

Leon Marvin Mühlsteffen

Dr. med.

Development of a fluorescence-based rapid diagnostic test for malaria

Fach: Labormedizin

Doktorvater: Prof. Dr. Friedrich Frischknecht

Diese Arbeit dient der Frage, ob ein zuvor etablierter, ultra-sensibler Schnelldiagnostiktest für die Erkennung intraerythrozytärer Formen von *P. falciparum* auf den zweit häufigsten Malariaparasiten, *P. vivax*, übertragbar ist. Aufgrund seiner starken Präferenz für die Invasion von Retikulozyten ist *P. vivax* nur schwer in Kulturen mit reifen roten Blutkörperchen zu halten. Es wurde folglich die Entscheidung getroffen Stellvertreterspezies zu nutzen: *P. berghei* wegen der ähnlichen Wirtszellpräferenz und *P. knowlesi* wegen seiner genetischen Nähe. Die Stellvertreterspezies wurden auf ihr Austreibungsverhalten unter Saponinlyse hin untersucht, sowie auf allgemeinen Erfolg und Qualität einer Antikörperfärbung mit anti-EXP2- und anti-RAP1-Antikörpern, die an fluoreszierendes Alexa Fluor 488 gebunden wurden. Zusätzlich wurde im Rahmen einer bioinformatischen Recherche die strukturelle Matrixangleichung der untersuchten Spezies und deren Proteinerhalt verglichen, um potenzielle Zukunftskandidaten für ultra-sensible Schnelldiagnostiktest zu ermitteln.

Die parasitophoren Vakuolen beider Stellvertreterspezies konnten erfolgreich durch Saponinlyse aus den roten Blutzellen ausgetrieben werden, wobei spätere Lebensphasen, die Hemozoin enthielten, eine höhere Austreibungsrate zeigten. Der Kontrast zu vorherigen Ergebnissen, die eine höhere Austreibungsrate von Ringstadien bei *P. falciparum* beschreiben, ist wohl nicht auf unterschiedliche Saponinkonzentrationen zurückzuführen, sondern auf individuelle Eigenschaften der verschiedenen *Plasmodium* Spezies im Verlauf des intraerythrozytären Lebenszyklus, so wie das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und die Steifheit der Wirtszellmembran. Ebenso könnte der Cholesteringehalt der Wirtszellmembran eine Auswirkung auf Membranrigidität und Lyse haben, jedoch ist dieser nicht bei allen Spezies und Zyklusstufen ausreichend gut untersucht.

Nach erfolgreicher Lyse war anti-EXP2 in der Lage bei beiden Spezies an die Membran der parasitophoren Vakuole zu binden und ein positives Fluoreszenzsignal zu erzeugen, wenngleich

mit einer schwächeren korrigierten totalen Zellfluoreszenz als bei *P. falciparum*. Anti-RAP1 konnte hingegen nur an *P. falciparum* binden, und auch das lediglich mit einer niedrigeren korrigierten totalen Zellfluoreszenz als anti-EXP2. Dies ist am ehesten auf eine nur teilweise Erhaltung der Proteinstrukturen zwischen den verschiedenen Spezies zurückzuführen, und eine folglich schwächere Bindung zwischen den Antikörpern gegen *P. falciparum* und den Antigenen anderer Spezies, sowie eine allgemein mindere Bindungsqualität an RAP1-Antigene. Die besser Signalzuverlässigkeit bei früheren Lebensstufen, wie sie bei anti-RAP1-Färbungen erkennbar war, stellt kein Problem dar, da sowohl bei *P. vivax* als auch bei *P. falciparum* Ringformen im peripheren Blut nachgewiesen werden können. Anti-EXP2 zeigte zwar bessere Ergebnisse bei späteren Lebensstufen, ist jedoch ebenfalls in der Lage die jüngeren intraerythrozytären Formen zu detektieren.

Die Proteinangleichung verschiedener orthologer Gruppen zeigte einen hohen Erhalt bei EXP2, und einen vergleichsweise niedrigeren bei RAP1, entsprechend den Ergebnissen der Färbungen. Die Identitätsprozente ist neben der Ähnlichkeitsprozente vermutlich nur einer von mehreren Faktoren, die zur Antigenerkennung beitragen.

Basierend auf den Ergebnissen, wie sie sich in diesen Stellvertreterspezies präsentiert haben, ist naheliegend, dass auch die parasitophoren Vakuolen von *P. vivax* bei Saponinlyse aus den roten Blutzellen ausgestoßen werden. Ein neuer, ultrasensitiver, fluoreszenzbasierter Schnell diagnostiktest für *P. falciparum* könnte demnach nicht nur kleinste Mengen parasitärer Antigene detektieren, sondern auch zwischen *Plasmodium* spp. unterscheiden. In diesem Fall zwischen *P. falciparum* und *P. vivax* mittels Antikörperbindungsmustern und Unterschieden in der korrigierten totalen Zellfluoreszenz. Der Nachweis von EXP2 mittels *Pf*-anti-EXP2 in allen untersuchten Spezies sichert das Stützen auf essenzielle Proteine. Die bioinformatische Recherche gibt zudem eine Liste zukünftiger Kandidaten, die mit der Membran der parasitophoren Vakuole assoziiert sind und unterschiedliche Stufen der Proteinerhaltung zeigen, sodass je nach Bedarf ein breiter Nachweis oder eine spezifische Unterscheidung möglich sind. Dies stellt einen wichtigen Schritt hin zu einer verbesserten Malariadiagnostik dar, der die lange vernachlässigte Bürde von niederschwelligen Infektionen mit *P. vivax* adressiert und eine schnellere Einleitung einer gezielten Behandlung ermöglicht.