20 pmol/μl	1 μL
10x Puffer		5 μL
Mg ²⁺ -Lösung	25 mM	8 μL
10x dNTP's	10 mM je dNTP	2 μL
Aqua bidest.		30,6 μL
DNA		2 μL
Taq Polymerase	5U/μl	<u>0,4 μL</u> 50 μL

Tabelle 5: Standardreaktionsansatz der PCR

Dauer	Temperatur	Ziel
5:00 min.	95°C	Initiale Denaturierung
0:45 min	95°C	Denaturierung
0:45 min	53°C-58°C	Primer-Hybridisierung
2:00 min	72°C	Amplifikation
10:00 min	72°C	Finale Amplifikation

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der PCR

2.3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

2.3.1.4.1 Prinzip

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren, die der elektrophoretischen Auftrennung von DNA, RNA oder Proteinen dient. Dabei wird durch eine Kathode und eine Anode ein Spannungsfeld erzeugt, in dem das Gel als Trägersubstanz liegt. Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen und bewegen sich zur Anode. Das Gel, in diesem Fall Agarosegel, enthält ein engmaschiges Netz aus Poren, die die Wandergeschwindigkeit der Nukleinsäurefragmente in Abhängigkeit ihrer Größe bestimmt. Bei Agarose handelt es sich um ein Polymer aus β-D-Galactose und 3,6-Anhydro-α-L-Galactose, welches aus den Zellwänden

von Rotalgen gewonnen und chemisch so modifiziert wird, dass es lineare, ungeladene Moleküle bildet, welche die Ladungseigenschaften der Nukleinsäure daher wenig beeinflussen. Durch die Konzentration des Agarosegels lässt sich die Größe der Poren zwischen 100 und 300 nm beeinflussen. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente werden dabei in der Regel Konzentrationen zwischen 0,3% und 2% gewählt. Dabei sinkt die Porengröße mit steigender Konzentration. Agarosegel eignet sich für den Einsatz von Nukleinsäuren zwischen 50 bp und 50 kbp. Die Agarose wird in einem Puffer gelöst, indem die Lösung zum Kochen gebracht wird. In dieser Arbeit wurde 1-fach mit destilliertem Wasser verdünnter TAE-Puffer verwendet. TAE-Puffer besteht aus Trishydroxymethylaminomethan, Na-Acetat und EDTA Dinatrium salz-Dihydrat.

Bevor die Lösung abkühlt und somit fest wird, wird Ethidiumbromid, ein roter Farbstoff, in einer Endkonzentration von 0,15 µg/ml beigemischt. Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen die Basen der Nukleinsäuren, erhöhen die Fluoreszenz in ultraviolettem Licht und ermöglichen so das Sichtbarmachen der eingesetzten Fragmente.

Als Referenz werden DNA-Moleküle bekannter Länge, auch Leiter genannt, mitlaufen gelassen. Die einzusetzende Probe wird außerdem mit einem Ladepuffer im Verhältnis von bis 1:10 versehen. Der Ladepuffer erhöht die Dichte einer Probe, färbt diese an und ermöglicht somit, dass die Probe in den Gelkammern zum Liegen kommt. Durch das Anfärben der Probe wird der Beladungsprozess erleichtert.

Um das Ergebnis der Gelelektrophorese längerfristig festzuhalten, ist an die Kammer, in der die DNA-Banden in ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden, eine Kamera angeschlossen.

2.3.1.4.2 Durchführung

Von den oben beschriebenen PCR-Ansätzen für Pfs16 und Pfs25 wurden jeweils 5 µl mit 1 µl Ladepuffer versehen, auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Abbildung 9) und 40 Minuten bei 120 Volt Spannung laufen gelassen. Als Leiter wurde eine 1 kb Leiter mit aufgetragen.

1kb Leiter

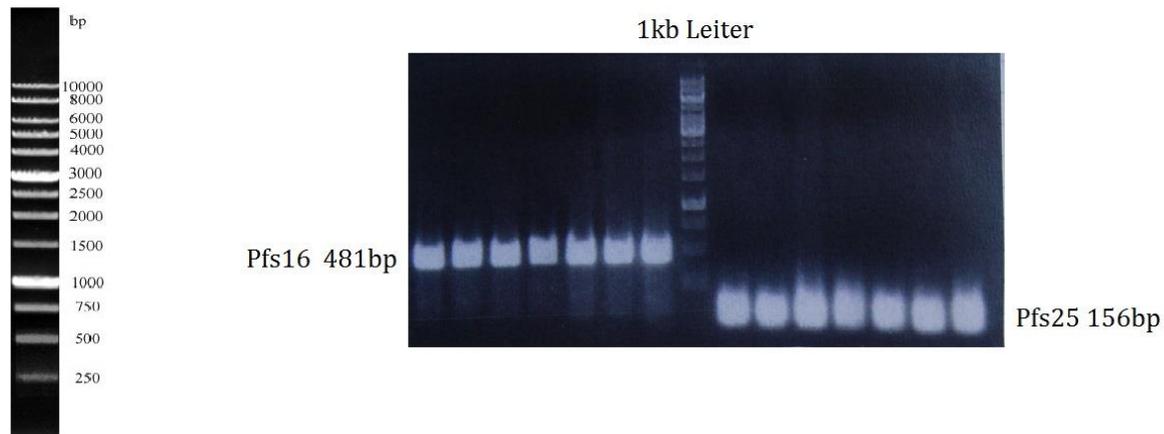


Abbildung 9: 1%iges Agarose Gel mit Pfs16 und Pfs25 Amplifikaten auf erwarteter Höhe. K. Kast

2.3.1.5 DNA-Gelextraktion

2.3.1.5.1 Prinzip

Die Extraktion von PCR-Produkten eignet sich, um selektiv Banden aus einem Gel zu schneiden und zur Weiterverarbeitung aufzureinigen. Der Vorteil dieser Methode ist die Entfernung von Nebenprodukten der PCR, Primer und DNA-Polymerase. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) lassen sich Banden zwischen 70 und 10.000 bp aufreinigen. DNA bindet in Suspension mit hoher Affinität an Silika-Partikel (Vogelstein 1979). Proteine, Salze, Phenole und Enzyme, die nicht an die Silika-Partikel binden, lassen sich so in verschiedenen Waschschrritten leicht von der DNA trennen. Für diese Schritte wurden von QIAquick spezielle Säulen angefertigt, in deren Mitte sich eine Silika-Membran befindet. Während der verschiedenen Waschrritte wird die Lösung durch Zentrifugation durch die Membran gedrückt. Die DNA bleibt dabei an der Membran heften, während sich die Verunreinigungen am Boden der Säule sammeln und verworfen werden können. Zum Schluss kann die DNA schließlich mit destilliertem Wasser aus der Membran eluiert und weiterverwendet werden.

2.3.1.5.2 Durchführung

Nach Bestätigung der erwünschten Bandenlänge wurde das PCR Produkt erneut auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und unter 100 Volt Spannung 40 Minuten laufen gelassen. Diesmal wurde ein Gel mit großen Taschen gewählt, um eine möglichst hohe Konzentration der DNA zu

erhalten. Anschließend wurden die gewünschten Banden unter langwelligem UV-Licht zügig ausgeschnitten. Zur Aufreinigung wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) verwendet, wie vom Hersteller beschrieben.

2.3.1.6 Transformation durch Elektroporation

2.3.1.6.1 Prinzip

Durch die erstmals von Neumann beschriebene Methode der Elektroporation (Neumann 1982) wird die Zellmembran von Bakterien durch die Erzeugung eines elektrischen Feldes kurzzeitig permeabilisiert. Dafür werden die Bakterien einem kurzen elektrischen Schock mit einer Stromstärke von 2000-2500 Volt ausgesetzt. Für die Erzeugung des elektrischen Feldes ist ein Elektroporator notwendig. Ein Elektroporator ist ein sich schnell entladender Kondensator, der in seiner Mitte einen Hohlraum besitzt, in dem die Zellsuspension in Küvetten eingebracht wird. Durch das Entstehen von Poren können Substanzen aus dem Außenmedium, wie z.B. DNA, in das Innere der Bakterien aufgenommen werden. Dieses Prinzip macht man sich für die Transformation von Bakterien zunutze. Unter Transformation versteht man die Übertragung von freier DNA (Avery 1944) mit Hilfe eines Vektors in Prokaryoten.

Als Vektoren wurden in dieser Arbeit TOPO-Plasmide (Abbildung 10) verwendet, die in ihrer Herstellung nach Linearisierung durch Restriktionsendonukleasen kovalent mit einer Topoisomerase I aus dem Pockenvirus gekoppelt werden, das die Ligation des PCR-Produktes bewirkt. Somit ist keine zusätzliche Ligase erforderlich. In den Plasmiden sind sogenannte Resistenzgene für bestimmte Antibiotika vorhanden, die es nur den erfolgreich transformierten Bakterien ermöglicht zu wachsen, wenn diese auf ein Medium mit entsprechendem Antibiotikum augetragen werden.

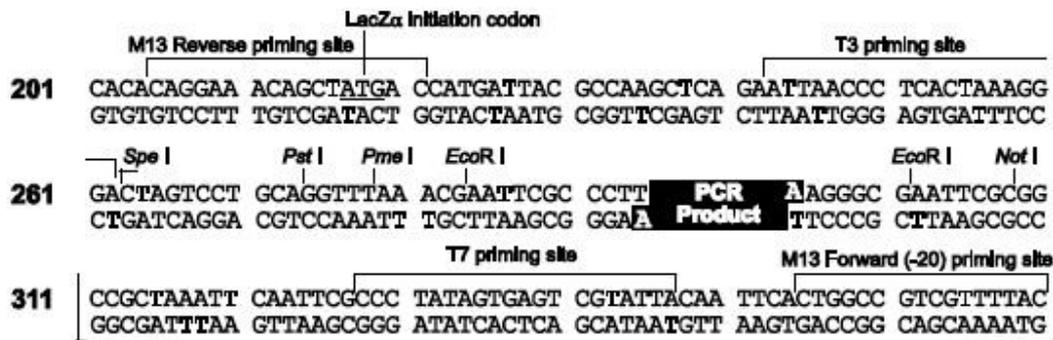


Abbildung 10: Karte des verwendeten pCR4-TOPO Plasmids der Firma Invitrogen
 Quelle Benutzerhandbuch des pCR4-TOPO Plasmids

2.3.1.6.2 Herstellung elektrokompenter Zellen

Für die Herstellung von elektrokompenten Zellen werden Escherichia coli (*E.coli*) Bakterien des TOP10 Stammes aus einer Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 in frisches LB-Medium (Luria Broth-Medium) überimpft und bei 37°C und 200 rpm 2-3 Stunden geschüttelt, bis bei 600 nm Messung eine optische Dichte von 0,5-0,8 erreicht wurde. Anschließend wird die Suspension in 50 ml Falcon Behälter, die bei -20°C gelagert werden, gefüllt und bei 4°C und 4300 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in 1 ml gekühltem, 10%igem Glycerin durch gründliches auf und abpipettieren resuspendiert. Die Lösung wird in 1,5 ml Eppendorf-Behälter überführt und für 10 Sekunden gevortext, bevor sie anschließend bei 4°C und 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert wird. Diese Prozedur wird 4-mal wiederholt, bis das Pellet schließlich in 500 µl gekühltem, 10%igem Glycerin gelöst und zu 50 µl in 1,5 ml Eppendorf-Behälter aliquotiert wird. Die Aliquots werden entweder direkt zur Weiterverarbeitung genutzt oder bei -80°C weggefroren.

2.3.1.6.3 Durchführung

Für die Transformation der aus dem Agarosegel extrahierten DNA-Abschnitte wird das TOPO® TA Cloning® Kits (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornien) verwendet. Die elektrokompenten TOP10 Zellen werden auf Eis aufgetaut und der Reaktionsansatz wie folgt auf Eis vorbereitet (Tabelle 7):

Substanz	Volumen
DNA	2 µL
Salz-Lösung	1 µL
Aqua bidest.	2 µL
TOPO® Vektor	<u>1 µL</u>
	6 µL

Tabelle 7: Reaktionsansatz für Transformation

Der Reaktionsansatz wird 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um bei der anschließenden Elektroporation einen Kurzschluss durch den zu hohen Salzgehalt zu verhindern, wird der Reaktionsansatz entsalzt (Marusyk 1980). Dazu wird destilliertes Wasser in eine Petrischale gegeben und ein Membranfilter mit einer Pinzette auf die Flüssigkeit gelegt. Dabei muss die glatte Seite der Membran nach oben zeigen. Auf die Mitte der Membran, die auf dem Wasser schwimmt, wird der Reaktionsansatz pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10-15 Minuten kann der Ansatz mit einer Pipette vorsichtig wiederaufgenommen werden.

Anschließend werden je 2 µl des Ansatzes in 50 µl TOP10 kompetente Zellen, die auf Eis gelagert sind, pipettiert und dann vorsichtig in ebenfalls eisgekühlte 0,1 cm Küvetten gegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bilden. Die befüllte Küvette wird dann in die dafür vorgesehene Stellfläche des Elektroporators gestellt und einem kurzen Stromschock von ca. 2000 Volt ausgesetzt. Anschließend wird die Lösung zügig aus der Küvette entnommen und in 500 µl S.O.C. Medium gegeben, welches zuvor 30 Minuten bei 37°C inkubiert wird. Die Lösung wird dann 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Je Ansatz werden anschließend 35 µl der Lösung auf 37°C vorgewärmte LB-Platten ausplattiert, die zuvor mit dem Antibiotikum Ampicillin versehen werden. Die restliche Lösung wird 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet ebenfalls auf vorgewärmte LB Ampicillin Platten ausplattiert. Die LB Platten werden dann für 10 Stunden bei 37°C inkubiert.

Anschließend werden die Klone vereinzelt mit einer sterilen Öse aufgenommen und in 1 ml 25%igem Glycerol bei -80°C weggefroren, da Bakterien in der Glycerollösung unbegrenzt überlebensfähig sind.

2.3.1.7 Übernacht-Kultur

2.3.1.7.1 Prinzip

Das Anlegen einer Übernacht-Kultur dient dazu, Bakterien in einem flüssigen Medium anzuzüchten, das alle Nährstoffe enthält, die die Bakterien zum Wachsen brauchen. Das bakterielle Wachstum findet in drei Phasen statt. In der Anlaufphase findet die Analyse des vorhandenen Nährmediums durch Rezeptoren auf der Zellmembran der Bakterien und die Induktion von Enzymen, die für die Verarbeitung der Nährstoffe nötig sind, statt. Es folgt die exponentielle Wachstumsphase, die von der Generationszeit des jeweiligen Bakteriums abhängig ist. Die Anzahl von *E.coli*-Bakterien verdoppelt sich ungefähr alle 30 Minuten, bis die Kapazitäten des Nährmediums ausgeschöpft sind und die stationäre Phase erreicht wird, in der sich ein dynamisches Gleichgewicht einstellt. Ist die Populationsdichte zu groß für die vorhandenen Nährstoffe, so sterben die Bakterien ab. Die Übernacht-Kultur bietet den Bakterien genügend Zeit für die Anlaufphase und das exponentielle Wachstum.

2.3.1.7.2 Durchführung

Um die Plasmid-transformierten Bakterien anzuzüchten, wird ein Teil des in 25%igem Glycerol weggefrorenen Klons mit einer sterilen Öse aufgenommen und in einen Erlenmeyerkolben mit 25 ml flüssiges LB-Medium, welches mit 25 µl Ampicillin versehen ist, überführt. Anschließend wird die Lösung für 12 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

2.3.1.8 Plasmid-Extraktion und Überprüfung der Sequenz

2.3.1.8.1 Prinzip

Die Isolierung der Plasmid-DNA beruht auf dem Prinzip der selektiven alkalischen Denaturierung von DNA mit großem Molekulargewicht (Birnboim and Doly 1979). Zirkulär vorliegende Plasmid-DNA bleibt dabei unversehrt. Anschließend werden, wie schon bei der Extraktion von DNA aus Agarose Gel beschrieben, die Eigenschaften der DNA, sich an Silikapartikel zu binden, genutzt, um eben diese aufzureinigen und anschließend zu eluieren.

2.3.1.8.2 Durchführung

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus der Übernachtskultur wird das QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande), wie vom Hersteller beschrieben, verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl bidestilliertem Wasser eluiert.

2.3.1.8.3 Überprüfung der Sequenz

Um die Sequenz des PCR-Inserts zu überprüfen, werden 15 µl der isolierten Plasmid-DNA an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt, die die Sequenzierung der Plasmid-DNA mittels der Zyklus-Sequenzierung feststellt (Sears et al. 1992, Slatko 1994). Die Methode beruht auf mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP's), die mit den dNTP's bei der Elongation durch die DNA-Polymerase konkurrieren. Die Komponenten dieser Methode sind die DNA, Primer, hitzestabile DNA-Polymerase, 4 dNTP's, 4 farbstoffmarkierte ddNTP's, Puffer, Mg²⁺ und K⁺.

Werden die ddNTP's anstelle der dNTP's eingebaut, so kommt es zum Abbruch der Elongation, da die DNA-Polymerase keine weiteren Nukleotide anbauen kann. Daraufhin sind am Ende einiger Zyklen DNA-Sequenzen verschiedener Längen vorhanden, die an ihren Enden jeweils ein farbmarkiertes ddNTP tragen. Anschließend wird der Reaktionsansatz in einen Kapillarelektrophorese-Sequencer gegeben, der die DNA-Moleküle der Größe nach auftrennt. Diese Methode funktioniert vom Prinzip so wie die oben beschriebene Gelelektrophorese. Eine Kamera kann anschließend die verschiedenen Fluoreszenzsignale, die durch die ddNTP's erzeugt werden, aufnehmen.

Nach Bestätigung der richtigen Sequenzen für Pfs16-mRNA und Pfs25-mRNA in den transformierten Bakterien wird die Plasmid DNA erneut für eine PCR verwendet. Es wird jeweils ein 6-facher PCR Ansatz gewählt wie oben bereits beschrieben. Als Primer wird hierfür M13 Primer verwendet, deren Schnittstellen auf dem Plasmid vorhanden sind (Abbildung 10), um die überschüssige Plasmid-DNA von dem PCR-Insert zu trennen. Dabei ist wichtig, dass die Promotorsequenz für die T7-Polymerase in der Sequenz enthalten bleibt, um die DNA für die Verdünnungsreihen weiterverwenden zu können, wie unten beschrieben. Durch die PCR mit den M13 Primern entstehen für Pfs16 DNA Abschnitte mit 647 bp und für Pfs25 mit 320 bp. Zur Überprüfung der PCR werden jeweils 5 µl der PCR-Ansätze mit 1 µl Ladepuffer versehen, auf ein 1%iges Agarose Gel aufgetragen und für 40 Minuten bei 120 Volt laufen gelassen (Abbildung 11).

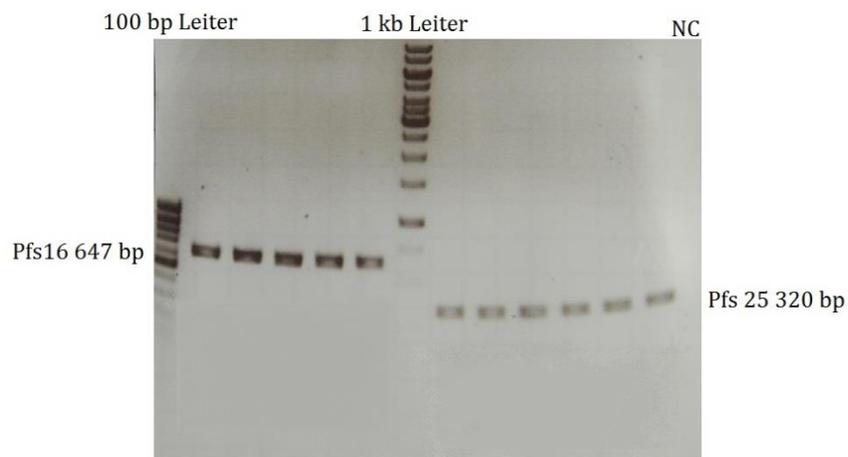


Abbildung 11: 1%iges Agarose-Gel mit Amplifikaten nach PCR mit M13 Primern. K. Kast

Um das Produkt von Nebenprodukten zu reinigen, wird es erneut in große Taschen auf ein 1%iges Agarose Gel für 45 Minuten bei 120 Volt aufgetragen. Die erwünschten Banden werden ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) aufgereinigt, wie bereits beschrieben.

Um die Ausbeute an DNA zu maximieren, wird die aus dem Gel aufgereinigte DNA erneut in eine PCR eingesetzt. Hierfür werden jeweils für Pfs16 und für Pfs25 12xfach Ansätze nach Standard Protokoll mit M13 Primern gewählt und anschließend auf ein 1,5%iges Agarose Gel für 40 Minuten bei 120 Volt aufgetragen (Abbildung 12).

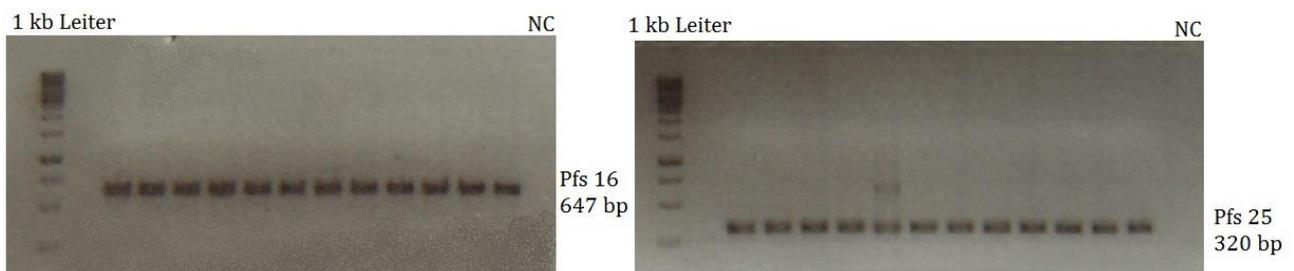


Abbildung 12: 2 1,5%ige Agarose-Gele. Links mit Pfs16-Amplifikaten und erwarteter Basenlänge von 647bp. Rechts mit Pfs25 Amplifikaten und erwarteter Basenlänger von 320bp. K. Kast

2.3.1.9 Aufreinigung von PCR Produkten

2.3.1.9.1 Prinzip

Die Aufreinigung von PCR-Produkten funktioniert wie auch bei der Aufreinigung von DNA aus Agarose Gelen und von Plasmid-DNA aus Kultur durch Bindung der DNA an Silika-membranen in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration. Ziel ist überflüssige Salze, Primer, Nukleotide, und DNA Polymerase aus dem Ansatz zu entfernen, um möglichst reine DNA erlangen.

2.3.1.9.2 Durchführung

Für die Reinigung der PCR wird das QIAGEN PCR Purification Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande), wie vom Hersteller beschrieben verwendet. Pro Säule werden 100 µl des PCR-Ansatzes eingesetzt und anschließend in 30 µl RNase freiem Wasser eluiert.

2.3.1.10 T7 *In vitro*-Transkription

2.3.1.10.1 Prinzip

Die T7 *in vitro*-Transkription ist eine im Reagenzglas stattfindende Reaktion, bei der doppelsträngige DNA durch die T7-RNA-Polymerase in RNA umgeschrieben wird (Van Gelder et al. 1990). Die T7-RNA-Polymerase kommt vom T7 Bakteriophagen (McAllister 1993), einem Virus, der *E.coli* befällt. Die Transkription findet in 5'→3' Richtung statt und kann nur erfolgen, wenn die Polymerase ihren eigenen T7 Promotor erkennt.

2.3.1.10.2 Durchführung

Die *in vitro*-Transkription erfolgt mit dem AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit (Epicentre® Biotechnologies, Madison, Wisconsin), wie von den Herstellern beschrieben. Der Reaktionsansatz wird wie folgt angesetzt (Tabelle 8):

Substanz	Konzentration	Volumen
PCR-Produkt		6,3 µL
Puffer		2,0 µL
ATP	100 mM	1,8 µL
GTP	100 mM	1,8 µL
CTP	100 mM	1,8 µL
UTP	100 mM	1,8 µL
DTT	100 mM	2 µL
RNase Inhibitor		0,5 µL
T7-RNA Polymerase		<u>2,0 µL</u>
		20 µL

Tabelle 8: In vitro-Transkriptions-Ansatz

Der Ansatz wird 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 1 µl DNase hinzugefügt, die mit dem Kit mitgeliefert wird und für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um die in dem Ansatz vorhandene DNA zu verdauen und möglichst nur RNA zu behalten.

2.3.1.11 Verdünnungsreihen

Nach der *in vitro*-Transkription wird eine RNA-Aufreinigung mit Hilfe des RNeasy MinElute cleanup Kits (Qiagen, Venlo, Niederlande) durchgeführt, wie vom Hersteller empfohlen. Vom Prinzip funktioniert dies ebenso wie die Aufreinigung von DNA, die in dieser Arbeit bereits beschrieben wurde. Die RNA wird in 25 µl Lösungspuffer eluiert. Da RNA sehr anfällig auf Ribonukleasen (RNasen) reagiert, welche die Phosphatdiesterbindungen von RNA spalten, erfolgt die Aufreinigung und die Anfertigung der Verdünnungsreihen auf Eis und unter einem Abzug.

Für die erste Verdünnungsstufe werden 5 µl der gereinigten RNA in 195 µl Lösungspuffer eluiert, sorgfältig auf- und abpipettiert und die Lösung schließlich gevortext, um sicherzustellen, dass sich die RNA gleichmäßig in dem Puffer verteilt. Für die zweite Verdünnungsstufe werden 20 µl der ersten Stufe in 180 µl Lösungspuffer gegeben und ebenfalls sorgfältig gemischt. Diese Schritte werden wiederholt bis sieben 10-fache Verdünnungsstufen angefertigt sind. Alle Verdünnungsstufen werden unter dem Abzug und auf Eis zu 6 µl aliquotiert und bei -80°C weggefroren.

2.3.1.12 Analyse der künstlichen RNA mittels Bioanalyzer

2.3.1.12.1 Prinzip

Der Agilent 2100 Bioanalyzer gehört zur Lab-on-Chip-Technologie und wird zur Qualitätskontrollen und Quantifizierung von RNA, DNA, Proteinen und Zellen basierend auf der Mikrofluidtechnik eingesetzt (Fleige and Pfaffl 2006). Die Begriffe „Lab-on-Chip“ und „Mikrofluid“ lassen sich dadurch erklären, dass nur sehr geringe Mengen der Proben auf ein miniaturisiertes System in Form eines Chips pipettiert werden. Das Innere des Chips besteht aus winzigen Kanälen, die in Glas eingätzt sind und durch die die Proben durch Wirken elektrokinetischer Kräfte kontrolliert fließen. Durch einen automatisierten Prozess gelangen sie in eine Trennkapillare, in der sie durch den Siebeffekt der Polymermatrix ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Diese Methode ersetzt die Gel-Elektrophorese bei der Qualitätskontrolle von RNA und ermöglicht zudem eine Quantifizierung der Proben.

Von den zu analysierenden Proben werden jeweils nur 1 µl in Mikrokanäle auf den Chip pipettiert, auf den maximal 12 Proben aufgetragen werden können. In die Mikrokanäle wird außerdem ein Gemisch aus Polymermatrix und Fluoreszenzfarbstoff gefüllt. In einen weiteren Kanal kommt eine farbmarkierte Leiter. Der beladene Chip wird in den Agilent 2100 Bioanalyzer eingelegt, wobei in jede Vertiefung der Mikrokanäle je eine Elektrode passt. Die Fragmente werden schließlich mit Hilfe der Kapillar-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Die laserinduzierten Fluoreszenzsignale der Fragmente werden erkannt und die detektierten Daten werden in Elektropherogramme und visualisierte Gelbilder übersetzt. In dem Elektropherogramm erscheinen die aufgetrennten Fragmente in Form von Peaks. Je glatter die Peaks erscheinen, desto reiner sind die vorliegenden Proben. Außerdem wird der prozentuale Anteil der Peaks an der Gesamtprobe angegeben.

Wenn ribosomale RNA analysiert wird, so wird die Integrität der Probe als RNA-Integrity-Number (RIN) (Schroeder et al. 2006) angegeben, der auf dem Quotienten zwischen großer und kleiner ribosomaler Untereinheit (28S/18S-rRNA) beruht. Bei der Analyse von mRNA wird kein RIN errechnet, da keine ribosomalen Untereinheiten vorhanden sind, sondern hier ist die Form der Peaks entscheidend.

Bei der Analyse der Fluoreszenzsignale ist die Qualität der Leiter von Bedeutung, da sie bei der Berechnung durch die Software als Standard gilt. Die RNA 6000 Nano Leiter (Abbildung 13) besteht aus 6 RNA Fragmenten, die zwischen 0,2kb und 6kb groß sind, mit einer Konzentration von 150 ng/µl.

Electropherogram Summary

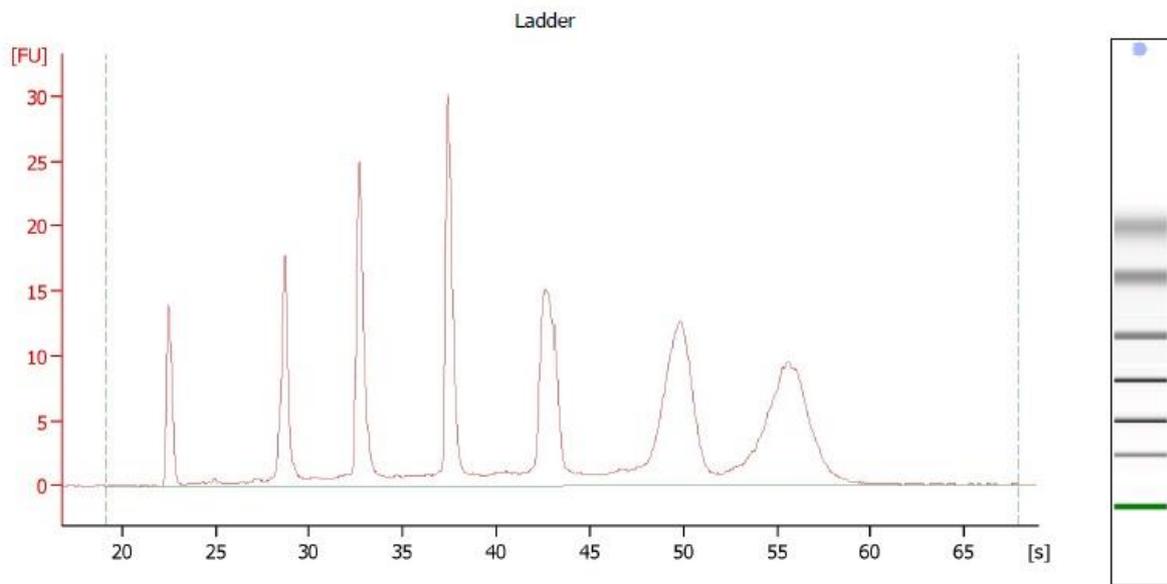
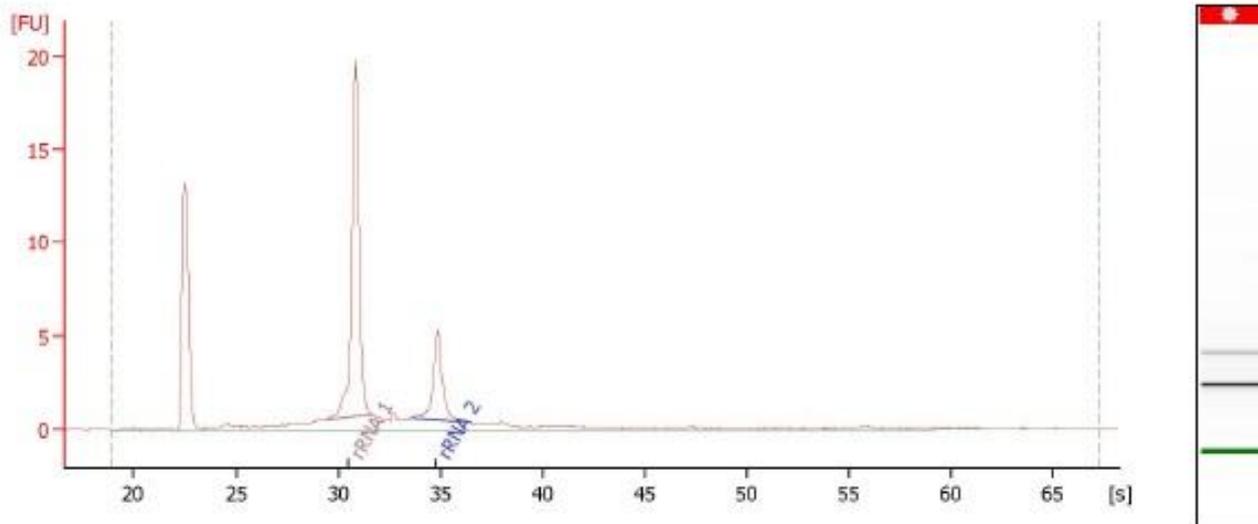


Abbildung 13: Bioanalyser Leiter. K. Kast

2.3.1.12.2 Durchführung

Um die Quantität und Qualität der hergestellten Verdünnungsreihen zu überprüfen, wird 1 μ l der ersten Verdünnungsstufe (Abbildung 14), die sowohl die Pfs16-mRNA als auch die Pfs25-mRNA enthält, mittels Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien) analysiert. Dazu wird das Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet. Um die Degradation der RNA Probe zu verhindern, werden die Elektroden des Bioanalyzers vor Benutzung erst mit einem RNase ZAP gefülltem Reinigungschip und anschließend mit einem RNase-freiem Wasser gefülltem Reinigungschip gesäubert. RNase ZAP ist eine Lösung, die ubiquitär vorkommende Nukleasen zerstört und somit dem Verdau von RNA entgegenwirkt. Anschließend wird der Chip nach Protokoll des Herstellers beladen und die Analyse gestartet.



Overall Results for sample : Pfs16 und Pfs25 - 1

RNA Area: 50,8
 RNA Concentration: 34 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0

Fragment table for sample : Pfs16 und Pfs25 - 1

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area	
rRNA 1	29,40	31,64	25,4	42,5	Länge ca: 370 nt
rRNA 2	33,53	36,04	7,5	12,5	Länge ca: 740 nt

Abbildung 14: Messung der Reinheit der Pfs16 und Pfs25 RNA. K. Kast

2.3.1.12.3 Ermittlung der mRNA Kopienanzahl

Durch die Ermittlung des mRNA Gehalts in der ersten Verdünnungsstufe und die Errechnung des Molekulargewichts der Pfs16- und Pfs25-mRNA lässt sich die mRNA-Kopienanzahl pro µl berechnen. Um das Molekulargewicht der beiden künstlich hergestellten mRNA zu ermitteln, wird die folgende Formel verwendet:

Das exakte Molekulargewicht von Einzelstrang-RNA:

$$\text{Molekulargewicht} = (\text{An} \times 329.2) + (\text{Un} \times 306.2) + (\text{Cn} \times 305.2) + (\text{Gn} \times 345.2) + 159$$

Dabei stehen An, Un, Cn, und Gn für die Anzahl der einzelnen Nukleotide im Gesamtabschnitt. Die Addition von „159“ berücksichtigt das Molekulargewicht der 5'-Triphosphate.

Molekulargewicht der künstlichen Pfs16-mRNA:

Molekulargewicht = $(211 \times 329.2) + (174 \times 306.2) + (112 \times 305.2) + (126 \times 345.2) + 159 = 200576.6$ Dalton mit: $A_n = 211$, $U_n = 174$, $C_n = 112$ und $G_n = 126$.

Molekulargewicht der künstlichen Pfs25-mRNA:

Molekulargewicht = $(90 \times 329.2) + (95 \times 306.2) + (46 \times 305.2) + (67 \times 345.2) + 159 = 96043.6$ Dalton mit $A_n = 90$, $U_n = 95$, $C_n = 46$ und $G_n = 67$.

Die quantitative Analyse der ersten Verdünnungsstufe mittels Agilent 2100 Bioanalyzer hat eine mRNA-Gesamtkonzentration von 34 ng/ μ l ergeben. Dabei entfiel eine Fraktion von 42,5% auf den ersten Peak, der die künstliche Pfs25-mRNA repräsentiert und eine Fraktion von 12,5% auf den zweiten Peak, der die künstliche Pfs16-mRNA darstellt. Daraus ergaben sich die Gehälter für Pfs16- und Pfs25-mRNA wie folgt:

$$\text{Pfs16} = 12,5 \% \text{ von } 34 \text{ ng}/\mu\text{l} = 4,25 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,5600867417625\text{E}+15 \text{ Dalton [Da]} /\mu\text{l}$$

$$\text{Pfs25} = 42,5\% \text{ von } 34 \text{ ng}/\mu\text{l} = 14,45 \text{ ng}/\mu\text{l} = 8,7042949219927\text{E}+15 \text{ Dalton [Da]} /\mu\text{l}$$

Aus diesen Werten ergaben sich für die erste Verdünnungsstufe folgenden mRNA-Kopienanzahlen:

$$\text{Pfs16} = \frac{2,5600867417625\text{E}+15 \frac{\text{Da}}{\mu\text{l}}}{200576.6 \text{ Da}} = 12\,763\,636\,146/\mu\text{l}$$

$$\text{Pfs25} = \frac{8,7042949219927\text{E}+15 \frac{\text{Da}}{\mu\text{l}}}{96043.6 \text{ Da}} = 90\,628\,578\,291/\mu\text{l}$$

2.3.1.13 Analyse der künstlichen RNA mittels NanoDrop

2.3.1.13.1 Prinzip

Der Nanodrop ist ein Spektrophotometer, der die optische Dichte bei verschiedenen Wellenlängen detektiert und graphisch darstellen kann (Abbildung 15). Verschiedene Wellenlängen sind dabei spezifisch für verschiedene Substanzen. So ist die Wellenlänge bei 260 nm spezifisch für Nukleinsäuren und die bei 280 nm für Proteine. Anhand der graphischen Darstellung und das Bilden des Verhältnisses zwischen der photometrischen Detektion bei 260 nm und 280 nm kann die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. Dabei kann man bei

einem Verhältnis 260 nm/280 nm von über 1,8 von einer reinen Probe ausgehen (Fleige and Pfaffl 2006).

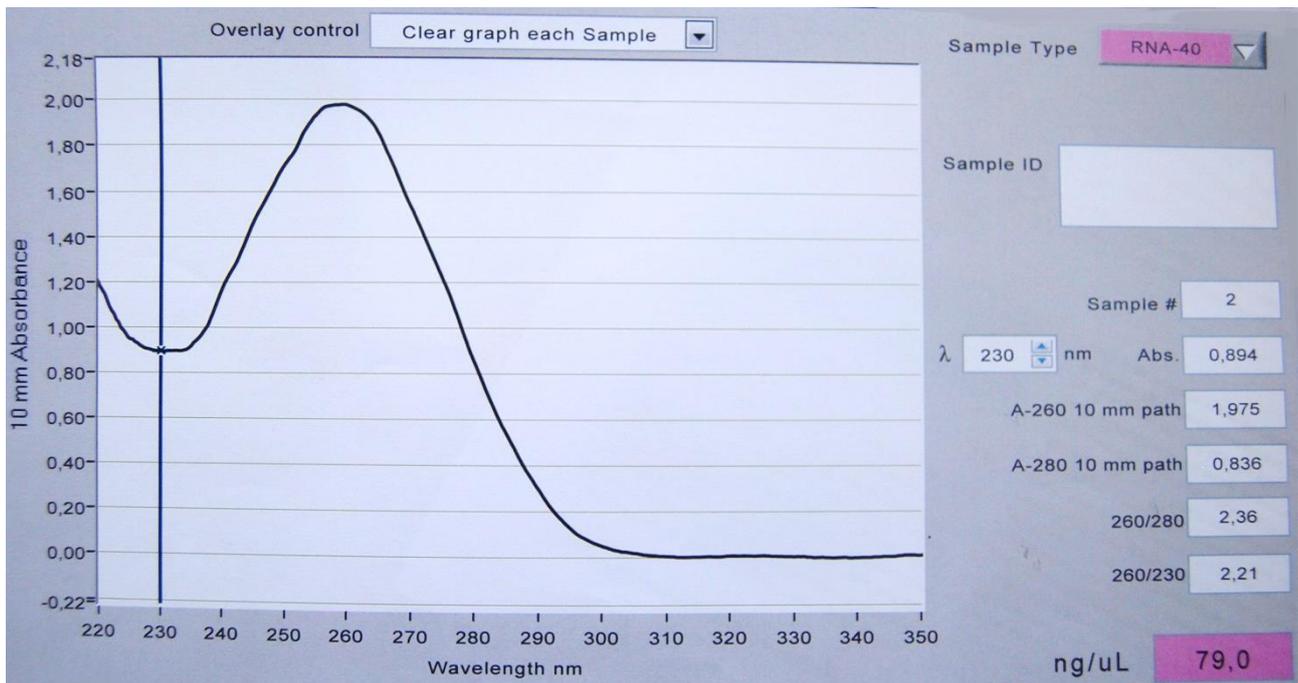


Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung einer NanoDrop-Messung. K. Kast

2.3.1.13.2 Durchführung

Im Anschluss an die Bioanalyser-Analyse wird zusätzlich noch eine Messung der ersten Verdünnungsstufe, die sowohl die RNA-Transkripte für Pfs16 und Pfs25 enthält, mittels spektrophotometrischer Nanodrop-Messung durchgeführt. Für die Messung ist nur 1 µL der Probe notwendig. Es ergab sich ein 260 nm/280 nm Verhältnis von 2,24.

2.4 Analyse der Patientenproben

2.4.1 RNA Extraktion

2.4.1.1 Prinzip

Die Patientenproben wurden zur Konservierung auf Filterpapier pipettiert. Um die Plasmodien-RNA zu analysieren, muss diese nun von dem Filterpapier isoliert, d.h. extrahiert werden. Die Methode nach Boom (Boom et al. 1990) hat sich dafür bewährt. Sie basiert auf den lysierenden und Nuklease inaktivierenden Eigenschaften des chaotropen Guanidiniumthiocyanats (Chirgwin

et al. 1979, Thompson and Gillespie 1987) einerseits und auf der Eigenschaft der Nukleinsäuren, an Silika zu binden, andererseits (Vogelstein and Gillespie 1979).

2.4.2.1 Durchführung

Die Proben auf dem Filterpapier werden mit einer hitzesterilisierten Schere mit ca. 3 mm Abstand zur Probe ausgeschnitten, ohne dass die Schere die Flüssigkeit berührt. Anschließend werden sie in 2ml Lysierpuffer (NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer, BioMérieux, Lyon, Frankreich) in 12 ml Falcon-Behälter gegeben, in denen sie für 30 Minuten bei 150 rpm und Raumtemperatur inkubiert werden. Bevor die Filterpapiere aus der Lösung entfernt werden, werden diese 5 Minuten lang bei 1500 g zentrifugiert. Zwischen allen Arbeitsschritten muss die Pipettenspitzen stets gewechselt werden, um eine Kontamination zwischen den verschiedenen Proben zu vermeiden. Die Flüssigkeiten werden danach in 1,5 ml Eppendorf Behälter umgefüllt und jeweils 50 µl Silikalösung dazugegeben, die Lösung gevortext, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Für die weiteren Schritte wird mit dem NucliSENS® miniMAG® Gerät (BioMérieux, Lyon, Frankreich), wie vom Hersteller empfohlen, gearbeitet. Das Gerät besitzt einen Magneten, der hinter 12 Stellflächen für Eppendorfbehälter angebracht ist und den man hoch- und herunterklappen kann. Während der verschiedenen Waschschrte wird der Magnet heruntergeklappt und hat somit keine Wirkung auf die Eppendorfbehälter. Um danach den magnetischen Silika-Nukleinsäure-Komplex von der Waschlösung zu trennen, wird der Magnet hochgeklappt und der Komplex an die Hinterseite des Eppendorfbehälters in Richtung des Magnetes gezogen. So kann die Waschlösungen zwischen den Schritten ohne große Verluste von RNA abpipettiert werden. Zum Schluss wird die RNA in 30 µl Lösungspuffer, der vom Hersteller mitgeliefert wird, eluiert und entweder sofort für die QT-NASBA Methode verwendet oder bei -80°C weggefroren. Bei allen Extraktionen wird eine Negativkontrolle von einem gesunden, nicht mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Spender, mitverarbeitet.

2.4.2 QT-NASBA

2.4.2.1 Prinzip

QT-NASBA steht für "Quantitative-Nucleic Acid Sequence-Based Amplification" und ist eine Technik, die erstmals von Compton (Compton 1991) beschrieben wurde. Sie dient der Amplifikation von DNA oder RNA während eines isothermalen Prozesses und stellt eine

Alternative zur PCR dar. Ein Vorteil der NASBA Technik ist, dass Einzelstrang-RNA direkt in die Reaktion eingesetzt werden kann und nicht, wie bei der PCR, zuerst in cDNA umgeschrieben werden muss. Das und die Tatsache, dass der Prozess isothermal stattfindet, führen zu geringeren Analysezeiten und somit zu weniger Kontaminationsgefahr (Schneider et al. 2005). Ein weiterer Vorteil des isothermal stattfindenden Prozesses ist die Tatsache, dass DNA bei 42°C nicht denaturiert, somit doppelsträngig vorliegt und nicht als Substrat für die Amplifikation dient (Simpkins et al. 2000).

Ein Reaktionsansatz enthält:

- T7 Polymerase
- RNase H
- AMV-Reverse Transkriptase
- ATP, CTP, GTP, UTP
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Zwei Primer
- Hybridisierungssonde
- Puffer

Einer der beiden Primer muss an seinem 5'-Ende die Promotor Sequenz der T7 Polymerase enthalten, damit diese durch das Enzym erkannt werden kann. Die nicht zyklische Phase beginnt damit, dass der Primer 1 (Abbildung 16), der die T7 Promotor Sequenz enthält, die einzelsträngige RNA erkennt und bindet. Die AMV Reverse-Transkriptase bindet an das 3'-Ende des Primers und bildet RNA-abhängig eine cDNA Kopie. Ein RNA:DNA Hybrid entsteht. Das Enzym RNase H verdaut als nächstes den RNA Anteil aus dem Hybrid. Nun bindet der zweite Primer an die cDNA und die AMV-Reverse Transkriptase bildet nun DNA-abhängig den zu ihrer Vorgabe komplementären Strang. Ein DNA:DNA Hybrid entsteht, das den nun funktionstüchtigen T7 Promotor enthält und der T7 Polymerase als Startpunkt dient. Die T7 Polymerase amplifiziert nun DNA-abhängig RNA-Abschnitte, welche in der zyklischen Phase erneut als Vorlage zur Amplifikation dienen. Die RNA wird somit exponentiell vermehrt. Neben den Primern wird auch eine Hybridisierungssonde zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben, deren Sequenz komplementär zu einem Teil der Zielsequenz ist. An die Sonde ist ein Farbstoff kovalent gebunden, der nach Bindung an die Markersequenz photometrisch detektiert werden kann. Die Firma BioMérieux (Lyon, Frankreich) hat das NucliSENS EasyQ® System

entwickelt, das den Amplifikationsprozess und die gleichzeitige photometrische Detektion ermöglicht.

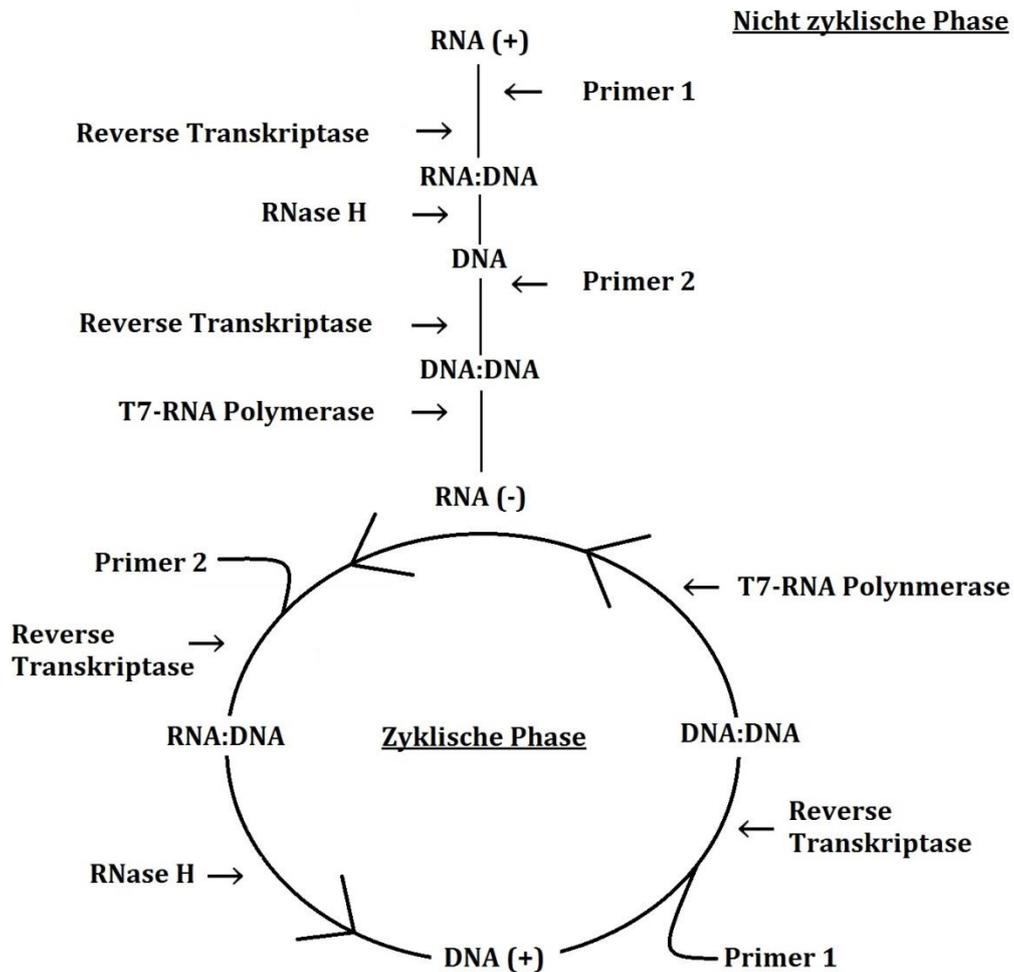


Abbildung 16: Amplifikationsablauf der NASBA-Technik. K. Kast

2.4.2.2 Durchführung

Für die Durchführung der QT-NASBA Technik wird das NucliSENS EasyQ® Basic Kit (BioMérieux, Lyon, Frankreich) nach Angaben der Hersteller verwendet. Die Primer und Hybridisierungssonden werden in einer Endkonzentration von 290 nM und 145 nM gewählt, wie in zahlreichen Publikationen zuvor beschrieben (Schneider et al. 2004, Schneider et al. 2005, Ouedraogo et al. 2007, Pritsch et al. 2012). Die Patientenproben werden auf das Vorhandensein von Pfs16-mRNA, Pfs25-mRNA und 18S-rRNA geprüft. Wie zuvor beschrieben, wird Pfs16-mRNA von allen Gametozytenstadien exprimiert und ist Transkript für ein Protein der parasitophoren Vakuole. Die Pfs25-mRNA ist ein Transkript für Proteine der osmiophilen Körperchen, die typische Granulae der weiblichen Gametozyten sind und nur von weiblichen Stadium V Gametozyten gebildet werden. (Schneider et al. 2004, de Koning-Ward et al. 2008,

Delves et al. 2013). 18S-rRNA wird dahingegen nicht nur von Gametozyten, sondern auch von asexuellen *Plasmodium falciparum* Erregern gebildet.

Je Reaktionsansatz werden 5 µl, zuvor extrahiertes Gametozyten-RNA-Eluat, eingesetzt. Hinzu werden 10 µl Reaktionslösung gegeben, die aus einem Puffer mit einer Kaliumchloridkonzentration von 80 mM, Primer-Sonden-Mix, NTP's, dNTP's, DTT und DMSO besteht. Anschließend werden die Ansätze erst 2 Minuten bei 65°C aktiviert, dann 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Dann werden jedem Ansatz 5 µl Enzym-Gemisch, das aus den drei Enzymen AMV-Reverse Transkriptase, T7 Polymerase und RNase H besteht, hinzugefügt. Der nun komplette 20 µl Reaktionsansatz wird anschließend noch kurz zentrifugiert, bevor die Amplifikation mittels NucliSENS EasyQ® System (BioMérieux, Lyon, Frankreich) gestartet wird und 90 Minuten lang läuft. Die Positivität einer Probe wird in „Time-to-positivity“ (TTP) gemessen, welche sich durch die Berechnung des Mittelwertes dreier Negativkontrollen plus 20 Standardabweichungen ergibt (Schneider et al. 2005). Ist das Fluoreszenzsignal größer als dieser Wert („Cut-off“), wird eine Probe als positiv angenommen. Je schneller die TTP erreicht wird, desto höher ist der Gehalt an mRNA. Bei jeder QT-NASBA Analyse der Patientenproben läuft eine der Verdünnungsreihen von künstlich hergestellter mRNA als Standard mit, um die Proben bezüglich ihres mRNA-Gehaltes zu quantifizieren.

2.5 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgt mit Microsoft Excel und Mathematica 9.0 (Wolfram Research, Champaign, IL, USA). Die Originaldaten der NASBA-Läufe sind ursprünglich im Microsoft Excel Format und werden in das Mathematica Programm importiert. Für Pfs16 gibt in jedem der sechs NASBA-Läufe eine RNA-Verdünnungsreihe, die als Maßstab für die Berechnung der RNA Kopien pro µL in den Patientenproben dient. Für Pfs16 lag der „Cut-off“ bei 1.234306 und ergab sich aus dem Mittelwert dreier Negativ-Proben bei 90 Minuten plus 20 Standardabweichungen. Nach Berechnung der TTP's der RNA-Verdünnungsreihen kann die Beziehung zwischen den TTP's und RNA Kopien pro µL berechnet werden. Jeder NASBA-Lauf wird anhand der RNA-Verdünnungsreihe normalisiert. Die Beziehung zwischen RNA Kopien pro µL und den TTP's ist daher für jeden Lauf spezifisch, bedingt durch leichte experimentelle Variationen. Durch die Normalisierung eines jeden NASBA-Laufes mittels der RNA-Verdünnungsreihen werden die experimentell bedingten Variationen legitimiert. Die Beziehung zwischen den TTP's und den RNA Kopien pro µL (Logarithmische Beziehung zwischen $1/TTP$ und \log_{10} RNA Kopienanzahl) erlaubt eine Quantifizierung der Patientenproben.

Da der quantitative RNA Gehalt in den Patientenproben stark variiert, wird bei dem Vergleich verschiedener quantitativer Methoden für jeden Patienten das Verhältnis der venösen Blutmessungen und die der anderen Materialien gebildet. Anschließend wird für jedes Verhältnis jeden Materials der Durchschnitt und die Standardabweichung berechnet. Daher ergibt sich die endgültige Quantifizierung einer Probe aus dem Durchschnitt des Verhältnisses des RNA Gehaltes zwischen dem betrachteten Material und dem RNA Gehalt im venösen Blut.

Zum Beispiel:

Patienten = Gesamtanzahl der Patienten

Mittelwert des RNA Gehaltes (Fingerprick) =

$$\frac{1}{\# \text{ Patienten}} \sum_{i=1}^{\# \text{ Patienten}} \frac{\text{RNA Gehalt im Fingerprick des Patienten } i}{\text{RNA Gehalt in der Vene des Patienten } i}$$

Für Pfs25 wird nach dem gleichen Verfahren vorgegangen. In diesem Fall sind die drei Negativwerte für Pfs25 1.00533, 1.00199 und 0.99369 und es errechnet sich ein „Cut-off“ von 1,06196. Um die TTP zu definieren, wird auch hier mittels der RNA-Verdünnungsreihe normalisiert.

Für 18S wird ebenso vorgegangen. Jedoch gibt es hierfür keine Verdünnungsreihe, und die Proben werden nur bezüglich der Anzahl an positiven und negativen Ergebnissen qualitativ ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Probenkollektiv

In die Studien wurden 16 Patienten mit mikroskopisch gesicherter, unkomplizierter *P. falciparum* Malaria eingeschlossen. Das mediane Alter lag bei 18 Jahren (zwischen 14 und 70 Jahren), 66,7% der Patienten waren männlich, 33,3% weiblich und 40% der Patienten hatten Fieber >38,0°C. Die mediane Temperatur lag bei 37,0°C (zwischen 36,4°C und 40,0°C). Der geometrische Mittelwert der Parasitämie ergab 9,320/μL (95% KI 7,298/μL-11,701/μL). Während der Routinediagnostik wurden bei keinem Patienten Gametozyten nachgewiesen. Untersuchungen des gesamten Blutausstriches ergaben 0-3 Gametozyten/μL. Drei Blutausstriche zeigten in 10 μL keinerlei Gametozyten. Insgesamt wurden 96 Proben von 16 Patienten extrahiert und anschließend mittels der QT-NASBA Methode analysiert. Je Patient wurden folgende Proben extrahiert und analysiert:

- 100μL venöses Blut auf Filterpapier
- 25μL Blut aus der Fingerbeere auf Filterpapier
- 100μL Urin
- 100μL Speichel
- Ein Mundschleimhautabstrich auf Filterpapier ausgestrichen
- Ein Mundschleimhautabstrich direkt

Ein Patient wurde aus der Studie ausgeschlossen, da er negative Ergebnisse bei allen drei Zielsequenzen erbrachte und sich durch eine PCR-Analyse eine Mono-Infektion mit *P. malariae* zeigte.

3.2 Qualitative Ergebnisse für die Detektion von Pfs16-mRNA

Die oben beschriebenen Patientenproben wurden qualitativ auf das Vorhandensein der drei Zielsequenzen: Pfs16-mRNA, Pfs25-mRNA und 18S-rRNA mittels der QT-NASBA untersucht.

Die Abbildung 17 zeigt die Anzahl der positiven Ergebnisse für die Pfs16-Zielsequenz. In den Blutproben aus Vene und Fingerbeere sind die Proben mit einer Sensitivität von 100% positiv detektiert worden. In Urin, Speichel und Mundschleimhaut-Proben war die Detektion niedrig. Mit einer Sensitivität von 20% erzielte der Nachweis in Urin die besten Ergebnisse. Pfs16 konnte in 13% der Speichelproben und der Mundschleimhautabstriche, die auf Filterpapier ausgestrichen wurden, nachgewiesen werden. Der Mundschleimhautabstrich, der direkt getrocknet und eingefroren wurde, erzielte mit einer von 15 positiven Proben das schlechteste Ergebnis.

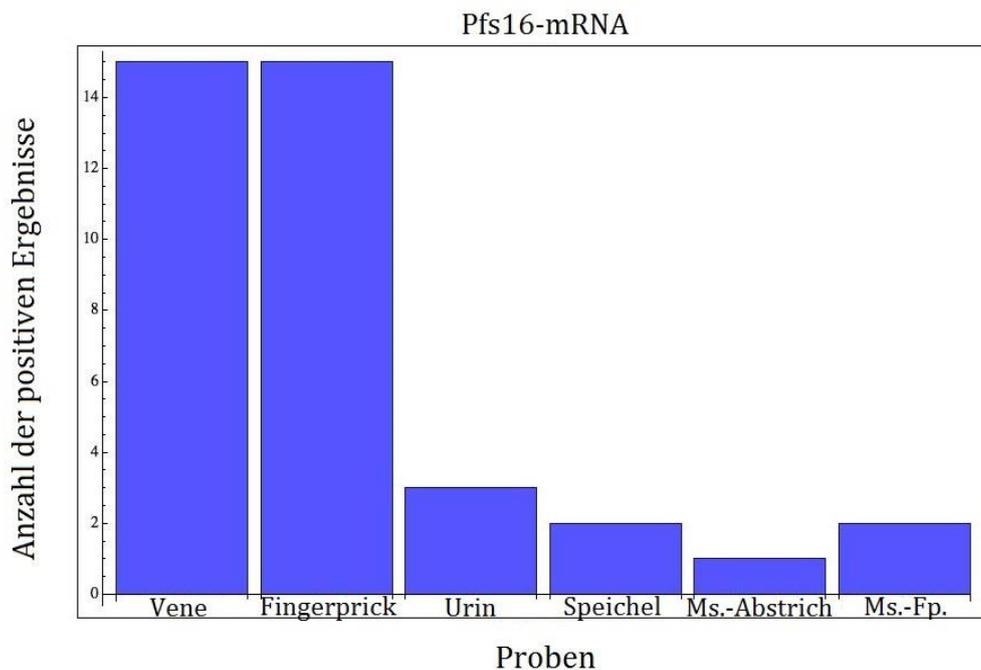


Abbildung 17: Qualitative Detektion der Pfs16-mRNA. Auf der Ordinatennachse ist die Anzahl der positiven Testergebnisse von 15 in die Studie eingeschlossenen Patienten zu sehen. Auf der Abszissenachse sind die verschiedenen untersuchten Patientenmaterialien aufgetragen. *J. Shock und K. Kast*

3.3 Qualitative Ergebnisse für die Detektion von Pfs25-mRNA

Pfs25-mRNA reifer Gametozyten konnte in 11 von 15 Proben (73,3%) im venösen Blut und in 10 von 15 Proben (66,7%) im Fingerprick-Blut nachgewiesen werden. Der Blutausstrich des Patienten, der im venösen Blut positiv und in der Fingerprick-Probe negativ war, zeigte keine Gametozyten. Die Detektion der mRNA in Urin, Speichel und Mundschleimhaut-Proben blieb negativ (Abbildung 18).

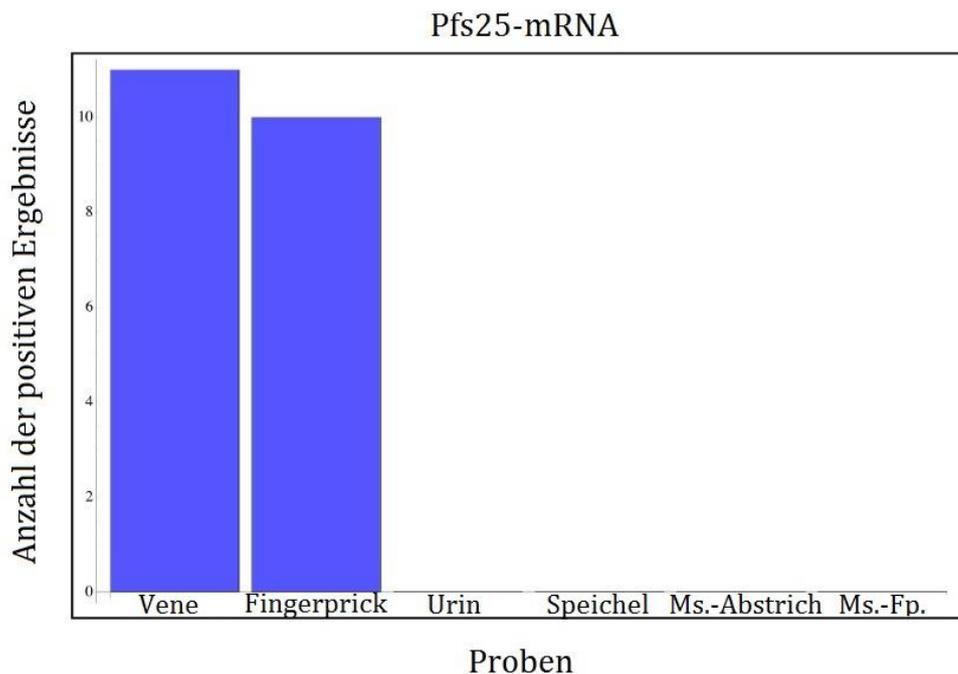


Abbildung 18: Qualitative Detektion der Pfs25-mRNA. J. Shock und K.Kast

3.4 Qualitative Detektion für die Detektion von 18S-rRNA

Die Detektion der 18S-rRNA, die sowohl in asexuellen als auch sexuellen Stadien exprimiert wird, gelang in 15 von 15 Proben aus der Fingerbeere (100%) (Abbildung 19). Eine venöse Blutprobe blieb auch nach wiederholten Analysen negativ. Bei 12 von 15 (80%) konnte 18S-rRNA im Speichel nachgewiesen werden und bei 10 von 15 (66,7%) im Urin. Im Mundschleimabstrich, der direkt getrocknet und eingefroren wurde, gelang die Detektion nur bei 2 von 15 Patienten (13,3%). Bei dem Mundschleimhautabstrich, der nach Abnahme direkt auf ein Filterpapier gestrichen und anschließend getrocknet und eingefroren wurde, gelang hingegen die Detektion bei 8 von 15 Patienten (53,3%).

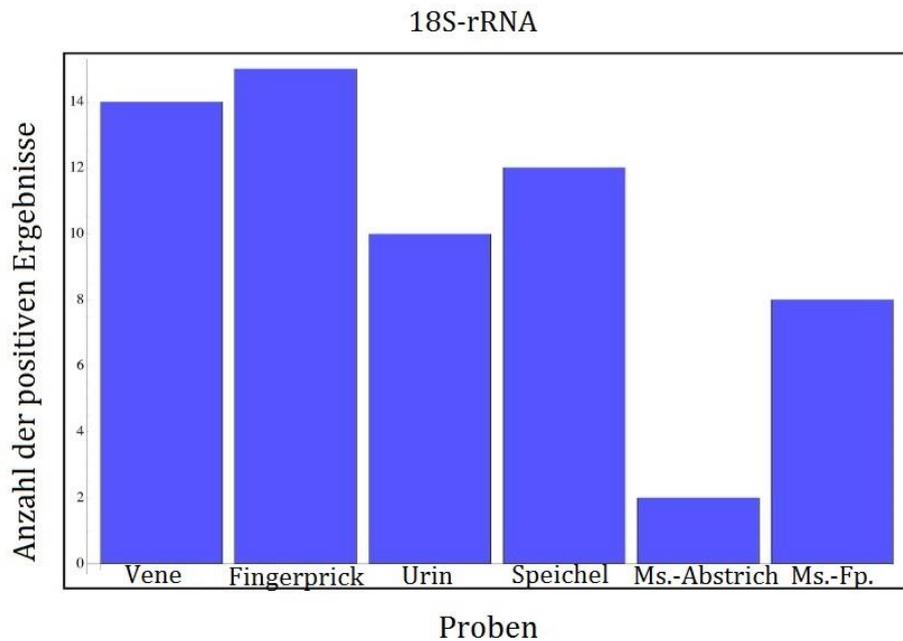


Abbildung 19: Qualitative Detektion der 18S-rRNA. J. Shock und K. Kast

Die Tabelle 9 zeigt eine Übersicht der qualitativen Ergebnisse für alle drei Zielsequenzen: Pfs16-mRNA, Pfs25-mRNA und 18S-rRNA. Der Nachweis von RNA erzielte bei allen Analysen in Blutproben die besten Ergebnisse. Während die Pfs16-mRNA in Urin noch bei 20% und im Speichel bei 13,3% der Patienten nachgewiesen werden konnte, blieben die Pfs25-mRNA Analysen in Urin, Speichel und Mundschleimhaut negativ. Die Detektion in Nicht-Blut-Proben gelang am besten für die 18S-rRNA Zielsequenz mit 80% positiven Ergebnissen im Speichel und 66,7% in Urin.

	Pfs16	Pfs25	18S
	m/N (%)	m/N (%)	m/N (%)
Venöses Blut 100µL	15/15 (100.0)	11/15 (73.3)	14/15 (93.3)
Fingerprick 25µL	15/15 (100.0)	10/15 (66.7)	15/15 (100.0)
Urin 100µL	3/15 (20.0)	0	10/15 (66.7)
Speichel 100µL	2/15 (13.3)	0	12/15 (80.0)
Mundschleimhaut Abstrich	1/15 (6.7)	0	2/15 (13.3)
Mundschleimhaut FP	2/15 (13.3)	0	8/15 (53.3)

Tabelle 9: Übersicht der Sensitivität der qualitativen Analyse

3.5 Quantitative RNA Detektion in den Patientenproben

Die künstlich hergestellte 10-fache RNA-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von $1,27602624 \cdot 10^5$ bis 10^{10} RNA Kopien pro μL für Pfs16 und von $9,060462289 \cdot 10^5$ bis 10^{10} RNA Kopien pro μL für Pfs25 liefern bei den Amplifikationsprozessen mittels QT-NASBA als Standard mit (Abbildung 20).

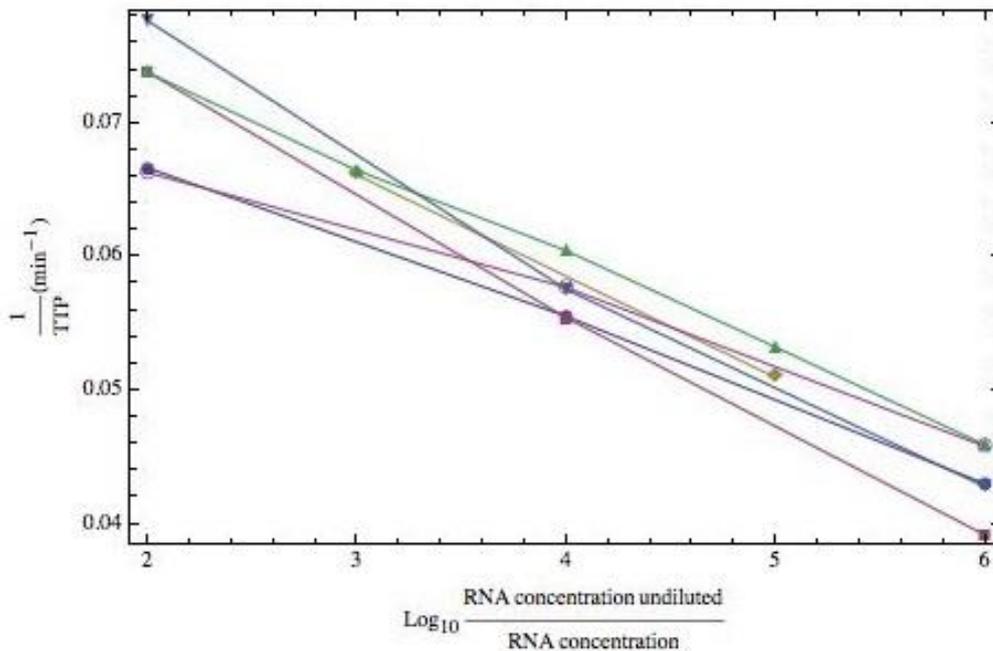


Abbildung 20: Verdünnungsreihen der Pfs16-NASBA-Läufe. J. Shock und K. Kast

3.6 Theoretisches Detektionslimit

Für die Pfs16-mRNA Zielsequenz hat sich ein theoretisches Detektionslimit von 28,6 RNA Kopien pro μL (Standardabweichung 43,05) ergeben und für Pfs25 ein Limit von 342 RNA Kopien pro μL .

3.7 Vergleich von Fingerprick- vs. venösem Blut von Pfs16 und Pfs25

Der quantitative Vergleich des RNA-Gehalts in Fingerprick-Blut, verglichen mit venösem Blut, hat für Pfs16 einen durchschnittlich 1,4-fach höheren RNA-Gehalt in Fingerprick-Blutproben ergeben. Durchschnittlich 10 Millionen RNA-Kopien in 100 μL Fingerprick stehen im Verhältnis zu 7 Millionen Kopien in 100 μL venösem Blut (Abbildung 21). Dabei korrespondieren 25 μL Blut aus der Fingerbeere mit 35,75 μL Blutvolumen aus der Vene. Nicht-parametrische Analysen mittels des Vorzeichentests ergaben, dass in 100 μL Fingerprick-Blutproben nahezu

immer ein größerer RNA-Gehalt und damit eine größere Gametozyten-Dichte im Vergleich zu 100 μL venösem Blut zu detektieren wäre (p -Wert < 0.001).

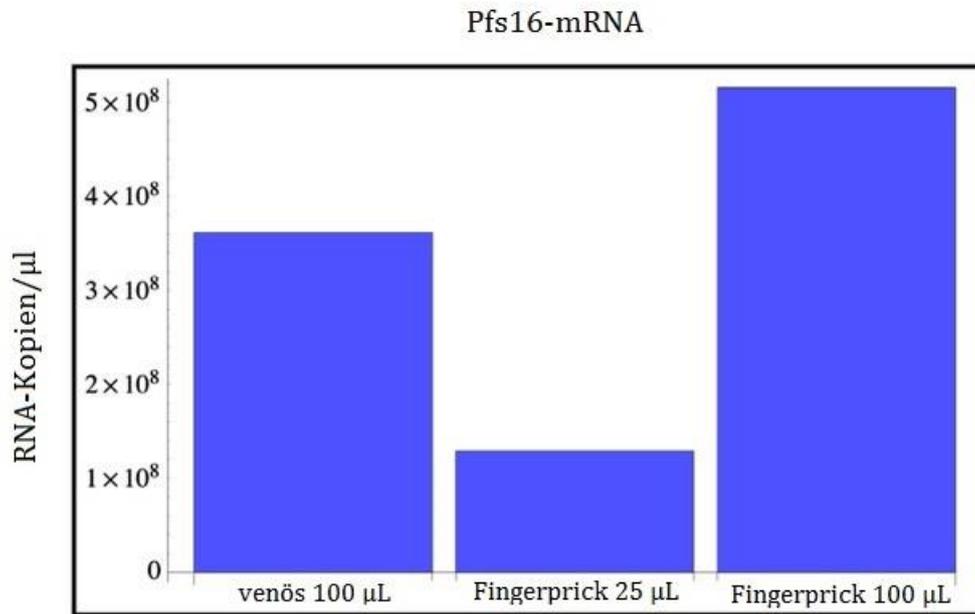


Abbildung 21: Quantitativer Vergleich zwischen Fingerprick und venösen Blutproben für Pfs16.
J. Shock und K. Kast

Quantitative Analysen für die Pfs25-mRNA haben ergeben, dass in theoretischen 100 μL Fingerprick-Blut ein 3,3-fach größerer Gehalt an RNA im Vergleich zu venösen Proben ist (Abbildung 22). Dabei stehen 250.000 RNA Kopien pro μL in 100 μL Fingerprick-Blut im Verhältnis zu durchschnittlich 75.000 RNA-Kopien pro μL in 100 μL venösem Blut. 25 μL des Fingerprick Blutes korrespondieren mit 82,6 μL venösem Blut.

4 von 15 Blutproben blieben komplett negativ und einmal konnte im Fingerprick-Blut keine Pfs25-mRNA nachgewiesen werden, im venösen jedoch schon. Bei den positiven Detektionen war in 9 von 10 Fällen in theoretischen 100 μL Fingerprick-Blut ein, verglichen zu venösem Blut, höherer RNA-Gehalt. Dies ergab mittels Monte-Carlo-Simulationstest ein signifikantes Ergebnis (p -Wert < 0.006). Die Nullhypothese, dass in 100 μL Fingerprick-Blut ein gleich hoher RNA-Gehalt wie in 100 μL venösem Blut zu detektieren wäre, konnte mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verworfen werden (p -Wert < 0.002).

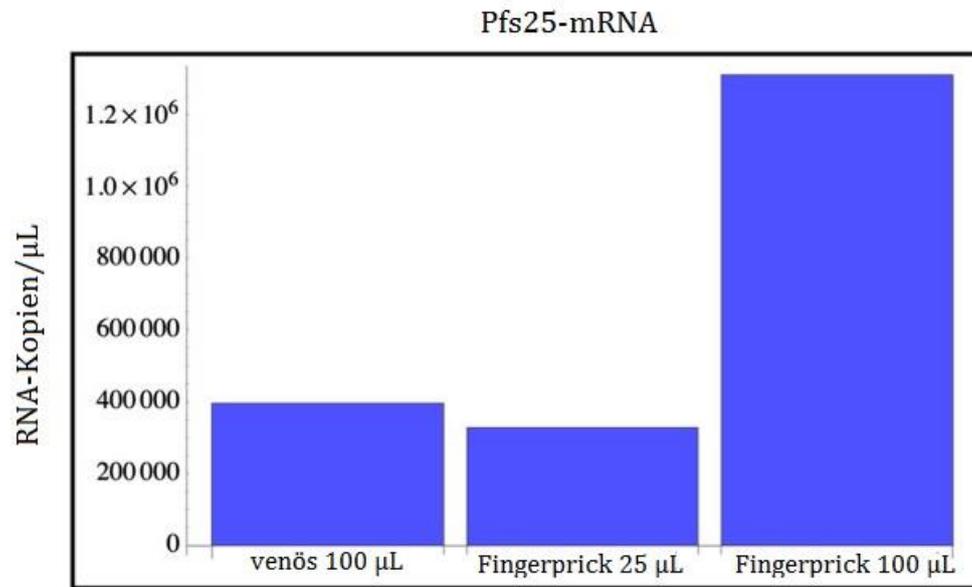


Abbildung 22: Qualitativer Vergleich zwischen Fingerprick und venösen Blutproben für Pfs25.
J. Shock und K. Kast

4. Diskussion

4.1 Diskussion der qualitativen Ergebnisse

4.1.1 Pfs16-mRNA

In dieser Studie wurden 90 Proben von 15 mit *Plasmodium falciparum* infizierten Patienten aus dem Südwesten Äthiopiens mittels QT-NASBA untersucht. Die mikroskopischen Untersuchungen der Blutaustriebe ergaben eine milde Parasitämie bei allen Patienten und in 2/3 eine extrem niedrige Gametozytendichte. In 1/5 der Blutaustriebe wurden keine Gametozyten gesichtet. In allen Blutproben konnte Pfs16-mRNA, was als frühester Marker für die Ausbildung von Gametozyten gilt, detektiert werden.

Der Nachweis von Gametozyten-spezifischer-mRNA in Speichel, Urin und Mundschleimhaut war niedrig für Pfs16. Entweder ist der Nachweis von reifen Gametozyten in diesem Milieu gar nicht möglich oder die Sensitivität der genutzten Methode ist zu gering. Der Nachweis von Pfs16 gelang lediglich in 20% der Urinproben und 13,3% der Speichel- und Mundschleimhautproben, die auf Filterpapier gestrichen wurden. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Primern (Tabelle 1) wurde für Pfs16 ein 111 bp und für Pfs25 ein 156 bp langes Nukleinsäurefragment amplifiziert. Es ist bekannt, dass mRNA fragil ist und außerhalb der Zelle schnell zersetzt wird. Das Milieu im Urin, im Speichel und auf der Mundschleimhaut trägt zu der Instabilität bei. Ein Erklärungsansatz für die geringe Sensitivität der Methode ist somit auch der Verdau der mRNA in kleine Fragmente, die nicht mehr die Bindestellen für die gewählten Primer enthalten.

4.1.2 Pfs25-mRNA

Pfs25-mRNA wurde nur in 11 von 15 Proben detektiert. Die Pfs25-mRNA Transkripte werden nur in weiblichen Stadium V, also in Form reifer Gametozyten, gebildet (Delves et al. 2013). Malaria ist in endemischen Gebieten eine weit verbreitete Krankheit mit typischen Symptomen. Oft ahnen die Betroffenen schon frühzeitig, dass sie infiziert sind und suchen ein Health-Center auf, um Diagnose und Behandlung zu bekommen. Bis reife Gametozyten im Blutstrom detektiert werden können, vergehen allerdings 7 bis 15 Tage nach initialem, asexuellem Multiplikationszyklus (Day et al. 1998, Eichner et al. 2001). Die wahrscheinlichste Erklärung für den geringeren Nachweis von Pfs25-mRNA in den Patientenproben ist daher,

dass die Diagnosestellung bei 4 von 15 Patienten vor der Ausbildung reifer Gametozyten erfolgte.

Eine Fingerprick-Blutprobe blieb für Pfs25 negativ, obwohl die venöse Probe des gleichen Patienten positiv war. Im Blutaussstrich desselben Patienten wurden keinerlei Gametozyten gesichtet, womit von einer sehr niedrigen Gametozytendichte auszugehen ist. Die Gametozytendichte im Kapillarblut scheint zwar höher zu sein als in venösem Blut, dennoch wurden nur 25 μL dessen im Vergleich zu 100 μL venösem Blut untersucht. Bei niedrigen Dichten erhöht man die Wahrscheinlichkeit einer positiven Detektion mit Erhöhung des zu untersuchenden Volumens. Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses diskordante Paar ist demnach, dass in 25 μL aus der Fingerbeere zufällig keine Gametozyten miterfasst wurden, was in der niedrigen Gametozytendichte einerseits und im geringen Blutvolumen andererseits begründet sein dürfte.

In Speichel, Urin und Mundschleimhaut ließ sich Pfs25 in keiner Probe nachweisen. Hierfür dient der gleiche Erklärungsansatz, wie bereits oben beschrieben.

4.1.3 18S-rRNA

Die Untersuchung der Proben auf 18S-rRNA, also auf das Vorhandensein von asexuellen und sexuellen parasitären Stadien ergaben, wie erwartet, 100% positive Ergebnisse bei den Fingerprick-Proben. Eine venöse Blutprobe blieb jedoch auch nach wiederholter Extraktion und Analyse negativ, obwohl die Parasitämie des Patienten im geometrischen Mittel lag. Eine Inhibition der Probe und eine Mutation an den Primerbindestellen konnten ausgeschlossen werden, da die korrespondierende Fingerprick-Probe positiv war.

Das Nukleinsäurefragment, welches mittels der gewählten Primer (Tabelle 1) amplifiziert wurde, betrug eine Länge von 100 bp und war damit das kleinste, der drei gewählten Zielsequenzen. Mit einer Sensitivität von 80% konnte die rRNA in Speichelproben nachgewiesen werden und zwei Drittel der Proben waren im Urin positiv (66,6%). Möglich ist, dass die bessere Detektion von 18S-rRNA in der kleinen Größe des Fragments begründet ist.

In einer Studie von Nwakanma et. al. (Nwakanma et al. 2009) wurden Urin, Speichel- und Blutproben von 386 Patienten mit Malariasymptomatik auf das Vorhandensein von DNA asexueller parasitärer Formen mittels PCR untersucht. Der DNA-Gehalt in den Proben wurde mittels real-time quantitativer PCR geschätzt und zeigte eine signifikante Korrelation in Speichelproben verglichen mit den ausgezählten Parasitendichten unter dem Mikroskop ($p=0.58$; $P<0.01$). Für

Urin zeigte sich auch eine positive, aber nur schwache Korrelation ($p=0.20$; $P=0.117$). Der Mittelwert des DNA-Gehalts in den Blutproben, verglichen mit den Mittelwerten der Speichel- und Urin-Proben, ergab einen 600, bzw. 2500 größeren Gehalt. Die Detektion von DNA asexueller Parasiten in Speichel gelang im Vergleich zu mikroskopisch positiven Proben mit einer Sensitivität von 73% und Spezifität von 97%. Bei Proben mit einer Parasitämie >1000 Parasiten/ μL lag die Sensitivität bei 82%. Für Urin ergab sich eine Sensitivität von 32% und Spezifität von 98%. Obwohl die in dieser Studie gewählten amplifizierten Zielsequenzen mit 157-165 bp größer waren, als die in meiner Arbeit gewählten Sequenzen, konnte für den Nachweis von RNA in Speichelproben eine ähnliche Sensitivität erreicht werden und in Urinproben mit 67% eine höhere Sensitivität. Der geometrische Mittelwert der Parasitämie in der Studie von Nwakanma et. al. lag jedoch bei 1,785 Parasites/ μL (KI 95% 695–4,588 Parasiten/ μL) und somit niedriger als der Mittelwert der Dichte in dieser Studie mit 9,320 Parasiten/ μL (KI 95% 7,298/ μL -11,701/ μL). Es ist anzunehmen, dass die Sensitivität der Nachweismethode von sowohl DNA als auch RNA in Speichel und Urin sinkt, je niedriger die Parasitendichte ist. Ein weiterer Unterschied ist, dass die Proben in der beschriebenen Studie direkt weiterverarbeitet wurden und nicht wie in dieser Arbeit beschrieben, zuvor auf Filterpapier konserviert wurden. Eine Studie von Pritsch et. al. zeigte jedoch für die Detektion von mRNA, dass eine höhere Sensitivität erreicht wird, wenn Blutproben vor der Weiterverarbeitung auf Filterpapier pipettiert und getrocknet werden (Pritsch et al. 2012). Der Vorteil der RNA Detektion gegenüber der Detektion von DNA ist, dass sie das Vorhandensein eines noch lebenden Organismus indiziert. Die DNA Detektion könnte auch noch einige Tage nach medikamentöser Behandlung und Heilung der akuten Infektion positiv ausfallen.

Auch Mharakurwa et. al. untersuchten Urin und Speichelproben von *Plasmodium falciparum*-infizierten mittels PCR. Dabei wurden Proben größtenteils asymptomatischer Patienten mit einem geometrischen Mittel einer Parasitendichte von 775 asexuellen Parasiten/ μL (KI 95% 417/ μL -1439/ μL) untersucht. Der DNA Gehalt war in Speichelproben 1,6-fach ($p=0.029$) größer als in Urin-Proben. Auch in dieser Studie wurden längerer Zielsequenzen zwischen 370 bp und 750 bp gewählt, wobei die kürzeren Zielsequenzen bessere Ergebnisse lieferten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Extraktionsmethoden einen relevanten Einfluss auf die erfolgreiche Amplifikation haben (Mharakurwa et al. 2006).

Interessant sind auch die qualitativen Ergebnisse der beiden Mundschleimhautabstriche. Einer der beiden Mundschleimhautabstriche wurde direkt nach Entnahme von der Wangeninnenseite auf ein Filterpapier gestrichen, während der andere direkt getrocknet wurde. Bei der Extraktion wurde somit einmal das Filterpapier ausgeschnitten und in Lysepuffer gegeben und einmal direkt das Köpfchen des zweiten Mundschleimhautabstriches abgeschnitten und in Lysepuffer verarbeitet. Die Proben, die auf Filterpapier gestrichen wurden, waren zu 53,3% positiv, während der Mundschleimhautabstrich, der direkt weiterverarbeitet wurde, nur in 13,3% der Fälle positiv war. Wie schon zuvor erwähnt und von Pritsch et. al. beschrieben, eignet sich das Whatman 3MM Chromatographie Filterpapier besonders gut für die Konservierung von Nukleinsäuren (Pritsch et al. 2012). Dies ist besonders wichtig bei der Verarbeitung von Proben mittels moderner, molekularer Detektionstechniken, da hierfür ein Labor erforderlich ist und die Filterpapiere somit als Konservierungs- und Transportmedium der Proben dienen.

4.2 Diskussion der quantitativen Ergebnisse

Die Quantifizierung der Patientenproben bezüglich ihres RNA Gehalts hat für Pfs16 ein theoretisches Detektionslimit von 28,6 RNA Kopien pro μL (Standardabweichung 43,05) ergeben und für Pfs25 ein ca. 10xfach weniger sensitives Limit von 342 RNA Kopien pro μL . Es gibt derzeit jedoch noch keine Veröffentlichungen zu stadien-spezifischen Expressionsanalysen; durchschnittliche Konzentrationen der spezifischen Transkripte sind daher unbekannt. Der Unterschied zwischen den Detektionslimits kann auch in der unterschiedlichen Bindungsaffinität eines jeden Primers begründet sein. Außerdem hat sich das Detektionslimit für Pfs16 als Mittelwert aus Analysen von sechs NASBA-Läufen ergeben, das Limit für Pfs25 ergab sich jedoch aus einem einzigen, großen NASBA-Lauf. Daher konnte für das Detektionslimit von Pfs25 keine Standardabweichung errechnet werden; er ist daher nur eingeschränkt aussagekräftig.

Wie erwartet (Sutherland 2009), hat der quantitative Vergleich von Fingerprick-Proben und venösen Blutproben einen 1,4-fach höheren RNA-Gehalt für Pfs16 und einen 3,3-fach höheren Gehalt für Pfs25 in Fingerprick-Proben ergeben. Im peripheren Blut sind nur Stadium I Gametozyten, die sich morphologisch nicht von asexuellen Stadien unterscheiden, und Stadium V Gametozyten enthalten. In den Zwischenstadien ihrer Entwicklung sequestrieren sich die Gametozyten vom Blutstrom. Der unterschiedliche Gametozytengehalt ist für Stadium V

Gametozyten (Pfs25) deutlicher ausgefallen, als für Stadium I und V (Pfs16) Gametozyten. Für eine erfolgreiche Gametogenese im Darm der Anopheles-Mücke und somit Transmission ist die Aufnahme reifer Stadium V Gametozyten zwingend erforderlich. Die Chance erhöht sich bedeutend, wenn sich die reifen Gametozyten im Kapillarblut aufhalten, da die Mücke die Haut durchsticht und Kapillarblut während ihrer Mahlzeit aufnimmt. Durch diese Annahme lässt sich der deutliche Unterschied des RNA Gehalts reifer Gametozyten im Fingerprick-Blut erklären. Für Screening Verfahren von reifen Gametozyten in Populationen endemischer Malariagebiet eignet sich daher die Fingerprick-Probe am besten, da sie in jedem Health-Center einfach zu gewinnen ist.

4.3 Diskussion der Methoden

4.3.1 Umgang mit RNA

Die Strukturen von DNA und RNA sind sehr ähnlich. Im Gegensatz zu DNA liegt RNA jedoch meist einzelsträngig vor, was ihr chemische Interaktionen erlaubt, vor denen die DNA, die doppelsträngig vorliegt, geschützt ist. Ein Nukleotid, Baustein sowohl der RNA als auch der DNA, besteht aus einer Ribose, einem Zucker mit 5 Kohlenstoffatomen, einem Phosphatrest und einer organischen Base. An der 2. Position des Pentose-Ringes hat die RNA anstelle eines Wasserstoffatoms jedoch eine Hydroxylgruppe. Diese Hydroxylgruppe ist für die Instabilität der RNA verantwortlich, da sie genau wie die Hydroxylgruppe an der 3. Stelle Bindungen zu Phosphatresten eingehen kann, was zur Folge hat, dass die RNA in ihrer Nukleinsäuresequenz unterbrochen wird. Dieses Wissen macht man sich z.B. auch bei der Sequenziermethode mittels 2,3-di-Desoxynukleotiden, welche auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam, zu Nutze.

Der Abbau von RNA erfolgt durch hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen durch sogenannte RNasen. Diese RNasen kommen ubiquitär vor, so z.B. in Schweiß. Daher sind beim Arbeiten mit RNA besondere Vorsichtsmaßnahmen zu treffen und ist stets auf ein sorgfältiges Arbeiten und eine korrekte Lagerung zu achten (Perez-Novo et al. 2005), um einen Zerfall der RNA und somit Verfälschung der Analyseergebnisse zu vermeiden. Daher wurde bei der Umsetzung dieser Arbeit sorgfältig auf ein Reinigen der Arbeitsflächen mit RNaseZap, ein RNase zerstörendes Reagenz, geachtet, und die Verarbeitung von RNA-Proben erfolgte stets auf Eis und unter einer sterilen Arbeitsbank mit Abzug und Reinigungsmöglichkeit durch UV-Licht. Die Extraktionseluat und die Verdünnungsreihen wurden bei -80°C gelagert, um möglichst wenig Zerfall zu verursachen.

4.3.2 Quantifizierung von RNA

Die Quantifizierung der Patientenproben erfolgte, um verschiedene Proben bezüglich ihres RNA-Gehalts miteinander zu vergleichen. Um den RNA-Gehalt in Proben zu bestimmen, stehen verschiedene Methoden wie die Spectrophotometrie (NanoDrop; Thermo Scientific), Kapillar-Gel-Elektrophorese (Qiagen's QIAxcel), Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen (Ambion/Applied Biosystem's RiboGreen) und Analysen von Mikroflüssigkeiten (Agilent Technologie's Bioanalyzer; Bio-Rad Laboratories's) zur Verfügung. Jede Methode erbringt unterschiedliche Ergebnisse. Damit die Proben untereinander vergleichbar sind, sollte immer die gleiche Technik angewendet werden (Bustin et al. 2009).

In einer Arbeit von Fleige und Pfaffl wurden die Messung der optischen Dichte, die NanoDrop Messung und Techniken der Mikroflüssigkeiten-Analyse (BioAnalyzer und Experion) bezüglich ihrer Ergebnisse der RNA Quantitäts- und Qualitätsprüfung miteinander verglichen (Fleige and Pfaffl 2006). Bei den Analysen von Mikroflüssigkeiten oder auch „Lab-on-Chip“ Methoden durch Bioanalyzer oder Experion werden RNA-Proben auf einem Mikrochip elektrophoretisch getrennt und anschließend durch Laser-induzierte Fluoreszenzen detektiert. Hierfür ist nur ein sehr geringer RNA-Gehalt von 200 pg notwendig. Durch Benutzung einer RNA-Leiter lassen sich die Größen der RNA-Fragmente schätzen, und durch Visualisierung der RNA in einem Elektropherogramm lässt sich die Integrität und Reinheit der RNA darstellen. Unter Integrität ist in diesem Zusammenhang die Degradierung der RNA zu verstehen und in welchem Maß die eingesetzte Analyseprobe intakt ist. Bei der NanoDrop-Methode und NanoDrop in Kombination mit einem RNA RiboGreen Fotomarker sind zusätzlich zu der spectrophotometrischen Messung eine zusätzliche Auftrennung der RNA Fragmente durch Gel-Elektrophorese notwendig. Dafür ist allerdings ein hoher RNA-Gehalt notwendig und die Beurteilung bezüglich des RNA-Zerfalls, also der Degradierung, ist schwerfällig (Bustin and Nolan 2004). Die „Lab-on-Chip“-Methode hat sich als bequemste und objektivste Technik bei der Beurteilung von RNA Qualität erwiesen. Sie wird vielfach eingesetzt (Mueller et al. 2000, Bustin 2002, Fleige and Pfaffl 2006) und wurde daher in dieser Arbeit als Mittel der Wahl für die Analysen der RNA-Verdünnungsreihen gewählt. Da in der Verdünnungsreihe durch *in vitro*-Transkription spezifische mRNA-Abschnitte produziert wurden, konnte die Qualität der RNA nicht bezüglich des häufig genutzten „RIN's“ beurteilt werden, sondern lediglich durch die visuelle Darstellung mittels Elektropherogramm. Der RIN bedeutet „RNA Integrity Number“ und ergibt sich aus dem Verhältnis der 18S und 28S ribosomalen Untereinheiten. Daher wurde

zusätzlich eine spectrophotometrische Messung der künstlich hergestellten RNA mittels NanoDrop durchgeführt. Die RNA-Qualität ergibt sich hierbei aus dem Verhältnis der detektierten Signale bei 260 nm und 280 nm. Dabei sind die Signale bei 260nm spezifisch für Nukleinsäuren und bei 280 nm für Proteine. Von guter RNA-Qualität geht man ab einem Verhältnis 260 nm/280 nm von $> 1,8$ aus (Fleige and Pfaffl 2006). Die Messung der in dieser Arbeit vorgestellten Verdünnungsreihe hat ein Verhältnis von 2,24 ergeben.

4.3.3 Konservierung der Proben auf Filterpapier

Wie bereits beschrieben, ist RNA sehr zerfallsanfällig. Um die Patientenproben aus Äthiopien nach Deutschland zu bekommen, war ein geeignetes Transportmedium notwendig. Dafür hat sich das Konservieren der Flüssigkeiten auf Whatman 3MM Chromatographie-Filterpapier etabliert. In einer Arbeit von Pritsch et. al. (Pritsch et al. 2012) wurde der Zerfall von Proben auf Filterpapier bei unterschiedlichen Lagerungsmöglichkeiten analysiert. Verglichen zu Proben, die direkt extrahiert wurden, wurde auf Proben, die zuvor auf Filterpapier konserviert wurden, ein signifikanter höherer RNA-Gehalt festgestellt ($p=0.002$). Eine Verarbeitung der Proben innerhalb von 28 Tagen ergab eine Zerfallsrate von 20%. Es zeigte sich, dass die Zerfallsrate bei Proben, die bei -20°C gelagert wurden, am geringsten ausfiel. Bei der Lagerung der Proben, die in dieser Arbeit analysiert wurden, wurde daher sowohl auf ein schnelles Weiterverarbeiten als auch auf ein Aufrechterhalten der Kühlkette geachtet. Die Filterpapiere wurden in Äthiopien, nachdem sie getrocknet und in Plastiktütchen verstaut waren, bei -30°C gelagert. Anschließend wurden sie auf Trockeneis nach Deutschland transportiert und dort im -20°C Eisfach gelagert. Alle Proben wurden innerhalb eines Monats extrahiert und analysiert.

4.3.4 QT-NASBA

Für den Nachweis und die Quantifizierung des Gametozyten-Gehalts mittels moderner, molekularer Detektionsmethoden haben sich besonders die NASBA-Methode und die PCR etabliert. Diese modernen Techniken sind notwendig, da der mikroskopische Nachweis von Gametozyten nicht sensitiv genug ist und submikroskopische Level vielfach zur Mosquitoinfektion führen (Schneider et al. 2007). Für die NASBA und die PCR haben sich ein Detektionslimit von 0,02 Gametozyten/ μL errechnet und es konnte gezeigt werden, dass eine Mosquitoinfektion bei Dichten unter 0,25-0,30 Gametozyten pro μL unwahrscheinlich ist (Schneider et al. 2007). Beide Methoden eignen sich daher für den Nachweis relevanter Gametozyten-Dichten. Eine Arbeit von Schneider et. al. verglich daher diese beiden Methoden,

und auch wenn beide ähnliche Sensitivitäten erbrachten, stellte sich die NASBA als vorteilhafter in der Umsetzung heraus (Schneider et al. 2005). Dies ist im Wesentlichen in zwei Vorteilen begründet: Bei der NASBA kann RNA direkt in den Amplifikationsprozess eingesetzt werden, während die RNA bei der Benutzung der PCR zuvor durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden muss. Da dieser Schritt bei der NASBA entfällt, wird Zeit gespart und somit auch weniger Gelegenheit für die Kontamination und den Zerfall der RNA geboten. Der zweite Vorteil ist, dass der Amplifikationsprozess bei der NASBA nicht in Zyklen mit verschiedenen Temperaturen stattfindet, wie bei der PCR, sondern isothermal. Dadurch muss das Gerät seine Temperaturen nicht auf- und ab-regulieren, sondern läuft konstant bei 42°C, wodurch sich erneut eine Zeitersparnis ergibt. Bei der isothermalen Temperatur von 42°C bleibt DNA doppelsträngig und dient somit nicht als Substrat bei der Amplifikation. Aus diesen Gründen wurde für die Analyse der Patientenproben in der vorliegenden Arbeit die NASBA-Methode gewählt. In einer Studie von Rodríguez-Làzaróa konnte jedoch gezeigt werden, dass teilweise und unerwartet dennoch DNA durch die NASBA detektiert werden kann, was bei der Analyse des Patientenmaterials mit in Betracht gezogen werden sollte (Rodriguez-Lazaro et al. 2004).

4.4 Schwachpunkte der Studie

Größter Kritikpunkt dieser Arbeit ist die geringe Fallzahl mit 15 Malaria tropica-Fällen und 90 untersuchten Proben. Bei 4 von 15 Patienten waren bei Probensammlung noch keine reifen Gametozyten ausgebildet, weshalb die Ergebnisse nur eingeschränkt aussagekräftig sind, aber dennoch eine deutliche Richtung zeigen. Diese Studie ist somit als Pilotprojekt zu betrachten, das für weitere Untersuchungen mit größerer Probandenzahl wegweisend ist.

Bustin et. al. haben für die Publikation von Studien mittels quantitativer Real-time-PCR Richtlinien beschrieben, die einen Konsens bei Interpretation und Evaluation der Ergebnisse der jeweiligen Studie schaffen sollen (Bustin et al. 2009). Diese sogenannten MIQE-Guidelines sind auch auf die Veröffentlichung von Daten mittels QT-NASBA anzuwenden. Die Durchführung dieser Studie hat sich dabei an diesen Richtlinien orientiert, jedoch wurde pro Patient jeweils nur eine Probe pro Materialtyp (6 Analysen pro Patient) untersucht. Zwei- oder dreifach-Untersuchungen hätten eine bessere Aussagekraft der Sensitivität erbracht. Hierauf wurde jedoch in Anbetracht, dass die Studie ein Pilotprojekt ist, und aus Kostengründen verzichtet.

4.4 Schlussfolgerung

Nicht-invasiv gesammeltes Material wie Urin, Speichel und Mundschleimhautproben haben sich als nicht geeignetes Material für die Detektion von Gametozyten-spezifischer-mRNA mit den in dieser Arbeit verwendeten Zielsequenzen herausgestellt. Wie erwartet, konnte in Fingerprick-Proben der größte absolute Gehalt an RNA Kopien pro μL , besonders für reife Gametozyten, nachgewiesen werden. Im Vergleich von 25 μL Fingerprick und 100 μL venösem Blut liefern die Fingerprick-Proben durchschnittlich 17,4% weniger RNA Kopien. Dieser Unterschied ist zu tolerieren, wenn man bedenkt, dass die Probengewinnung durch einen Stich in die Fingerbeere in jedem Health-Center leicht durchführbar ist und nur geringere Kosten verursacht als die Entnahme einer Blutprobe durch Venenpunktion. Kleine Kinder und Schwangere sind besonders häufig von Malaria betroffen, und eine kleine Blutprobe aus der Fingerbeere ist ethisch mehr zu akzeptieren als die Punktion der Vene, die mehr Infektionsgefahr mit sich bringt, mehr Materialkosten verursacht und gelerntes praktisches Vorgehen durch die Untersucher erfordert.

Daher ist für zukünftige Gametozyten-Screenings die Probenentnahme durch Fingerprick zu empfehlen, sofern sich die gezeigte höhere Gametozyten-Dichte auch in asymptomatischen Gametozyten-Trägern bestätigt. Die Filterpapiere, auf denen die Proben konserviert werden, können bei Raumtemperatur lagern, wenn sie innerhalb von 28 Tagen weiterverarbeitet werden. Dabei ist mit einem RNA-Verlust von 20% zu rechnen. Ist die Lagerungszeit bei Raumtemperatur länger als ein Monat, ist der RNA-Verlust zu hoch und nicht zu tolerieren (Pritsch et al. 2012). Für groß angelegte Prävalenzstudien wäre ein Schnelltest von großem Vorteil, da die Lagerungsproblematik, Aufrechterhaltung einer Kühlkette, komplizierte Analyseprozesse und Kosten entfallen würden.

Um in zukünftigen Eradikationsvorhaben die Transmission zu stoppen, müssen auch asymptomatische Gametozyten-Träger untersucht, also auch potentiell Gesunde Menschen getestet werden. Die Gametozyten-Dichten könnten bei diesen Menschen geringer sein, als bei symptomatisch Erkrankten. Um dies herauszufinden, sollten größer angelegte Studien erfolgen, die die Gametozyten-Dichten in asymptomatischen Trägern analysieren.

Für den Nachweis von RNA asexueller und sexueller Parasiten erwiesen sich Urin und Mundschleimhautproben als nicht geeignetes Material. In Speichel gelang jedoch der Nachweis mit einer Sensitivität von 80%. Diese Erkenntnis kann in zukünftigen nicht-invasiven Studien

genutzt werden. Die Wahl von kleineren Zielsequenzen könnte die Sensitivität erhöhen. Speichel könnte auf verschiedene Krankheiten, inklusive Malaria, getestet werden. Für vereinfachte Diagnose und schnelle Behandlung wäre hierfür ein vor Ort anwendbarer Schnelltest von Vorteil.

5. Zusammenfassung

Die Malaria ist immer noch ein führendes Gesundheitsproblem unserer Zeit. Für zukünftige Eradikationspläne ist es notwendig neue Ansätze zu verfolgen. Ein bisher vielfach vernachlässigtes Thema ist dabei die Transmission der Erkrankung, für die die sexuelle Erregerform der Malaria, die Gametozyten, verantwortlich sind. Die Träger von Gametozyten definieren also das infektiöse Reservoir. In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass submikroskopische Gametozyten-Dichten beim Träger ausreichend für eine Transmission der Mücke sind. Die QT-NASBA, als moderne molekulare Detektionstechnik, hat sich als geeignete Methode für die Detektion Gametozyten-spezifischer-mRNA erwiesen. Die DNA asexueller Stadien lässt sich sensitiv in Speichel und teilweise in Urin nachweisen. Für Gametozyten-spezifische-mRNA wurde dies noch nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war daher zu prüfen, ob dies in Patientenproben von Malaria tropica-Patienten in Urin-, Speichel- und Mundschleimhautproben möglich ist, um zukünftig ein nicht-invasives Verfahren für die Gametozytendetektion zu entwickeln. Ein weiteres Ziel war es, den Gehalt an mRNA in venösen und Fingerprick-Proben quantitativ zu vergleichen, um herauszufinden, welches die sensitivste Methode im Feld ist.

Für die Quantifizierung wurden mittels Klonierung Verdünnungsreihen künstlich hergestellter mRNA angefertigt. Durch Ermittlung des mRNA Gehalts und über das Molekulargewicht der jeweiligen Zielsequenz konnte die Anzahl der mRNA-Kopien/ μL berechnet werden. Als Zielsequenzen wurden in dieser Arbeit das Pfs16-mRNA Transskript, als frühester Marker der Gametozytogenese, und das Pfs25-mRNA Transskript, das nur in reifen, weiblichen Gametozyten gebildet wird, ausgewählt. Außerdem wurde die 18S-rRNA detektiert, welche sowohl in sexuellen, als auch in asexuellen Stadien exprimiert wird.

Im Südwesten Äthiopiens wurden 15 Malaria tropica-positive Patienten rekrutiert und 90 Proben mittels QT-NASBA analysiert. Die Detektion Gametozyten-spezifischer-mRNA gelang in Pfs16 mit 20% Detektion im Urin, als bestes Ergebnis, nur schlecht und in Pfs25 gar nicht. Die Detektion der 18S-rRNA gelang jedoch mit einer Sensitivität von 80% in Speichel und 67% in Urin. Der Nachweis von RNA lässt auf einen lebenden Organismus schließen und ist daher eine wichtige neue Erkenntnis. Der quantitative Vergleich der mRNA Kopien/ μL in Fingerprick- und venösen Proben hat ergeben, dass für die Ermittlung von Pfs25-mRNA 25 μL Fingerprick-Blut mit 83 μL venösem Blut korrespondiert. In 100 μL Fingerprick-Blut ist eine 3,3-fach höhere mRNA-Kopien-Anzahl pro μL verglichen mit 100 μL venösem Blut. Dies suggeriert, dass sich reife Gametozyten bevorzugt im Kapillarblut aufhalten, um ihre Chance zu erhöhen von der

Mücke aufgenommen zu werden. Für das Pfs16-Transkript waren diese Ergebnisse ähnlich, jedoch nicht ganz so deutlich, da Pfs16 in allen Stadien exprimiert wird und das Aufhalten in Kapillarblut nur für reife Gametozyten wichtig ist. 25 μL Fingerprick-Blut korrespondieren hier mit 36 μL venösem Blut, und in 100 μL Fingerprick-Blut ist der Gehalt der RNA-Kopien pro μL 1,4-fach erhöht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass für die in dieser Arbeit gewählten Zielsequenzen keine nicht-invasive Detektion von Gametozyten möglich ist. Da eine Fingerprick-Probe leicht in jedem Health-Center abgenommen werden kann und im Gegensatz zu der Abnahme venöser Proben, kostensparend und weniger invasiv ist, sollte für zukünftige Prävalenzstudien zur Ermittlung des infektiösen Reservoirs diese Methode gewählt werden. Jedoch muss die Methode noch für asymptomatische Gametozytenträger und in größerem Umfang untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Alano, P. (2007). "Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life." *Mol Microbiol* 66(2): 291-302.
- (2) Alonso, P. L., Brown, G., Arevalo-Herrera, M., et al. (2011). "A research agenda to underpin malaria eradication." *PLoS Med* 8(1): e1000406.
- (3) Amino, R., Thiberge, S., Shorte, S., et al. (2006). "Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host." *C R Biol* 329(11): 858-862.
- (4) Babiker, H. A., Abdel-Wahab, A., Ahmed, S., et al. (1999). "Detection of low level Plasmodium falciparum gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction." *Mol Biochem Parasitol* 99(1): 143-148.
- (5) Babiker, H. A., Schneider, P. and Reece, S. E. (2008). "Gametocytes: insights gained during a decade of molecular monitoring." *Trends Parasitol* 24(11): 525-530.
- (6) Bachmann, A., Esser, C., Petter, M., et al. (2009). "Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family expression in Plasmodium falciparum from a splenectomized malaria patient." *PLoS One* 4(10): e7459.
- (7) Backmund, M., von Zielonka, M., Hartmann, W. J., et al. (1999). "[Malaria--state of the art. I: Epidemiology, forms of malaria, diagnosis]." *Fortschr Med* 117(1-2): 20-24.
- (8) Baker, D. A. (2010). "Malaria gametocytogenesis." *Mol Biochem Parasitol* 172(2): 57-65.
- (9) Bano, N., Romano, J. D., Jayabalasingham, B., et al. (2007). "Cellular interactions of Plasmodium liver stage with its host mammalian cell." *Int J Parasitol* 37(12): 1329-1341.
- (10) Barry, A. E., Leliwa-Sytek, A., Tavul, L., et al. (2007). "Population genomics of the immune evasion (var) genes of Plasmodium falciparum." *PLoS Pathog* 3(3): e34.
- (11) Basco, L. K. (2003). "Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVII. Baseline monitoring of atovaquone-resistant Plasmodium falciparum by in vitro drug assays and cytochrome b gene sequence analysis." *Am J Trop Med Hyg* 69(2): 179-183.
- (12) Bejon, P., Andrews, L., Hunt-Cooke, A., et al. (2006). "Thick blood film examination for Plasmodium falciparum malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density." *Malar J* 5: 104.
- (13) Berenbaum, R. M. (1992). Blutsauger, Staatsgründer, Seidenfabrikanten - Die zwiespältige Beziehung von Mensch und Insekt. Heidelberg, Spektrum.
- (14) Biggs, B. A., Gooze, L., Wycherley, K., et al. (1990). "Knob-independent cytoadherence of Plasmodium falciparum to the leukocyte differentiation antigen CD36." *J Exp Med* 171(6): 1883-1892.

- (15) Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G., et al. (1997). "The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro." *Parasitology* 115 (Pt 1): 1-7.
- (16) Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- (17) Bledsoe, G. H. (2005). "Malaria primer for clinicians in the United States." *South Med J* 98(12): 1197-1204; quiz 1205, 1230.
- (18) Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., et al. (1990). "Rapid and simple method for purification of nucleic acids." *J Clin Microbiol* 28(3): 495-503.
- (19) Bousema, J. T., Gouagna, L. C., Drakeley, C. J., et al. (2004). "Plasmodium falciparum gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya." *Malar J* 3: 18.
- (20) Bousema, J. T., Schneider, P., Gouagna, L. C., et al. (2006). "Moderate effect of artemisinin-based combination therapy on transmission of *Plasmodium falciparum*." *J Infect Dis* 193(8): 1151-1159.
- (21) Bousema, T. and Drakeley, C. (2011). "Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination." *Clin Microbiol Rev* 24(2): 377-410.
- (22) Bousema, T., Okell, L., Shekalaghe, S., et al. (2010). "Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs." *Malar J* 9: 136.
- (23) Bruce, M. C., Alano, P., Duthie, S., et al. (1990). "Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development." *Parasitology* 100 Pt 2: 191-200.
- (24) Bruce, M. C., Carter, R. N., Nakamura, K., et al. (1994). "Cellular location and temporal expression of the *Plasmodium falciparum* sexual stage antigen Pfs16." *Mol Biochem Parasitol* 65(1): 11-22.
- (25) Buates, S., Bantuchai, S., Sattabongkot, J., et al. (2010). "Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes." *Parasitol Int* 59(3): 414-420.
- (26) Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J Mol Endocrinol* 29(1): 23-39.
- (27) Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., et al. (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clin Chem* 55(4): 611-622.
- (28) Bustin, S. A. and Nolan, T. (2004). "Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction." *J Biomol Tech* 15(3): 155-166.

- (29) Carter, R. and Mendis, K. N. (2002). "Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria." *Clin Microbiol Rev* 15(4): 564-594.
- (30) Chin, W., Contacos, P. G., Coatney, G. R., et al. (1965). "A Naturally Acquired Quotidian-Type Malaria in Man Transferable to Monkeys." *Science* 149(3686): 865.
- (31) Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., et al. (1979). "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease." *Biochemistry* 18(24): 5294-5299.
- (32) Ciceron, L., Jaureguiberry, G., Gay, F., et al. (1999). "Development of a Plasmodium PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment." *J Clin Microbiol* 37(1): 35-38.
- (33) Clark, I. A. and Schofield, L. (2000). "Pathogenesis of malaria." *Parasitol Today* 16(10): 451-454.
- (34) Compton, J. (1991). "Nucleic acid sequence-based amplification." *Nature* 350(6313): 91-92.
- (35) Cox-Singh, J., Davis, T. M., Lee, K. S., et al. (2008). "Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening." *Clin Infect Dis* 46(2): 165-171.
- (36) Daily, J. P. and Waldron, M. A. (2003). "Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 22-2003. A 22-year-old man with chills and fever after a stay in South America." *N Engl J Med* 349(3): 287-295.
- (37) Day, K. P., Hayward, R. E. and Dyer, M. (1998). "The biology of Plasmodium falciparum transmission stages." *Parasitology* 116 Suppl: S95-109.
- (38) de Koning-Ward, T. F., Olivieri, A., Bertuccini, L., et al. (2008). "The role of osmiophilic bodies and Pfg377 expression in female gametocyte emergence and mosquito infectivity in the human malaria parasite Plasmodium falciparum." *Mol Microbiol* 67(2): 278-290.
- (39) Deloron, P., Roux Lombard, P., Ringwald, P., et al. (1994). "Plasma levels of TNF-alpha soluble receptors correlate with outcome in human falciparum malaria." *Eur Cytokine Netw* 5(3): 331-336.
- (40) Delves, M. J., Ruecker, A., Straschil, U., et al. (2013). "Male and female Plasmodium falciparum mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs." *Antimicrob Agents Chemother* 57(7): 3268-3274.
- (41) Drakeley, C. J., Secka, I., Correa, S., et al. (1999). "Host haematological factors influencing the transmission of Plasmodium falciparum gametocytes to Anopheles gambiae s.s. mosquitoes." *Trop Med Int Health* 4(2): 131-138.
- (42) Dunyo, S., Milligan, P., Edwards, T., et al. (2006). "Gametocytaemia after drug treatment of asymptomatic Plasmodium falciparum." *PLoS Clin Trials* 1(4): e20.

- (43) Eiam-Ong, S. and Sitprija, V. (1998). "Falciparum malaria and the kidney: a model of inflammation." *Am J Kidney Dis* 32(3): 361-375.
- (44) Eichner, M., Diebner, H. H., Molineaux, L., et al. (2001). "Genesis, sequestration and survival of Plasmodium falciparum gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malariatherapy data." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(5): 497-501.
- (45) Fancony, C., Sebastiao, Y. V., Pires, J. E., et al. (2013). "Performance of microscopy and RDTs in the context of a malaria prevalence survey in Angola: a comparison using PCR as the gold standard." *Malar J* 12(1): 284.
- (46) Fivelman, Q. L., McRobert, L., Sharp, S., et al. (2007). "Improved synchronous production of Plasmodium falciparum gametocytes in vitro." *Mol Biochem Parasitol* 154(1): 119-123.
- (47) Fleige, S. and Pfaffl, M. W. (2006). "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance." *Mol Aspects Med* 27(2-3): 126-139.
- (48) Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., et al. (2004). "Imaging movement of malaria parasites during transmission by Anopheles mosquitoes." *Cell Microbiol* 6(7): 687-694.
- (49) Giemsa, G. (1904). "Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung." *Centralblatt für Bakteriologie I Abteilung* 32: 307-313.
- (50) Girard, M. P., Reed, Z. H., Friede, M., et al. (2007). "A review of human vaccine research and development: malaria." *Vaccine* 25(9): 1567-1580.
- (51) Goldie, P., Roth, E. F., Jr., Oppenheim, J., et al. (1990). "Biochemical characterization of Plasmodium falciparum hemozoin." *Am J Trop Med Hyg* 43(6): 584-596.
- (52) Greenwood, B. M. and Armstrong, J. R. (1991). "Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85(2): 186-188.
- (53) Guerra, C. A., Gikandi, P. W., Tatem, A. J., et al. (2008). "The limits and intensity of Plasmodium falciparum transmission: implications for malaria control and elimination worldwide." *PLoS Med* 5(2): e38.
- (54) Guttery, D. S., Holder, A. A. and Tewari, R. (2012). "Sexual development in Plasmodium: lessons from functional analyses." *PLoS Pathog* 8(1): e1002404.
- (55) Hall, N., Karras, M., Raine, J. D., et al. (2005). "A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses." *Science* 307(5706): 82-86.
- (56) Hasler, T., Handunnetti, S. M., Aguiar, J. C., et al. (1990). "In vitro rosetting, cytoadherence, and microagglutination properties of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from Gambian and Tanzanian patients." *Blood* 76(9): 1845-1852.

- (57) Hawass, Z., Gad, Y. Z., Ismail, S., et al. (2010). "Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family." *JAMA* 303(7): 638-647.
- (58) Hawking, F., Wilson, M. E. and Gammage, K. (1971). "Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65(5): 549-559.
- (59) Hayward, R. E., Tiwari, B., Piper, K. P., et al. (1999). "Virulence and transmission success of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4563-4568.
- (60) Hempelmann, E. and Krafts, K. (2013). "Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria." *Malar J* 12(1): 232.
- (61) Hopkins, H., Bebell, L., Kambale, W., et al. (2008). "Rapid diagnostic tests for malaria at sites of varying transmission intensity in Uganda." *J Infect Dis* 197(4): 510-518.
- (62) Janse, C. J., van der Klooster, P. F., van der Kaay, H. J., et al. (1986). "DNA synthesis in *Plasmodium berghei* during asexual and sexual development." *Mol Biochem Parasitol* 20(2): 173-182.
- (63) Janse, C. J., Van der Klooster, P. F., Van der Kaay, H. J., et al. (1986). "Rapid repeated DNA replication during microgametogenesis and DNA synthesis in young zygotes of *Plasmodium berghei*." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80(1): 154-157.
- (64) Khan, S. M., Franke-Fayard, B., Mair, G. R., et al. (2005). "Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology." *Cell* 121(5): 675-687.
- (65) Kilian, A. H., Metzger, W. G., Mutschelknauss, E. J., et al. (2000). "Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control." *Trop Med Int Health* 5(1): 3-8.
- (66) Killick-Kendrick, R. and Warren, M. (1968). "Primary exoerythrocytic schizonts of a mammalian *Plasmodium* as a source of gametocytes." *Nature* 220(5163): 191-192.
- (67) Kyabayinze, D. J., Tibenderana, J. K., Odong, G. W., et al. (2008). "Operational accuracy and comparative persistent antigenicity of HRP2 rapid diagnostic tests for *Plasmodium falciparum* malaria in a hyperendemic region of Uganda." *Malar J* 7: 221.
- (68) Lamparter, S., Schoner, K., Moll, R., et al. (2001). "[Fulminant course of falciparum malaria]." *Dtsch Med Wochenschr* 126(4): 76-78.
- (69) Lardeux, F. J., Tejerina, R. H., Quispe, V., et al. (2008). "A physiological time analysis of the duration of the gonotrophic cycle of *Anopheles pseudopunctipennis* and its implications for malaria transmission in Bolivia." *Malar J* 7: 141.
- (70) Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., et al. (2006). "Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data." *Lancet* 367(9524): 1747-1757.

- (71) Löscher, T. and Burchart, G.-D. (2010). *Tropenmedizin in Klinik und Praxis: mit Reise- und Migrationsmedizin*. 4. Auflage. Stuttgart, Thieme.
- (72) malEra Consultative Group on Monitoring, E. and Surveillance (2011). "A research agenda for malaria eradication: monitoring, evaluation, and surveillance." *PLoS Med* 8(1): e1000400.
- (73) McAllister, W. T. (1993). "Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)." *Cell Mol Biol Res* 39(4): 385-391.
- (74) Mendis, K., Rietveld, A., Warsame, M., et al. (2009). "From malaria control to eradication: The WHO perspective." *Trop Med Int Health* 14(7): 802-809.
- (75) Mens, P., Spieker, N., Omar, S., et al. (2007). "Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania." *Trop Med Int Health* 12(2): 238-244.
- (76) Meszoely, C. A., Erbe, E. F., Steere, R. L., et al. (1987). "Plasmodium falciparum: freeze-fracture of the gametocyte pellicular complex." *Exp Parasitol* 64(3): 300-309.
- (77) Mharakurwa, S., Simoloka, C., Thuma, P. E., et al. (2006). "PCR detection of Plasmodium falciparum in human urine and saliva samples." *Malar J* 5: 103.
- (78) Moody, A. (2002). "Rapid diagnostic tests for malaria parasites." *Clin Microbiol Rev* 15(1): 66-78.
- (79) Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., et al. (2001). "Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection." *Science* 291(5501): 141-144.
- (80) Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., et al. (2000). "A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation." *Electrophoresis* 21(1): 128-134.
- (81) Murray, C. J., Rosenfeld, L. C., Lim, S. S., et al. (2012). "Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis." *Lancet* 379(9814): 413-431.
- (82) Nadjm, B. and Behrens, R. H. (2012). "Malaria: an update for physicians." *Infect Dis Clin North Am* 26(2): 243-259.
- (83) Nagao, E., Kaneko, O. and Dvorak, J. A. (2000). "Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: qualitative and quantitative analyses of parasite-induced knobs by atomic force microscopy." *J Struct Biol* 130(1): 34-44.
- (84) Najera, J. A., Gonzalez-Silva, M. and Alonso, P. L. (2011). "Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955-1969)." *PLoS Med* 8(1): e1000412.
- (85) Nijhout, M. M. and Carter, R. (1978). "Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro." *Parasitology* 76(1): 39-53.

- (86) Nwakanma, D. C., Gomez-Escobar, N., Walther, M., et al. (2009). "Quantitative detection of Plasmodium falciparum DNA in saliva, blood, and urine." *J Infect Dis* 199(11): 1567-1574.
- (87) Ockenhouse, C. F., Ho, M., Tandon, N. N., et al. (1991). "Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1." *J Infect Dis* 164(1): 163-169.
- (88) Oguike, M. C., Betson, M., Burke, M., et al. (2011). "Plasmodium ovale curtisi and Plasmodium ovale wallikeri circulate simultaneously in African communities." *Int J Parasitol* 41(6): 677-683.
- (89) Ogwan'g, R. A., Mwangi, J. K., Githure, J., et al. (1993). "Factors affecting exflagellation of in vitro-cultivated Plasmodium falciparum gametocytes." *Am J Trop Med Hyg* 49(1): 25-29.
- (90) Okell, L. C., Drakeley, C. J., Ghani, A. C., et al. (2008). "Reduction of transmission from malaria patients by artemisinin combination therapies: a pooled analysis of six randomized trials." *Malar J* 7: 125.
- (91) Ouedraogo, A. L., de Vlas, S. J., Nebie, I., et al. (2008). "Seasonal patterns of Plasmodium falciparum gametocyte prevalence and density in a rural population of Burkina Faso." *Acta Trop* 105(1): 28-34.
- (92) Ouedraogo, A. L., Schneider, P., de Kruijf, M., et al. (2007). "Age-dependent distribution of Plasmodium falciparum gametocytes quantified by Pfs25 real-time QT-NASBA in a cross-sectional study in Burkina Faso." *Am J Trop Med Hyg* 76(4): 626-630.
- (93) Paaijmans, K. P., Cator, L. J. and Thomas, M. B. (2013). "Temperature-dependent pre-bloodmeal period and temperature-driven asynchrony between parasite development and mosquito biting rate reduce malaria transmission intensity." *PLoS One* 8(1): e55777.
- (94) Packard, R. M. (1997). "Malaria dreams: postwar visions of health and development in the Third World." *Med Anthropol* 17(3): 279-296.
- (95) Perez-Novo, C. A., Claeys, C., Speleman, F., et al. (2005). "Impact of RNA quality on reference gene expression stability." *Biotechniques* 39(1): 52, 54, 56.
- (96) Perkow, W. and Ploss, H. (2007). *Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, Paul Parey.
- (97) Pritsch, M., Wieser, A., Soederstroem, V., et al. (2012). "Stability of gametocyte-specific Pfs25-mRNA in dried blood spots on filter paper subjected to different storage conditions." *Malar J* 11: 138.
- (98) Raabe, A. C., Billker, O., Vial, H. J., et al. (2009). "Quantitative assessment of DNA replication to monitor microgametogenesis in Plasmodium berghei." *Mol Biochem Parasitol* 168(2): 172-176.

- (99) Rada, A. M., Moreno, C. and Blair, S. (2008). "[Successful in vitro culture of Plasmodium falciparum gametocytes]." *Biomedica* 28(4): 607-615.
- (100) Reece, S. E., Duncan, A. B., West, S. A., et al. (2005). "Host cell preference and variable transmission strategies in malaria parasites." *Proc Biol Sci* 272(1562): 511-517.
- (101) Reeve, P. A., Toaliu, H., Kaneko, A., et al. (1992). "Acute intravascular haemolysis in Vanuatu following a single dose of primaquine in individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." *J Trop Med Hyg* 95(5): 349-351.
- (102) Ribaut, C., Berry, A., Chevalley, S., et al. (2008). "Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human Plasmodium species." *Malar J* 7: 45.
- (103) Riehle, M. M., Markianos, K., Niare, O., et al. (2006). "Natural malaria infection in Anopheles gambiae is regulated by a single genomic control region." *Science* 312(5773): 577-579.
- (104) Robert, V., Read, A. F., Essong, J., et al. (1996). "Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of Plasmodium falciparum to Anopheles gambiae." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90(6): 621-624.
- (105) Rodriguez-Lazaro, D., Lloyd, J., Ikononopoulos, J., et al. (2004). "Unexpected detection of DNA by nucleic acid sequence-based amplification technique." *Mol Cell Probes* 18(4): 251-253.
- (106) Rolling, T., Schmiedel, S., Wichmann, D., et al. (2012). "Post-treatment haemolysis in severe imported malaria after intravenous artesunate: case report of three patients with hyperparasitaemia." *Malar J* 11: 169.
- (107) Rolling, T., Wichmann, D., Schmiedel, S., et al. (2013). "Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis." *Malar J* 12: 241.
- (108) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-491.
- (109) Schneider, P., Bousema, J. T., Gouagna, L. C., et al. (2007). "Submicroscopic Plasmodium falciparum gametocyte densities frequently result in mosquito infection." *Am J Trop Med Hyg* 76(3): 470-474.
- (110) Schneider, P., Bousema, T., Omar, S., et al. (2006). "(Sub)microscopic Plasmodium falciparum gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate." *Int J Parasitol* 36(4): 403-408.

- (111) Schneider, P., Schoone, G., Schallig, H., et al. (2004). "Quantification of Plasmodium falciparum gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification." *Mol Biochem Parasitol* 137(1): 35-41.
- (112) Schneider, P., Wolters, L., Schoone, G., et al. (2005). "Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of Plasmodium falciparum." *J Clin Microbiol* 43(1): 402-405.
- (113) Schoone, G. J., Oskam, L., Kroon, N. C., et al. (2000). "Detection and quantification of Plasmodium falciparum in blood samples using quantitative nucleic acid sequence-based amplification." *J Clin Microbiol* 38(11): 4072-4075.
- (114) Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., et al. (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." *BMC Mol Biol* 7: 3.
- (115) Schumacher, H. H. (1979). "Pathologische Anatomie der Malaria" In: Dietrich M, Schönfeld H, Hrsg. Malaria. Diagnose - Klinik - Therapie. Basel, Editiones Roche.
- (116) Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., et al. (1992). "CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase." *Biotechniques* 13(4): 626-633.
- (117) Shekalaghe, S., Drakeley, C., Gosling, R., et al. (2007). "Primaquine clears submicroscopic Plasmodium falciparum gametocytes that persist after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine and artesunate." *PLoS One* 2(10): e1023.
- (118) Shekalaghe, S. A., Bousema, J. T., Kunei, K. K., et al. (2007). "Submicroscopic Plasmodium falciparum gametocyte carriage is common in an area of low and seasonal transmission in Tanzania." *Trop Med Int Health* 12(4): 547-553.
- (119) Sherman, I. W., Eda, S. and Winograd, E. (2003). "Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind." *Microbes Infect* 5(10): 897-909.
- (120) Silvestrini, F., Alano, P. and Williams, J. L. (2000). "Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite Plasmodium falciparum." *Parasitology* 121 Pt 5: 465-471.
- (121) Silvestrini, F., Bozdech, Z., Lanfrancotti, A., et al. (2005). "Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum." *Mol Biochem Parasitol* 143(1): 100-110.
- (122) Simpkins, S. A., Chan, A. B., Hays, J., et al. (2000). "An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable Salmonella enterica." *Lett Appl Microbiol* 30(1): 75-79.
- (123) Sinclair, D., Donegan, S., Isba, R., et al. (2012). "Artesunate versus quinine for treating severe malaria." *Cochrane Database Syst Rev* 6: CD005967.
- (124) Sinden, R. E., Butcher, G. A., Billker, O., et al. (1996). "Regulation of infectivity of Plasmodium to the mosquito vector." *Adv Parasitol* 38: 53-117.

- (125) Singh, B. and Daneshvar, C. (2013). "Human infections and detection of Plasmodium knowlesi." *Clin Microbiol Rev* 26(2): 165-184.
- (126) Slatko, B. E. (1994). "Thermal cycle dideoxy DNA sequencing." *Methods Mol Biol* 31: 35-45.
- (127) Smalley, M. E., Abdalla, S. and Brown, J. (1981). "The distribution of Plasmodium falciparum in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75(1): 103-105.
- (128) Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G., et al. (1995). "Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes." *Cell* 82(1): 101-110.
- (129) Smith, T. G., Lourenco, P., Carter, R., et al. (2000). "Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum." *Parasitology* 121 (Pt 2): 127-133.
- (130) Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X. P., et al. (1993). "High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction." *Mol Biochem Parasitol* 61(2): 315-320.
- (131) Subbarao, S. K. and Sharma, V. P. (1997). "Anopheline species complexes & malaria control." *Indian J Med Res* 106: 164-173.
- (132) Sutherland, C. J. (2009). "Surface antigens of Plasmodium falciparum gametocytes--a new class of transmission-blocking vaccine targets?" *Mol Biochem Parasitol* 166(2): 93-98.
- (133) Sutherland, C. J., Tanomsing, N., Nolder, D., et al. (2010). "Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite Plasmodium ovale occur globally." *J Infect Dis* 201(10): 1544-1550.
- (134) Talman, A. M., Domarle, O., McKenzie, F. E., et al. (2004). "Gametocytogenesis: the puberty of Plasmodium falciparum." *Malar J* 3: 24.
- (135) Tanner, M. and de Savigny, D. (2008). "Malaria eradication back on the table." *Bull World Health Organ* 86(2): 82.
- (136) Taylor, T. E. and Hoffman, I. F. (2000). "Can HIV-1 infections in Africa provide insights into acquired immunity to malaria?" *Lancet* 356(9235): 1046.
- (137) Templeton, T. J., Keister, D. B., Muratova, O., et al. (1998). "Adherence of erythrocytes during exflagellation of Plasmodium falciparum microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycophorins." *J Exp Med* 187(10): 1599-1609.
- (138) Tham, J. M., Lee, S. H., Tan, T. M., et al. (1999). "Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT malaria Pf tests in a clinical environment." *J Clin Microbiol* 37(5): 1269-1273.

- (139) Thompson, J. and Gillespie, D. (1987). "Molecular hybridization with RNA probes in concentrated solutions of guanidine thiocyanate." *Anal Biochem* 163(2): 281-291.
- (140) Trager, W. (2005). "What triggers the gametocyte pathway in *Plasmodium falciparum*?" *Trends Parasitol* 21(6): 262-264.
- (141) Trager, W. and Jensen, J. B. (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." *Science* 193(4254): 673-675.
- (142) Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., et al. (2003). "Clinical review: Severe malaria." *Crit Care* 7(4): 315-323.
- (143) Trautmann, A. (1913). "Die Verbreitung der einheimischen Malaria in Deutschland in Vergangenheit und Gegenwart." *Archiv für Hygiene*.
- (144) Trigg, P. I. (1985). "Recent advances in malaria parasite cultivation and their application to studies on host-parasite relationships: a review." *Bull World Health Organ* 63(2): 387-398.
- (145) Van Gelder, R. N., von Zastrow, M. E., Yool, A., et al. (1990). "Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1663-1667.
- (146) Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(2): 615-619.
- (147) Wernsdorfer, G. and Wernsdorfer, W. H. (1969). "[Symptomatology, diagnosis and therapy of malaria]." *Munch Med Wochenschr* 111(31): 1585-1594.
- (148) WHO (1959). "The WORLD Health Organization program to rid the world of malaria." *Am J Nurs* 59: 1402-1408.
- (149) WHO (1990). "Severe and complicated malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84 Suppl 2: 1-65.
- (150) WHO (2000). "Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94 Suppl 1: S1-90.
- (151) WHO (2010). Guidelines for the treatment of malaria. Second edition.
- (152) Win, T. T., Jalloh, A., Tantular, I. S., et al. (2004). "Molecular analysis of *Plasmodium ovale* variants." *Emerg Infect Dis* 10(7): 1235-1240.
- (153) Wurster, K. H., Hardmeier, T. and Engelhard, H. (1972). "[Malaria tropica: report of three cases with cerebral complications and fatal course]." *Schweiz Med Wochenschr* 102(15): 541-544.

- (154) Young, J. A., Fivelman, Q. L., Blair, P. L., et al. (2005). "The Plasmodium falciparum sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification." *Mol Biochem Parasitol* 143(1): 67-79.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AB	Blutgruppe AB nach ABO-System
AMV-RT	Reverse Transkriptase des Avian Myeloblastosis Virus
Aqua bidest.	Aqua bidestillata: destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
C	Cytosin
dNTP	Desoxyribonukleotide
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
E.coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
K+	Kalium
Kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KI	Koinfidenzintervall
LB-Medium	„lysogeny-broth“- Nährmedium
LOD	„Limit of Detection“- Detektionslimit
Mg ²⁺	Magnesium
mM	Milimolar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NASBA	Nucleic acid sequenced based amplification
nm	Nanometer
NTP	Nukleosid-Triphosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase-Chain-Reaction)
P.	Plasmodium

PfEMP1	Plasmodium falciparum Erythrozyten Membran Protein 1
Pfs16	Plasmodium falciparum spezifisches Transkript
Pfs25	Plasmodium falciparum spezifisches Transkript
QT-NASBA	Quantitative Nucleic acid sequenced based amplification
RIN	RNA-Integritäts-Nummer (engl.: RNA-integrity-Number)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNase H	Ribonuklease H
RNaseZap	Ribonuklease zerstörendes Reagenz
Rpm	Umdrehungen pro Minuten (engl.: revolutions per minute)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Zell-Kultur Medium 1640
rRNA	Ribosomale-Ribonukleinsäure
RT-LAMP	Real-time Loop-mediated isothermal amplification
RT-PCR	Real-time Polymerase Kettenreaktion
SD	Standardabweichung (Standarddeviation)
S.O.C. Medium	Super Optimal Broth Medium
Taq-Polymerase	„Thermus aquaticus“ Thermostabile-DNA- Polymerase
TEA-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T	Thymidin
TTP	Time to positivity
T7 RNA-Polymerase	Ribonukleinsäure Polymerase vom T7 Bakteriophagen
U	Uracil
WHO	World Health Organisation
18S	Kleine ribosomale Untereinheit
µL	Mikroliter

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<i>Abbildung 2: Weltkarte mit Ländern, die von Malaria betroffen sind (Stand 2012)</i>	3
<i>Abbildung 2: Anopheles Mücke</i>	4
<i>Abbildung 3: Der Lebenszyklus des P. falciparum</i>	5
<i>Abbildung 4: Ringform im Blutausstrich</i>	6
<i>Abbildung 5: Männliche und weibliche Gametozyten im Blutausstrich</i>	7
<i>Abbildung 6: Reifungsstadien der Gametozyten</i>	12
<i>Abbildung 7 Studiengebiet Jimma, südwestliche der Hauptstadt Addis Abeba</i>	16
<i>Abbildung 8: Patientenproben auf Filterpapier</i>	19
<i>Tabelle 2: Liste der in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide</i>	20
<i>Tabelle 2: Liste der verwendetet Kits mit Verwendungszweck</i>	20
<i>Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Labormaterialien</i>	21
<i>Tabelle 4: Verwendetet Geräte</i>	22
<i>Tabelle 5: Standardreaktionsansatz der PCR</i>	26
<i>Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der PCR</i>	26
<i>Abbildung 9: 1%iges Agarose Gel mit Pfs16 und Pfs25 Amplifikaten auf erwarteter Höhe.</i>	27
<i>Abbildung 10: Karte des verwendeten pCR4-TOPO Plasmids der Firma Invitrogen</i>	29
<i>Tabelle 7: Reaktionsansatz für Transformation</i>	30
<i>Abbildung 11: 1%iges Agarose-Gel mit Amplifikaten nach PCR mit M13 Primern</i>	33
<i>Abbildung 12: 2 1,5%ige Agarose-Gele.</i>	34
<i>Tabelle 8: In-vitro-Transkriptions-Ansatz</i>	35
<i>Abbildung 13: Bioanalyzer Leiter</i>	37
<i>Abbildung 14: Messung der Reinheit der Pfs16 und Pfs25 RNA</i>	38
<i>Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung einer NanoDrop-Messung</i>	40
<i>Abbildung 16: Amplifikationsablauf der NASBA-Technik</i>	43
<i>Abbildung 17: Qualitative Detektion de Pfs16-mRNA</i>	48
<i>Abbildung 18: Qualitative Detektion der Pfs25-mRNA</i>	49
<i>Abbildung 19: Qualitative Detektion der 18S-rRNA</i>	49
<i>Tabelle 9: Übersicht der Sensitivitäten der qualitativen Analyse</i>	50
<i>Abbildung 20: Verdünnungsreihen der Pfs16-NASBA-Läufe</i>	51
<i>Abbildung 21: Quantitativer Vergleich Fingerprick vs. venöse Blutproben für Pfs16</i>	52
<i>Abbildung 22: Quantitativer Vergleich Fingerprick vs. venöse Blutproben für Pfs25</i>	53

9. Anhang

9.1 Aufklärung und Einverständniserklärung auf Englisch

INFORMED PATIENT CONSENT FORM

Oromiya Region Health Bureau
Jimma Zone Health Bureau
Jimma University
University of Munich

Dear Participant,

Your Doctor (Physician) thinks that your sickness is malaria. This has to be checked by a finger pricked blood sample from you. If your blood sample is found to be positive for *Plasmodium falciparum* you will be asked for your participation in our research.

Gametocytes are the sexual forms of the Plasmodium parasite, which do not cause symptoms, but are responsible for the transmission of the parasite from man to mosquito.

Until now there is no non-invasive method for the detection of gametocytes. For future trials and malaria elimination and eradication projects it will be of great importance to develop this.

For scientific purposes we want to examine blood, urine, saliva and oral mucosa for the presence of gametocyte-specific mRNA. Therefore molecular-biological methods are used. The investigations of the genotype are limited exclusively to the proof of ribonucleic acid of the gametocytes. The investigation material provided by you is not abused for other purposes.

For the study the following samples are needed:

- 5 ml blood sample by venipuncture
- 1 finger prick sample (additional to the finger prick taken for the diagnosis)
- 1 urine sample
- 1 saliva sample
- 2 oral mucosa smears

Dear Participant, we thank you for your cooperation. We would like to ask you to agree and take part in the study by giving the following declaration.

- I have been given detailed information about this study
- I had the opportunity to discuss any question with the researchers
- I understand that my participation in study is voluntary
- I agree to take part in this study by signing this consent form

Name of the participant _____ ID No: _____

Signature of the participant
or Parent/ Guardian & Date

Signature of Researcher
& Date

9.2 Aufklärung und Einverständniserklärung auf Amharisch

Waliigaltee Yalamatoota Wajjinii

Biiroo Eegumsa Fayya Oromiyaatti

Biiroo Eegumsa Fayya Zoonii Jimma

Universiitii Jimmaa

Universiitii Muniik

Yaa Hirmaatotaa,

Akka Dooktari kee hubatetti dhukubni kee busaadha. Kunisimoo dhigni qubakee irraa fudhatamee qoratamuu qaba. Yoo dhiigakee keessatti kan dhukuba busa nama itti fidu Plasmodium falciparum jedhamu argame, gaafii akka qowannoo keenya irratti hirmaattan isinii dhiyeesina.

Gametocyte sadarkaa gudina plasmodium dha. Innis mallattoo dhukubaa hinkabu. Garuu sadarkaa busaan nama irraa gara bookeetti darbudha. Hanga ammaatti mala salphaa ittin gametocyte adda bahu hinjiru. Yaalii gara fulduraatiif akkasumas yaada busaa balleesuu irratti mala salpha kana hojii irra olshuun barbaachisaadha. Gocha saayinisiidhaaf waan nuyi sakata'uu barbaanu dhiiga, fincaan, gorora akkasumas afaan keessaa haqamee mRNA gametocyte jiraachuun isaa ni sakata'ama. Sakata'uun akaakuu kana kan inni irratti hundaa'u RNA-gametocyte irratti qofa. Waan qowannaafi isin irraa funu kun hojii biraafi kan oluu miti.

Waan qowannoo kanaaf barbaachisan

- Dhiiga- 5ml hida dhigaa irraa
- Dhiiga quba harkaa irraa
- Fincaan
- Gorora
- Afaan keessaa kan haqame

Galatooma. Yaada armaan gadii hubachuudhaan akka qowannoo kana irratti hirmaattan isin gaafanna.

- Waa'een qowannoo kana bal'inaan naaf ibsameera
- Carraan gaaffii qowattoota irraa naaf kenameera
- Itti hirmaachuuf fedhiikootiin ta'uun isaa hubadheera
- Itti hirmachuukootiif mallattoo kootiin mirkaneeseera

Maqaa itti hirmaataa _____ ID No. _____

Mallatto itti hirmaataa/ _____ Mallattoo qowatichaafi _____

Maatii/Guddisaa fi

Guyyaa _____

Guyyaa _____

9.3 Aufklärung und Einverständniserklärung auf Oromiffa

በምርምር የሚጠቀሱ የወባ በሽታ ታካሚ ስምምነት መግለጫ ቅጽ

የምርምር ባለቤቶች

የኦሮሚያ ክልል ጤና ቢሮ

የጅምር ዘንግ ጤና መምሪያ ፅ/ቤት

ጅምር ዩኒቨርሲቲ

ሚካክ ዩኒቨርሲቲ

ወደ ተሳታፊ

በሐኪምም ምርመራ መሠረት የሚታይብዎት የህመም ምልክት የወባ በሽታን ይመስላል። ይህን ለማረጋገጥ ደግሞ ከጣት ላይ ጠብታ ደም በመወሰድ ምርመራ ይደረጋል። የምርመራው ወጠታ 'ፕላስቶኒድ' የተባለውን የወባ ተዋህስ ካላከተ በምናደርግዎ ሳይንሳዊ ምርምር በፈቃድዎ ተሳታፊ እንዲሆኑ እንጠይቅዎታለን።

ይህ ምርምር የሚከናወነው በወባ አምጪዎ ጥገኛ ተዋህስ የሚሰጥ ክፍል፣ ወንድና ሴቱ ህዋስ (ጋሜቶሳይት) ላይ ነው። ይህም ከሰው ወደ ወባ ትንኝ የሚላለፈው የተዋህሱ ክፍል ነው። ይህንንም ለመቆጣጠር ዘዴዎችን መፍጠር ያስፈልጋል። ከዚህ በተጨማሪ ይህን የሚሰጥ ሕዋስ ክፍል በቀላሉና ሙሉ በሙሉ በሰው ወስጥ መኖሩን ለመላየት የሚያስችሉ ዘዴዎችን በምርምር መፍጠር ያስፈልጋል። በዚህ ምክንያት በምርመራ ጊዜ ከፍ ያለ ወጠታ የሚጠየቁ ከሰው የሚገኘውን የናጣጥ ሳይንት በጥናት ማረጋገጥ አስፈላጊ ነው። በዚህ መሠረት እኛም በወባ አምጪዎ ጥገኛ ተዋህስ የሚሰጥ ክፍል፣ ወንድና ሴቱ ህዋስ ላይ በማተኮር ምርምር ለማድረግ እቅድናል። እርስዎም በዚህ ጥናት በመሳተፍ ለምርምሩ የሚገኙ የደም፣ የሽንት፣ የምራቅ፣ እና ከአፍ ወስጥ ግድግዳ ላይ የሚጠሰድ ናጣጥ በፈቃደኝነት እንዲሠጡ እንጠይቅዎታለን። እነዚህ ናጣጦችም የወባ ወንድና ሴቱ ህዋስ በሰውነት ወስጥ መኖሩን የሚያሳዩትን ስሜት 'መላንጅር አር ኤ ኤ' የተባለውን ዘረመል ለመላየት ነው። እነዚህም ናጣጦች ለዚህ ዓላማ ብቻ ይወላሉ ከዚህ ወጪ ግን ሕግ በሚከለክለው መሠረት ለሌላ ዓላማ ጥቅም ላይ አይውሉም።

የምንወስደው የናጣጥ እይነትና ማጠን፡-

- አምስት ኤም ኤል (5 ml) የደም ናጣጥ ከደም ስር የሚጠሰድ
- አንድ የሽንት ጠብታ
- አንድ የምራቅ ጠብታ
- ሁለት ጊዜ ከአፍ ግድግዳ ላይ በመጥረግ የሚጠሰድ ናጣጥ

በጥናቱ ለመሳተፍ ያለዎትን ስምምነት ለመግለፅ ከዚህ ቀጥሎ በተጠቀሱት ነጥቦች መሠረት ቃል እንዲገቡ እንጠይቃለን

- ስለጥናቱ ዝርዝር መረጃ እግኝቻለሁ
- ማንኛውንም ያልገባኝን ነገር ለማጠየቅና ለመመዘን በቂ እድል እግኝቻለሁ
- በቂ ግንዛቤም በማግኘቴ በጥናቱ በሙሉ ፈቃዴ አሳተፋለሁ
- ስምምነቴንም በፊርማዬ አረጋግጣለሁ

የተሳታፊ ስም ከነ አባት _____ የሚያ ቁጥር _____

የተሳታፊ፣ የወላጅ/የአሳዳጊ ፊርማ _____ የተመራማሪ ፊርማ _____

ቀን _____

ቀን _____

9.4 Fragebogen

Date: ____/____/____

Initials of clinician: _____

Patient (Code): _____ ID No: _____

Age: _____ (years) Sex: male female

Height [cm]: _____

Weight [kg]: _____

Temperature [°C]: _____

Results of the microscopy:

Thick smear: positive negative

Detection of gametocytes: Yes No

Parasitaemia [%]: _____

Does the patient have any other illness?

If yes please mention: _____

Did the patient have malaria/fever and/or take any antimalarial drugs within the last 6 weeks?

If yes please mention: _____

Does the patient fulfill all inclusion criteria and no exclusion criteria?

Yes No → Exclusion

Has the patient or guardian signed the informed consent form?

Yes No

9.5 Ethikkommission München



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Herrn
Dr. M. Pritsch
Abt. f. Infektions- und Tropenmedizin
Leopoldstr. 5
80802 München

Vorsitzender:
Prof. Dr. W. Eisenmenger
Telefon+49 (0)89 5160 - 5191
Telefax+49 (0)89 5160 - 5192
Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de

www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Pettenkoferstr. 8a
D-80336 München

Hausanschrift:
Pettenkoferstr. 8
D-80336 München
München, 13.06.2012 EM /sc

Titel:	Nachweis von Gametozyten- spezifischer mRNA in Speichel, Urin und Mundschleimhaut von mit Plasmodium falsiparum- infizierten mittels "quantitative nuclear acid sequence based amplification" (QT-NASBA) und Vergleich der Sensitivität und Spezifität mit dem Goldstandard QT-NASBA /Mikroskopie aus Blutproben
Antragsteller:	Dr. M. Pritsch
Projekt- Nr.	225-12

Sehr geehrter Herr Kollege Pritsch,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 11.06.2012 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (Patienteninformation und Einwilligung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. W. Eisenmenger
Vorsitzender der Ethikkommission

N/ Mitglieder der Ethikkommission

P.S.: Bitte beachten Sie die aktuellen Richtlinien für Anträge an die Ethikkommission. Internetadresse: www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Mitglieder der Kommission:
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. G. Paumgartner (stellv. Vorsitzender), PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach

9.6 Ethikkommission Äthiopien



ጅማ ዩኒቨርሲቲ
Jimma University
የሕብረተሰብ ጤና እና የሕክምና ሳይንሶች ኮሌጅ
College of Public Health and Medical Sciences
የጤና ምርምርና የድህረ-ምረቃ ማስተባበሪያ ቢሮ
Health Research and Post Graduate Coordination Office



Ref. No: RP GC/240/2004

Date: 11/11/2004

To: Dr. Teferi Eshetu (MSc, PhD)
Health Research & Post-graduate coordinating office
Jimma University

Subject: Outcome of Ethical Review of Your Research Plan

This is to acknowledge that the research “*Detection of gametocyte-specific MRNA in saliva, urine and oral mucosa of patients infected with plasmodium falciparum by means of “quantitative nucleic acid sequence based amplification” (QT-NASBA) and comparison of the sensitivity and specificity by gold standard evaluation of blood samples with QT-NASBA and microscopy.*” has been reviewed by the ethical clearance board of Jimma University, according to the standardized principle and a procedure which is designed in line with the national and WHO guidelines.

With pleasure we inform you that the project is ethically approved and thus you are requested to implement the research plan as per the approved protocol.

Sincerely,

Dr. Dawene Wondirach (Ass. Prof.)
Health Research & Post Graduate
Coordinator

- Ethical Review Board

Jimma University

9.7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei den Patienten bedanken, die sich bereit erklärt haben an der Studie teilzunehmen. Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Health-Centers in K'Och'e bedanken, die mir stets geholfen haben und die Arbeit durch großzügige Kaffeezeremonien zu einer unvergesslichen Erfahrung gemacht haben.

Ich möchte meinen Betreuern, Dr. Nicole Berens-Riha und Dr. Michael Pritsch die mich über den gesamten Zeitraum zuverlässig begleitet haben, danken. Auch meinem Doktorvater und Schirmherren des Projektes, Prof. Dr. Thomas Löscher, möchte ich an dieser Stelle gerne danken.

Das Sammeln der Proben in Äthiopien wurde besonders durch den engagierten Einsatz von Nuredin Abduselam ermöglicht, der mich jeden Tag nach K'Och'e begleitet hat.

In München haben mich besonders die Mitarbeiter des Max-von-Pettenkofer-Institutes unterstützt und ich möchte mich auf diesem Weg gerne bei Gabriele Liegel, Birgit Gross, Dr. Andreas Wieser, PhD. Christian Meyer und Dipl. Biol. Maxim Messerer bedanken. Außerdem möchte ich Dr. Susanne Schwarz und Dr. Susanne Roell vom Institut für Tierphysiologie für die Hilfe mit dem Umgang des Bioanalyzers danken und Victor Söderström und den Labormitarbeiterinnen des Tropeninstitutes Münchens bedanken.

Für die Hilfe bei den statistischen Berechnungen und der Anfertigung der Graphiken gilt mein Dank Dr. Jonathan Shock vom Institut für Physik der Universität in Kapstadt.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben meine Träume Wirklichkeit werden zu lassen. Ich danke Euch von ganzem Herzen.

9.8 Eidesstaatliche Versicherung

Kast, Katharina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, den 01.12.2017

Ort, Datum

Katharina Kast

Unterschrift Doktorandin