

**Untersuchungen zur *Plasmodium falciparum*-
assozierten Anämie:
Nachweis von Veränderungen an der Membran
nicht infizierter Erythrozyten
durch Interaktion mit Wirts- und *Plasmodium*-Molekülen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Katharina Kowalsky

Hamburg 2010

Diese Arbeit wurde in der Sektion Tropenmedizinische Grundlagenforschung des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, Hamburg, Deutschland, sowie im Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine, Kumasi, Ghana, angefertigt. Sie stand unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Norbert W. Brattig (Sektion Tropenmedizinische Grundlagenforschung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) und von Herrn Prof. Peter Heisig (Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie der Universität Hamburg).

Leiter des Departments Chemie: Prof. Dr. Chris Meier
(Universität Hamburg)

1. Gutachter: PD Dr. Norbert W. Brattig
(Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg)

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig
(Universität Hamburg)

eingereicht: 1. Februar 2010

Datum der Disputation: 16. April 2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Malaria als intrazelluläre Parasitose	5
3.2	Systematik der Plasmodien	7
3.3	Lebenszyklus von Plasmodien	7
3.4	Aufbau der Erythrozytenmembran	9
3.5	Entwicklung der Blutstadien von <i>Plasmodium falciparum</i>	10
3.5.1	Invasion von Erythrozyten	10
3.5.2	Die intraerythrozytären Stadien	11
3.5.3	Veränderungen infizierter Erythrozyten	11
3.5.4	Veränderungen nicht infizierter Erythrozyten	12
3.6	Immunantwort bei der <i>Malaria tropica</i>	13
3.6.1	Angeborene und erworbene Immunität gegen <i>P. falciparum</i> Blutstadien	14
3.6.2	Natürliche Resistenzen	15
3.7	Die Milz und Malaria	16
3.7.1	Aufbau und Funktion der Milz	16
3.7.2	Die Rolle der Milz bei der Malaria	17
3.8	Malaria und Anämie	18
3.8.1	Ursachen einer gesteigerten RBC-Zerstörung	20
3.8.2	Ursachen für eine verringerte RBC-Produktion	22
3.8.3	Zusätzliche Faktoren, die eine Anämie beeinflussen	23
3.8.4	Rolle des Malariatoxins (<i>P.f.</i> -GPI)	23
3.8.5	Rolle des Malariapigments (Hämozoin)	24
3.9	Zielsetzung	26
4	Material und Methoden	27
4.1	Patienten	27
4.1.1	Anämiestudie	27
4.1.1.1	Studiengebiet	28
4.1.1.2	Studienkohorte	28
4.1.2	Seren und Erythrozyten	29
4.1.2.1	Seren für <i>P.f.</i> -GPI-Test	30

4.1.2.1.1	Seren von Kindern mit schwerer, komplizierter Malaria	30
4.1.2.1.2	Seren von weiteren Patienten mit Malaria	30
4.1.2.1.3	Mischung aus Immunsereen	30
4.1.2.1.4	Patient mit akuter schwerer Malaria	30
4.1.2.1.5	Weitere Seren	31
4.1.2.1.6	Kontrollseren	31
4.1.2.2	Testerythrozyten	31
4.2	Material	31
4.2.1	Instrumente und Geräte	31
4.2.2	Software	31
4.2.3	Verbrauchsmaterialien	32
4.2.4	Verwendete Antikörper	32
4.2.4.1	Verwendete polyklonale Antikörper	32
4.2.4.2	Verwendete monoklonale Antikörper	33
4.2.5	Chemikalien	33
4.2.6	Kits und Reagenzien	34
4.2.7	Lösungen	34
4.2.8	<i>P. falciparum</i> (<i>P.f.</i>)-Glykosylphosphatidylinositol	35
4.2.8.1	<i>P.f.</i> -Glykosylphosphatidylinositol (GPI) für Erythrozytentest	35
4.2.8.2	<i>P.f.</i> -Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Derivate im Mikroarray	36
4.3	Methoden	37
4.3.1	Durchflusszytometrie	37
4.3.1.1	Prinzip	37
4.3.1.1.1	Strömungsmechanisches System	37
4.3.1.1.2	Optik	38
4.3.1.1.2.1	Streulichtparameter	38
4.3.1.1.2.2	Detektion von Fluoreszenzen	39
4.3.1.1.2.3	Depolarisation des Lichtes	41
4.3.1.1.3	Darstellung und Auswertung	43
4.3.1.2	Nachweis von Hämозoin tragenden peripheren Leukozyten	44
4.3.1.3	Nachweis von IgG, IgM und C3d auf der RBC-Membran	47
4.3.1.4	Test auf Glykophorin A auf Erythrozyten	50
4.3.1.5	Test auf Glykophorin C auf Erythrozyten	51
4.3.1.6	Probenbereitung für <i>P.f.</i> -GPI-Test	51
4.3.2	Mikroarray mit <i>P.f.</i> -GPI	52
4.3.3	Statistische Auswertung	53
5	Ergebnisse	54
5.1	Hämatologische Daten der Studienkohorte	54

5.2	Nachweis von Hämozoin in peripheren Leukozyten	57
5.2.1	Unterschiede in der Anzahl der Hämozoin tragenden Leukozytenpopulationen	59
5.2.1.1	Hämozoin tragende Monozyten	59
5.2.1.2	Hämozoin tragende Neutrophile	61
5.2.1.3	Population schwach CD16-positiver, Hämozoin tragender Leukozyten (PC-CD16 ^{dim})	61
5.2.1.4	Korrelationen der Anzahl Hämozoin tragender Leukozyten	63
5.2.2	Unterschiede des Anteiles Hämozoin tragender Leukozyten in den Leukozytenpopulationen	63
5.2.2.1	Hämozoin tragende Monozyten	63
5.2.2.2	Hämozoin tragende Neutrophile	65
5.2.2.3	Hämozoin tragende, schwach CD16-positive Leukozyten	66
5.2.2.4	Korrelationen der Anteile Hämozoin haltiger Leukozyten in den unterschiedlichen Populationen	66
5.2.3	Vergleich der unterschiedlichen Auswertungsmethoden	67
5.2.4	Auffällige Patienten	67
5.3	Veränderungen der Oberflächeneigenschaften von nicht infizierten und infizierten Erythrozyten	68
5.3.1	Bindung von IgG, IgM und C3d auf <i>Plasmodium</i> -infizierten sowie nicht infizierten Erythrozyten	68
5.3.1.1	Nachweis von IgG auf der Membran von RBC	70
	Nachweis von IgM auf der Erythrozytenmembran	75
5.3.1.3	Nachweis von C3d auf der Membran von RBC	81
5.3.1.4	Korrelation von Antikörper- und Komplement-positiven Zellen	86
5.3.2	Unterschiede der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI)	86
5.3.2.1	MFI beim Nachweis von membrangebundenem IgG	86
5.3.2.2	MFI beim Nachweis von membrangebundenem IgM	88
5.3.2.3	MFI beim Nachweis von membrangebundenem C3d	90
5.3.2.4	Korrelationen der mittleren Fluoreszenzintensitäten für IgG, IgM oder C3d	92
5.3.3	Auffällige Patienten	92
5.3.4	Vergleich der unterschiedlichen Auswertungsmethoden (Mittlere Fluoreszenzintensität versus prozentuale Anteile)	93
5.4	Einfluss der Malaria auf die Nachweisbarkeit von Membranrezeptoren von Erythrozyten an den Beispielen von Glykophorin A und C	94
5.5	Interaktion von <i>P. falciparum</i> Glykosylphosphatidylinositol (<i>P.f.</i>-GPI) mit der Erythrozytenmembran	96
5.5.1	Interaktion von <i>P.f.</i> -GPI-Molekülen mit der Membran von nicht infizierten Erythrozyten und deren Erkennung durch Serumantikörper von Malariapatienten	96

5.5.2	Die Erkennung des <i>P.f.</i> -GPI durch IgG- und IgM-Antikörper im Verlauf der Infektion	97
5.5.3	Abhängigkeit der Reaktion vom Lipidanker des <i>P.f.</i> -GPI	99
5.5.4	Abhängigkeit der <i>P.f.</i> -GPI-Erkennung von der Antikörperkonzentration im Patientenserum	99
5.5.5	Dosisabhängigkeit der <i>P.f.</i> -GPI Erkennung	100
5.5.6	Einfluss veränderter Versuchsbedingungen auf die <i>P.f.</i> -GPI-Erkennung	101
5.5.7	Erleichterte Insertion des <i>P.f.</i> -GPI durch Zugabe eines Detergens	101
5.5.8	Mikroarray-Analyse zum Nachweis der Antikörperreaktivität der Serumantikörper mittels synthetischem <i>P.f.</i> -GPI	102
6	<i>Diskussion</i>	103
6.1	Die Durchflusszytometrie zum Nachweis von Membranveränderungen von RBC bei Malaria	104
6.2	Veränderungen an der Erythrozytenmembran	105
6.2.1	Nachweis von Immunglobulinen und Komplementproteinen	105
6.2.2	Veränderte Zugänglichkeit von Glykophorinen bei Malaria	111
6.2.3	Insertion von <i>P.f.</i> -GPI in die Erythrozytenmembran	111
6.3	Nachweis von Hämozoin im Durchflusszytometer	115
6.3.1	Entdeckung einer besonderen Leukozytenpopulation	116
7	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	118
8	<i>Tabellenverzeichnis</i>	120
9	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	121
10	<i>Literaturverzeichnis</i>	124
11	<i>Einstufung und Kennzeichnung von Gefahrstoffen</i>	142

1 Zusammenfassung

Eine schwere Anämie ist bei Kindern unter zwei Jahren die häufigste Komplikation einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* (*P.f.*). Der überwiegende Teil der zerstörten Erythrozyten ist dabei nicht infiziert. Bisher liegen nur wenige Untersuchungen zum Mechanismus der Elimination dieser nicht infizierten Erythrozyten vor. Membranveränderungen von Erythrozyten können die Bindung von Immunglobulinen und Komplementproteinen an die Erythrozytenmembran bedingen, was zu einem Abbau derart markierter Zellen durch Phagozyten, wahrscheinlich in der Milz, führen kann. Zum besseren Verständnis dieser Abläufe wurde die vorliegende Studie mit Kindern, die an einer schweren Malariaanämie litten, in einem Endemiegebiet (Kumasi, Ghana) durchgeführt. Bei den Untersuchungen standen Membranveränderungen von nicht infizierten Erythrozyten im Vordergrund. In dieser Studie wurde darüber hinaus das Vorkommen von Hämozoin in peripheren Leukozyten untersucht, da das Hämoglobinabbauprodukt Hämozoin im Zusammenhang mit der Malariaanämie stehen kann. In unabhängigen Experimenten wurde untersucht, ob naive Erythrozyten durch Exposition gegenüber dem Malariatoxin verändert werden und ob spezifische Antikörper an derart markierte Zellen binden.

Der Fokus der Studie über Oberflächenveränderungen der Erythrozyten lag auf der Prüfung einer Bindung von Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) bzw. von Komplementprotein C3d an Erythrozyten der Patienten. Die Anwendung der sensiblen Technik der Durchflusszytometrie erlaubte eine Differenzierung zwischen nicht infizierten und infizierten Erythrozyten, wobei insbesondere nicht infizierte Erythrozyten betrachtet wurden. Keine Unterschiede zwischen Anämiepatienten und Nichtanämiepatienten fanden sich für eine Bindung von IgG. Im Gegensatz dazu waren in der Gruppe der Kinder mit einer schweren Anämie signifikant mehr IgM-bindende, nicht infizierte Erythrozyten erkennbar als in der Gruppe der Patienten ohne schwere Anämie. Des Weiteren zeigte sich, dass die Gruppe der Anämiepatienten ebenfalls eine signifikant erhöhte C3d-Bindung aufwies. Allerdings lag der Anteil jener Zellen, welche positiv für eine IgM- bzw. eine C3d-Bindung waren, in den meisten Fällen unter einem Prozent. Grund dafür könnte sein, dass die Kinder bei der Aufnahme ins Krankenhaus bereits eine schwere Anämie entwickelt hatten. Erythrozyten mit gebundenen

Antikörpern oder Komplementproteinen könnten zu diesem Zeitpunkt bereits aus der Zirkulation entfernt worden sein.

Aufgrund der depolarisierenden optischen Eigenschaften können Hämozoin haltige Leukozyten im peripheren Blut mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, wobei die unterschiedlichen Populationen der weißen Blutkörperchen voneinander unterschieden werden können. Es zeigte sich, dass bei Patienten mit einer schweren Malariaanämie deutlich mehr Hämozoin haltige Monozyten und neutrophile Granulozyten nachweisbar waren als bei Patienten ohne eine schwere Malariaanämie oder bei gesunden Europäern. Erstmals konnte in dieser Studie das Auftreten einer Hämozoin positiven Population nachgewiesen werden, die eine geringe Expression von Fc γ RIII (CD16) aufwies. Diese Zellen ließen sich aufgrund der deutlich geringeren Granularität und Größe jedoch nicht zu den Granulozyten, sondern eher den Lymphozyten oder evtl. den Monozyten zuordnen. Ähnlich wie die Monozyten und Neutrophilen weist auch diese Population mit geringer Expression von Fc γ RIII (CD16) vermehrt Hämozoin haltige Zellen in der Gruppe der Anämiepatienten auf. Mit den vorliegenden Daten konnte diese Population jedoch nicht eindeutig identifiziert werden.

In einer zusätzlichen Studie wurde eine mögliche Interaktion des Malariatoxins Glykosylphosphatidylinositol (*P.f.*-GPI) mit der Erythrozytenmembran untersucht. Das unter natürlichen Bedingungen im Blut freigesetzte *P.f.*-GPI wurde hierbei als Syntheseprodukt mit naiven Erythrozyten inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das *P.f.*-GPI in die Erythrozytenmembran inserieren kann und von Antikörpern im Serum akut erkrankter Patienten erkannt wird. Diese Erkennung, die in den Wochen nach Therapiebeginn schnell abnimmt, wird bei Erwachsenen von IgM-Antikörpern dominiert. Bei Kindern herrscht eine Erkennung durch IgG vor. Eine Reaktion des freigesetzten *P.f.*-GPI mit der Membran nicht infizierter Erythrozyten und deren Opsonisierung mit Immunglobulinen und Komplementproteinen kann an der Entstehung einer Malariaanämie beteiligt sein.

2 Summary

Severe anaemia is the most frequent complication of an infection with *Plasmodium falciparum* (*P.f.*) in children under the age of two years. The predominant part of destructed erythrocytes is non-infected. Little research has been done to explore the underlying mechanism of the elimination of these non-infected erythrocytes. Membrane changes of erythrocytes may result in binding of immunoglobulins and complement proteins to the surface of erythrocytes, leading to destruction of these tagged erythrocytes by phagocytes, probably in the spleen. For a better understanding of these processes the clinical trial presented in this thesis was conducted with children suffering from severe malaria anaemia in an endemic area (Kumasi, Ghana). Special attention of the experiments for membrane changes was on non-infected erythrocytes. Furthermore the presence of haemozoin-carrying leukocytes was examined in the presented study since the degradation product of haemoglobin – haemozoin - might be associated with malaria anaemia. In independent experiments it was investigated if naïve erythrocytes are affected through exposition to the malaria toxin and if specific antibodies bind to those altered cells.

The study about surface changes of erythrocytes focussed on testing for binding of immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin M (IgM) or the complement protein C3d on patients' erythrocytes. By applying the sensitive technique of flow cytometry it was possible to differentiate between non-infected and infected erythrocytes, and special emphasis was laid on non-infected erythrocytes. No differences could be found between patients with and without severe anaemia for the binding of IgG. In contrast to these findings, the group of children with severe anaemia showed significantly more IgM-binding erythrocytes than children without severe anaemia. In addition, the group of anaemic patients exhibited increased binding of the complement protein C3d. However, the percentage of cells that were positive for an IgM or C3d binding was in most cases below one percent. A possible reason for this could be that at the time of admission to the hospital the children had already developed a severe anaemia. Erythrocytes with bound immunoglobulins or complement proteins might have been eliminated from the circulation by that time.

Summary

Haemozoin-carrying leukocytes in the blood can be detected via flow cytometry due to the depolarising properties of haemozoin crystals. Different leukocyte populations can be distinguished in addition. Patients with severe anaemia presented more haemozoin-carrying monocytes and granulocytes than children without severe anaemia and European controls. For the first time this study revealed a haemozoin positive population with low Fc γ RIII (CD16) expression. These cells could not be related to granulocytes due to a low granularity and size, but rather to the lymphocyte or possibly to the monocyte population. Children with severe anaemia showed increased quantities of haemozoin-carrying cells with low Fc γ RIII (CD16) expression similar to the monocytes and granulocytes. However, with the obtained data this population could not be distinctively identified.

In a supplementary study a possible interaction of the malaria toxin glycosylphosphatidylinositol (*P.f.*-GPI) with the erythrocyte membrane was investigated. Naturally, *P.f.*-GPI is released into the blood. In these experiments synthetic *P.f.*-GPI was incubated with naïve erythrocytes. The results clearly indicated an insertion of *P.f.*-GPI into the erythrocyte membrane, since only these treated cells were recognised by antibodies in sera from patients with acute malaria. In a follow-up patient this recognition declined rapidly in the weeks after the start of antimalarial therapy and was dominated by IgM-antibodies in adults. In contrast, children displayed a strong IgG-recognition. These obtained data indicate that a reactivity of *in vivo* released *P.f.*-GPI with the membrane of non-infected erythrocytes and their opsonisation with immunoglobulins and complement proteins can be involved in the development of malaria-associated anaemia.

3 Einleitung

Eine schwere Anämie ist bei Kleinkindern die häufigste Komplikation einer Malaria tropica. Dabei scheint ein Großteil der eliminierten Erythrozyten (engl. *red blood cell*, RBC) nicht infiziert zu sein. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind komplex und nicht vollständig verstanden.

3.1 Malaria als intrazelluläre Parasitose

Malaria ist eine der bedeutendsten tropischen Infektionskrankheiten, die durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursacht wird. Die Ansteckung erfolgt durch den Stich einer infizierten weiblichen Mücke der Gattung *Anopheles*. Es sind bis vor kurzem vier humanpathogene *Plasmodium*-Arten beschrieben worden, die unterschiedliche Formen der Malaria hervorrufen:

- *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica)
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium vivax* (beide Malaria tertiana) und
- *Plasmodium malariae* (Malaria quartana).

Neuen Erkenntnissen zufolge ist *Plasmodium knowlesi*, dessen natürlicher Wirt eine Affenart, die Makaken, ist, ebenfalls in der Lage, im Menschen eine Malaria-infektion auszulösen (47, 48, 210).

Fast alle Todesfälle durch Malaria resultieren aus einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*, *P.f.*) (163). Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) waren 2006 ca. 3,3 Milliarden Menschen in 109 Ländern der Gefahr einer Ansteckung ausgesetzt (164) (Abbildung 1). Tatsächlich erkrankten im Jahr 2006 etwa 247 Millionen Menschen an einer Infektion mit *P. falciparum*. Von diesen verliefen rund 881.000 (ca. 0,36%) tödlich. 91% der Fälle traten in Afrika auf, und 85% der tödlich verlaufenden Fälle betrafen Kinder unter fünf Jahren (164) (Abbildung 2). Die meisten Infektionen nehmen einen milden Verlauf mit Symptomen wie Fieber, Übelkeit und Kopfschmerzen sowie weiteren Grippe-ähnlichen Symptomen. Ein Teil der Patienten entwickelt jedoch schwerwiegende Komplikationen.

In den Teilen der Welt, in denen die Malaria tropica endemisch ist, leiden vor allem Kinder im Alter von wenigen Monaten bis fünf Jahren unter einer schweren Malaria. Es unterliegen aber auch schwangere Frauen, insbesondere Erstgebärende, dem erhöhten Risiko einer schweren Malaria. Bei älteren Kindern und Erwachsenen kommt

aufgrund der Entwicklung einer Teilimmunität ein schwerer Verlauf der Krankheit seltener vor (163). Bei Kleinkindern sind die Komplikationen, die einen schweren Krankheitsverlauf auszeichnen, vor allem die zerebrale Malaria sowie die Malariaanämie.

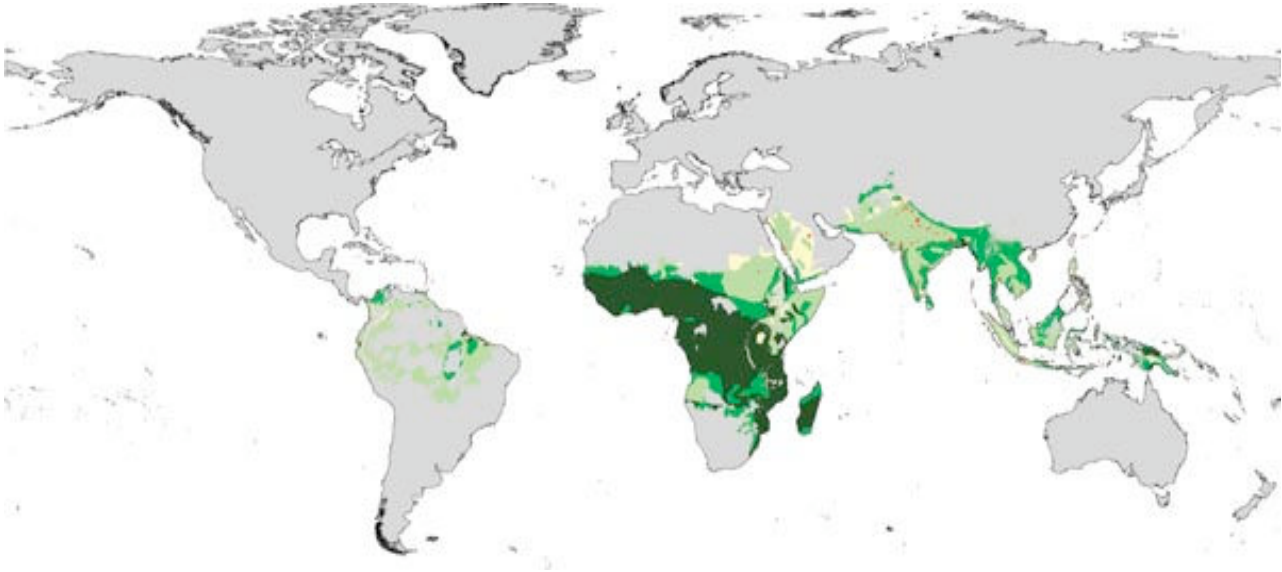


Abbildung 1: Globale Verteilung der *P. falciparum*-Endemieklassen. hellgrün: hypoendemische Gebiete; mittelgrün: mesoendemische Gebiete; dunkelgrün: hyper- und holoendemische Gebiete; gelb: unklassifizierte Gebiete (entspricht ca. 6% der bedrohten Bevölkerung) (Quelle: Snow *et al.*, 2005 (213))

Fälle lebensbedrohlicher Komplikationen durch *P. falciparum* kommen deutlich häufiger in afrikanischen Ländern vor als in vergleichbaren Regionen in Indien (190) und Vanatu (146).

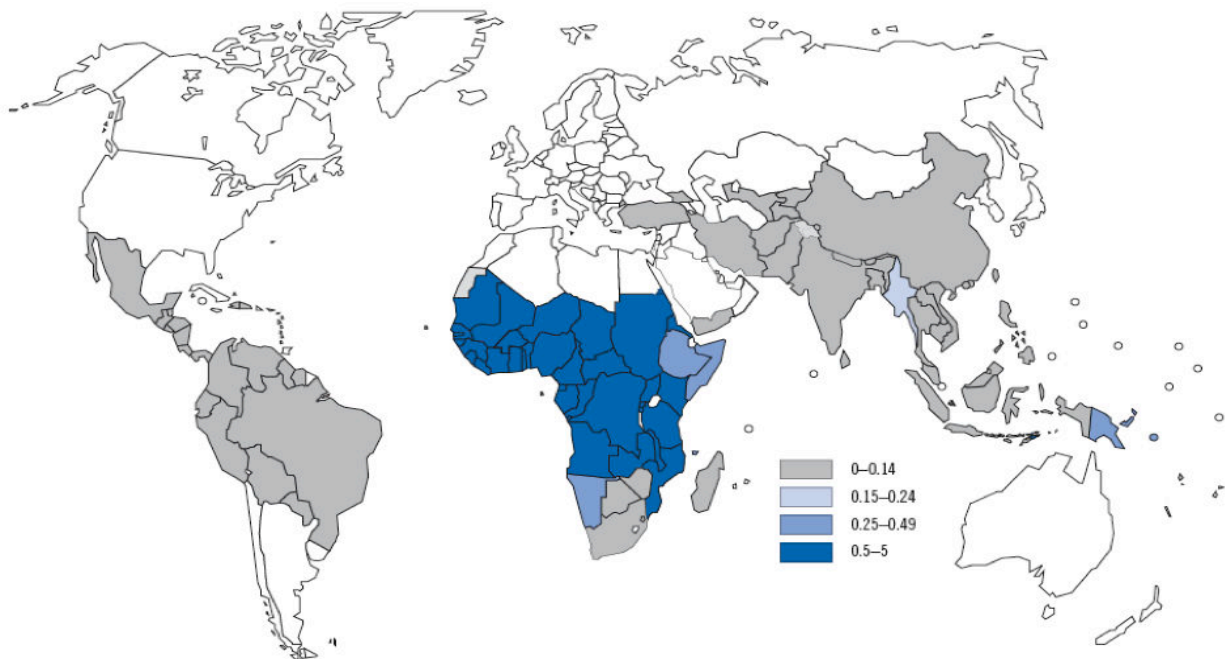


Abbildung 2: Globale Verteilung der Todesfälle durch Malaria pro 1000 Einwohner. (Quelle: WHO malaria report 2008 (164))

Die Gründe hierfür sind nicht eindeutig geklärt. Allerdings scheint in Afrika ein schlechterer Zugang zu schneller Behandlung ebenso eine Rolle zu spielen wie Bildungs-, Sozial- und Organisationsfaktoren wie Transport und Gesundheitsdienste (9).

3.2 Systematik der Plasmodien

Plasmodien werden dem Stamm der Alveolata und dem Unterstamm der Apicomplexa zugeordnet. Die Apicomplexa zeichnen sich durch einen Generationswechsel von ungeschlechtlicher Schizogonie, geschlechtlicher Gamogonie und ungeschlechtlicher Sporogonie aus. Die invasiven Stadien verfügen über einen Apikalkomplex mit einzigartigen Organellen, die das Eindringen der Parasiten in die Wirtszellen ermöglichen. Innerhalb der Apicomplexa werden die Plasmodien der Klasse der Haematozoa zugeordnet, welche einen obligaten Wirtswechsel zwischen blutsaugenden Arthropoden und Wirbeltieren aufweisen (obligate Parasiten). In der Klasse der Haematozoa gehören sie zur Ordnung der Haemosporida, welcher nur eine bekannte Familie, die Plasmodiidae, angehört (140).

3.3 Lebenszyklus von Plasmodien

Die Einzeller der Gattung *Plasmodium* sind Parasiten, welche einen komplexen Lebenszyklus durchlaufen, der eine asexuelle und eine sexuelle Vermehrung umfasst, und der vom Wirtswechsel zwischen Mensch und Mücke geprägt ist.

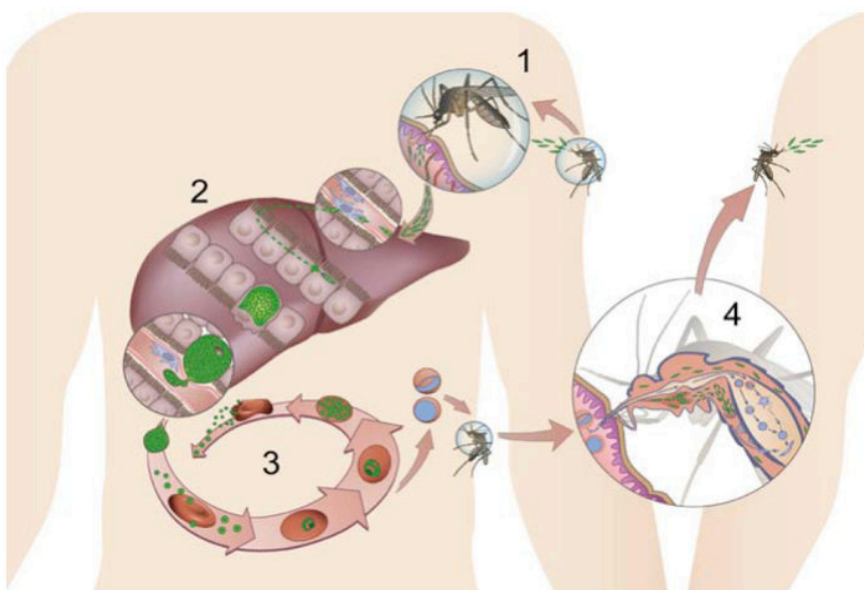


Abbildung 3: Lebenszyklus von Plasmodien im Menschen. 1 Inokulation von Sporozoiten ins humane Subkutangewebe beim Stich einer *Anopheles*-Mücke 2 Migration der Sporozoiten zur Leber, Vermehrung und Entwicklung zu Merozoiten, Bildung von Merosomen durch Ausstülpungen (grün) 3 Freisetzung der Merozoiten und Befall von Erythrozyten, intraerythrozytärer Kreislauf von Merozoiten über Trophozoiten zu Schizonten, Freigabe von Merozoiten ins Blut 4 Aufnahme weiblicher und männlicher Gametozyten in das Darmlumen einer *Anopheles*-Mücke (Quelle: Sturm und Heussler, 2007 (220)) (Details siehe Text)

Durch den Stich einer infizierten weiblichen Stechmücke der Gattung *Anopheles* werden Sporozoiten aus der Speicheldrüse in das menschliche Subkutangewebe inokuliert (Abbildung 3). Von dort treten die Sporozoiten in die Blutgefäße über und erreichen über den Blutkreislauf die Leber des Wirts (10). Dort migrieren sie durch Kupffer'sche Sternzellen (Makrophagen) und mehrere Hepatozyten, bevor sie einen Hepatozyten als Wirtszelle befallen (71, 160). Im Hepatozyten differenziert und multipliziert sich der Sporozoit innerhalb weniger Tage über einen Gewebeschizonten (exoerythrozytäre Schizogonie) zu Tausenden von Merozoiten (220). Die Merozoiten induzieren den Untergang der Wirtszelle und bilden mit Hilfe von deren Membran mit Parasiten gefüllte Vesikel, sogenannte Merosomen. Diese gelangen durch das Epithel in die Blutgefäße und entlassen dort die Merozoiten ins Blut (219).

Freigesetzte Merozoiten invadieren innerhalb kurzer Zeit rote Blutkörperchen (engl. *red blood cell*, RBC), in denen sie sich weiter asexuell durch Schizogonie in einem 48- bzw. 72- (*P. malariae*) Stunden-Rhythmus vermehren. Dieser Rhythmus der Freisetzung von Merozoiten induziert starke inflammatorische Immunreaktionen und ist verantwortlich für die charakteristischen, periodisch auftretenden Symptome der Malaria („Wechselfieber“). Das Wechselfieber ist allerdings nicht charakteristisch für eine *Malaria tropica*, sondern für die *Malaria tertiana* und *quartana*.

Einige Merozoiten entwickeln sich in den RBC zu sexuellen Stadien, den Gametozyten. Die weiblichen und männlichen Gametozyten gelangen bei einer Blutmahlzeit einer Mücke in deren Darm und entwickeln sich dort zu den weiblichen Makrogametozyten bzw. den männlichen Mikrogametozyten. Diese Gametozyten verwandeln sich in der Mücke innerhalb von Minuten zu Gameten. Diese Differenzierung wird bei den Mikrogametozyten als Exflagellation bezeichnet. Mikrogameten befruchten die Makrogameten (sexuelle Vermehrung). Es entstehen bewegliche Ookineten, auch Zygoten genannt. Diese Ookineten wandern durch das Epithelgewebe des Mückendarmes und verbleiben zwischen Epithelzellen und Basalmembran, wo die Ookineten sich weiter zu Oozysten entwickeln. Hier läuft auch die Phase der Sporogonie ab, wobei bis zu mehreren Tausend Sporozoiten gebildet werden. Sporozoiten werden aus der Oozysten freigesetzt und „gleiten“ (72) zur Speicheldrüse der Mücke. Mit der Übertragung der Sporozoiten auf den Menschen bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke schließt sich der Kreislauf (140, 151).

Da die geschlechtliche Fortpflanzung in der Mücke stattfindet, ist diese der Endwirt und der Mensch der Zwischenwirt.

3.4 Aufbau der Erythrozytenmembran

Rote Blutkörperchen enthalten weder einen Zellkern, noch funktionelle Organellen. Die einzige strukturelle Komponente ist die Zellmembran, die für Transport sowie verschiedene antigene und mechanische Charakteristika verantwortlich ist. Erythrozyten haben eine bikonkave Diskusform und sind stark deformierbar. Dies geht ebenfalls auf die Organisation der Zellmembran zurück.

Die RBC-Membran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in welche Proteine, Cholesterin und Phospholipide eingebettet sind. Das Phospholipid Phosphatidylserin ist vorwiegend in der inneren RBC-Membran lokalisiert (244). Die Erythrozytenmembran bindet auf der zytoplasmatischen Seite über Transmembranproteine an ein elastisches zweidimensionales Netz von Skelettproteinen.

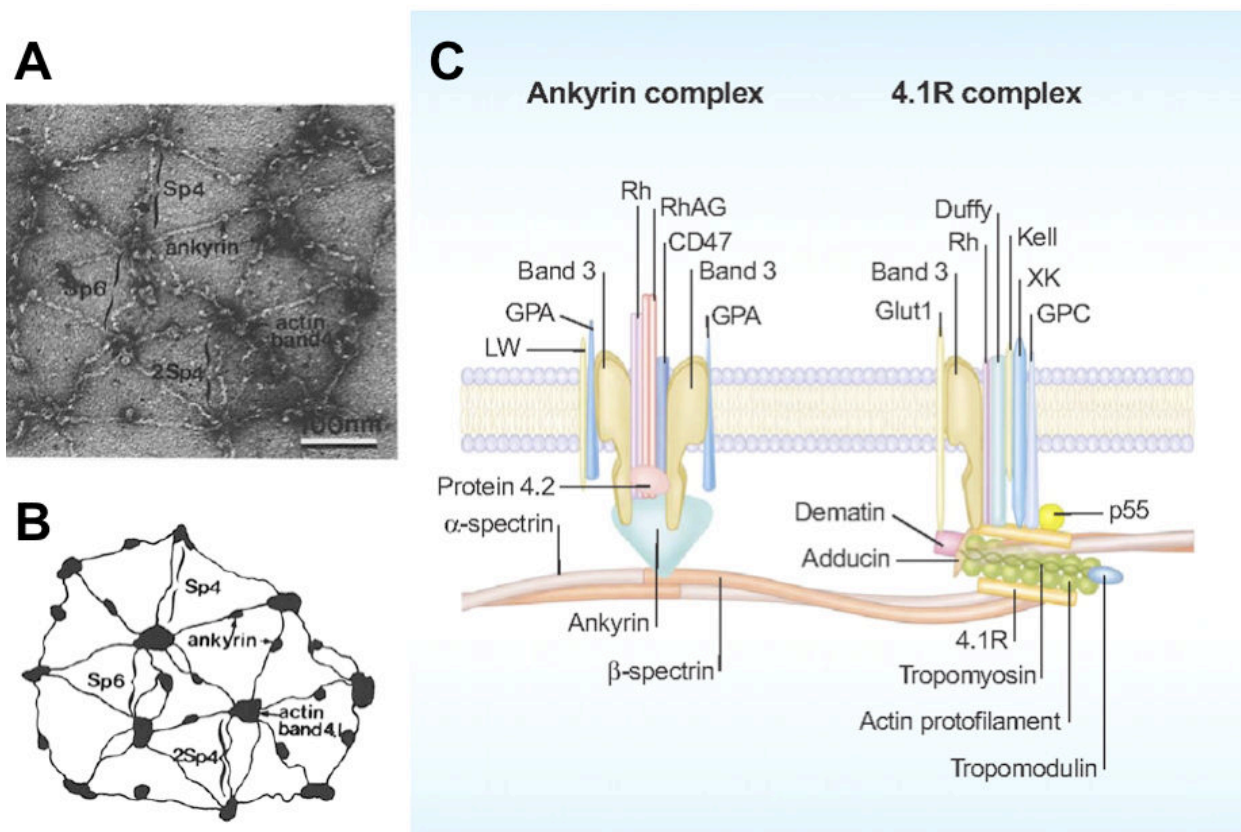


Abbildung 4: Aufbau der Erythrozytenmembran. A: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Spekrinnetzes; B: Schematische Darstellung von A. In beiden Abbildungen sind die Bindungsstellen für Ankyrin, Aktin und Protein 4.1R, genauso wie vernetzte Spekrintetramere (Sp4), -hexamere (Sp6) sowie doppelte Spekrinfilamente (2Sp4), dargestellt. C: Transmembranmoleküle, wie Bande 3, Glykophorin A oder C, binden über Ankyrin oder Protein 4.1R an das Spekringitter. Für Details siehe Text (Quelle A und B: Liu *et al.* 1987 (136); C: Mohandas und Gallagher 2008 (159))

Das zytoplasmatische Netzwerk der Skelettproteine besteht zum großen Teil aus Spektrin, Aktin und Protein 4.1R, auch Bande 4.1 genannt (159). Das filamentöse Spektrin bildet Dimere aus und formt ein hexagonales Gitter (136) (Abbildung 4A, schematisch: Abbildung 4B). Aktin und Protein 4.1R sind an den Knotenpunkten gebunden, an denen sich die Spektrinfilamente treffen, während Ankyrin zwischen zweier solcher Punkte an das Spektrin bindet.

Wichtig für die strukturelle Integrität des Zytoskeletts sind zwei makromolekulare Komplexe von Membranproteinen, von denen der eine Ankyrin-, der andere Protein 4.1R-verankert ist (Abbildung 4C). Die intrazellulären Domänen der Proteine Bande 3, CD47, dem Rhesus assoziierten Glykoprotein (RhAG) und Glykophorin A (GPA) verbinden das Zytoskelett via Ankyrin mit der Lipiddoppelschicht. Glykophorin C, der Rhesusfaktor (Rh), das Duffy-Blutgruppenantigen sowie Bande 3 binden hingegen an Protein 4.1R (159).

Bande 3, Glykophorin A und C sowie das Duffy-Blutgruppenantigen spielen bei der Invasion der Merozoiten eine Rolle, denn an diese Moleküle binden bestimmte Parasitenproteine.

3.5 Entwicklung der Blutstadien von *Plasmodium falciparum*

P. falciparum vermehrt sich innerhalb der Erythrozyten. Die infizierten RBC verändern sich dadurch und exprimieren verschiedene *Plasmodium*-Proteine auf ihrer Oberfläche.

3.5.1 Invasion von Erythrozyten

Die invasiven Stadien (Ookinete, Sporozoiten und Merozoiten) der Apicomplexa weisen einige besondere Organellen auf. So verfügen die Merozoiten über einen Apikal-komplex mit Polringen, Rhoptrien, Mikronemen und dichten Granula. Dieser Komplex spielt eine essentielle Rolle bei der Invasion der Wirtszellen (151).

Der Merozoit verfügt über eine Vielzahl an Oberflächenproteinen, jedoch dominieren Merozoitenoberflächenprotein (engl. *merozoite surface protein*, MSP)-1 und MSP-2, die einen Anteil von etwa zwei Dritteln ausmachen (27, 76, 189). Die meisten dieser Proteine sind über ein Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Molekül in der Membran verankert. Bekannte *Plasmodium*-Proteine, die an der Invasion beteiligt sind, sind MSP-1, MSP-6, MSP-7, MSP-9, apikales Membranantigen 1 (AMA-1), Erythrozyten bindendes Antigen (EBA)-140, EBA-175 oder EBA-181 (80, 110, 122, 145, 226).

Die Invasion der RBC durch die Merozoiten ist der Beginn der erythrozytären Phase des Lebenszyklus. Zunächst erfolgt eine reversible Bindung mit niedriger Affinität zwischen Wirtszelle und Merozoit. MSP-1 bindet an Bande 3 (80, 110, 135), eines der dominantesten Proteine auf der RBC-Oberfläche (143), und unterliegt proteolytischer Spaltung (122). Die Spaltprodukte bilden Komplexe mit anderen MSPs, so z.B. mit MSP-6 und MSP-7 (112, 122) oder mit MSP-9 (110).

Proteine der Mikronemen und der Rhoptrien werden während der Invasion früh freigesetzt und spielen für die Reorientierung des Parasiten mit dem apikalen Ende an die RBC-Oberfläche, für das Ausbilden einer irreversiblen Bindung (engl. *junction*), für die Einstülpung der Membran und für die Formierung der parasitophoren Vakuole (73, 186) eine Rolle. Mit Hilfe von Transmembranproteinen und einem Aktin-Myosin-Motor (58, 185) arbeitet sich der Merozoit mit dem apikalen Ende voran in den Erythrozyten (engl. *moving junction*). Während der Invasion werden Oberflächenproteine auf dem Merozoiten von spezifischen Proteasen, wie Subtilasen und Sheddasen, abgespalten (28, 122, 171). Der gesamte Invasionsvorgang dauert ca. 30 Sekunden (171). Ein Teil der freigesetzten Merozoiten kann seine Zielzellen jedoch nicht erfolgreich infizieren und wird von Phagozyten (Monozyten, neutrophile Granulozyten) aufgenommen.

3.5.2 Die intraerythrozytären Stadien

Im Erythrozyten entwickelt sich der Merozoit innerhalb von 30 Minuten weiter zum frühen Trophozoiten, dem Ringstadium. Dieser wächst zu einem späten Trophozoiten heran. Nach ca. 38 Stunden (22) geht die Entwicklung in die Phase eines Schizonten über, der zwischen 16 und 32 Merozoiten ausbildet. Nach Ruptur der Wirtszelle und der Freisetzung der Merozoiten in den Blutkreislauf beginnt der Kreislauf durch die Invasion neuer RBC von vorne. Ein kleiner Anteil der Merozoiten entwickelt sich zu Gametozyten. Im Blutaussstrich sind nur Ringstadien und, sofern vorhanden, Gametozyten zu sehen (140). RBC, die mit späten Trophozoiten oder Schizonten infiziert sind, exprimieren vermehrt Proteine, die wichtig für eine Zytoadhärenz in den Kapillaren sind. Dieser als Sequestrierung bezeichnete Vorgang ist dafür verantwortlich, dass diese Stadien im Ausstrich nicht mehr zu sehen sind.

3.5.3 Veränderungen infizierter Erythrozyten

Nach der Invasion der Erythrozyten beginnt der Parasit, die Wirtszelle zu verändern. Morphologisch verliert der Erythrozyt während der Entwicklung des Para-

siten seine typische Diskusform, wird sphärisch und bildet kleine Knöpfchen (engl. *knobs*) auf der Oberfläche aus. Diese veränderte Proteinexpression erlaubt dem Parasiten, Moleküle in die und aus der Zelle zu transportieren, die zytoplasmatischen Proteine (z.B. Hämoglobin), in der Nahrungsvakuole aufzuschließen und verändert die RBC-Oberfläche mit der Folge einer verstärkten Zytoadhärenz. Das variante Oberflächenmolekül PfEMP1 (engl. *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*) wird auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert und ist an der Zytoadhärenz (24) sowie der Rosettenbildung beteiligt. Die Vorteile der Zytoadhärenz liegen für den Parasiten darin, dass dieser der Elimination entgeht und schneller einen nicht infizierten Erythrozyten invadieren kann. In der finalen Phase der Schizogonie folgt die nukleare Teilung nebst Merozoitenbildung und -freisetzung.

3.5.4 Veränderungen nicht infizierter Erythrozyten

Neben den infizierten Erythrozyten verändern auch nicht infizierte RBC ihre Oberfläche. Es gibt Hinweise, dass nicht infizierte rote Blutkörperchen, genau wie infizierte RBC, ebenfalls Knöpfchen auf der Oberfläche, bizarre Konturen und eine raue Erscheinung zeigen. Solche Zellen ähneln Erythrozyten, die bei hämatologischen Krankheiten mit Anämie gesehen werden (66). *P. falciparum* ist in der Lage, Erythrozyten schneller altern zu lassen, was sich an erhöhten Werten für Lipidperoxidation und Phospholipidsättigung sowie an vermindertem Phosphatidylserin zeigt (173).

Bei der Freisetzung der Merozoiten in die Blutbahn werden Hunderte von Parasitenproteinen in die Zirkulation freigegeben (147). Es besteht dabei die Möglichkeit, dass einige davon an der Erythrozytenoberfläche haften bleiben. Auch ist ein Teil der Invasionen nicht erfolgreich. Die Oberflächenproteine RSP-2 (engl. *ring surface protein-2*) (57), RAP (engl. *rhoptry associated protein*)-1 und RAP-2 (217) konnten ebenso auf nicht infizierten wie auf infizierten Zellen nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine abgebrochene Invasion hin. Des weiteren konnte auf nicht infizierten roten Blutkörperchen das Protein RESA (engl. *Ring-infected surface antigen*) nachgewiesen werden, wobei angenommen wird, dass der Parasit vorher in der Milz aus dem RBC entfernt worden ist (engl. *pitting*, vgl. Abbildung 6) (167).

3.6 Immunantwort bei der Malaria tropica

Die Inkubationszeit bei der Malaria tropica beträgt ca. 7 bis 30 Tage. Zunächst treten hier Allgemeinerscheinungen wie Kopf- und Gliederschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Abgeschlagenheit und Fieber auf. Das Fieber steigt plötzlich, und der Fiebert Verlauf ist unregelmäßig. So kann allein aufgrund des Fehlens von Fieber eine Malaria nicht ausgeschlossen werden. Unbehandelt können bei der Malaria schwere Komplikationen auftreten.

Zeichen einer schweren Malaria sind ein eingeschränktes Bewusstsein, Erschöpfung (engl. *prostration*), Atemnot, multiple Konvulsionen, Kreislaufkollaps, Lungenödem, abnormale Blutungen, Gelbsucht, Hypoglykämie ($< 2,2$ mmol/L), Hämoglobinurie, Hyperparasitämie, erhöhte Blutlaktatwerte (> 5 mmol/L) sowie schwere Anämie (Hämoglobinwert < 5 g/dL) (163). Eine schwere Anämie ist eine Komplikation, die vorrangig bei Kindern unter zwei Jahren auftritt (62).

Durch regelmäßige Infektionen entwickelt der Mensch eine Immunantwort gegen den Erreger. Eine sterile Immunität, die eine Infektion verhindert, wird jedoch nicht erreicht, lediglich eine Teilimmunität. Diese ist durch die Fähigkeit, die Krankheit und die Parasitämie zu kontrollieren, gekennzeichnet. Auch Neugeborene sind in den ersten Lebensmonaten vor einer Malaria geschützt. Dieser Schutz wird maternalen IgG-Antikörpern zugeschrieben (206). Ein hoher Gehalt an fötalem Hämoglobin (180) und an inhibitorischen Wachstumsfaktoren wie Laktoferrin oder sekretorischem Immunglobulin A, die in Muttermilch und dem Serum von Mutter und Kind vorkommen (111), sind ebenfalls mit einem Schutz vor Malaria assoziiert. Der Schutz ist bei Neugeborenen hoch, schwindet jedoch in den ersten Lebensmonaten. Bereits nach ca. fünf Monaten sind bei einem Großteil der Kinder die maternalen Antikörper völlig verschwunden (192). Mit etwa drei bis vier Monaten werden Kinder anfällig für eine schwere Infektion mit *P. falciparum*. Das noch unreife Immunsystem des Kleinkinds beginnt, eine eigene protektive Immunantwort gegen die Erreger aufzubauen. Nach nur ein bis zwei Infektionen bildet sich ein Schutz vor schweren, nicht zerebralen Krankheitsverläufen (90). Im Alter zwischen zwei und fünf Jahren reduziert sich die Häufigkeit klinischer Infektionen und das Mortalitätsrisiko sinkt drastisch. Das Alter, bei dem diese Protektion beginnt, liegt etwas niedriger bei hoher Transmission, selten jedoch unter zwei Jahren. Mit Beginn der Pubertät sind schwere Verläufe selten, milde klinische Episoden sind hingegen verbreitet (56).

Die natürlich erworbene Immunität kann folgendermaßen charakterisiert werden:

- (i) sie ist abhängig von einer ununterbrochenen, lebenslangen Exposition,
- (ii) sie geht bei Unterbrechung der Exposition verloren,
- (iii) sie ist speziesabhängig,
- (iv) sie ist abhängig vom Entwicklungsstadium des Parasiten, und
- (v) sie wird in einem Maß gewonnen, das abhängig vom Grad der Exposition ist (56).

3.6.1 Angeborene und erworbene Immunität gegen *P. falciparum* Blutstadien

Eine Malaria tropica unterscheidet sich von anderen Infektionskrankheiten dadurch, dass sie monatelang persistieren kann und Menschen für Reinfektionen empfänglich sind, obwohl der Wirt eine Semiimmunität entwickelt. Die Infektion stimuliert eine T-Zell-unabhängige Immunität mit geringem T-Zell-Gedächtnis (233). *P. falciparum* scheint darüber hinaus durch eine Reihe von Mechanismen das Immunsystem zu umgehen und zu unterdrücken (184).

Die weniger spezifische, angeborene Immunabwehr wird beim ersten Kontakt mit *P. falciparum* aktiviert. Makrophagen sowie Neutrophile und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosefaktor α) und IFN- γ (Interferon-gamma) zur Phagozytose angeregt und lysosomale Enzyme, toxische Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid (NO) von Makrophagen freigesetzt (17).

Für die Entwicklung der klinischen Immunität ist die humorale Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Erhöhte Antikörperspiegel sind ein Kennzeichen von Malariainfektionen (45, 195). Immunglobuline werden dabei gegen eine Vielzahl plasmodialer Antigene gebildet, z.B. gegen Proteine von Sporozoiten (CSP (engl. *circumsporozoite protein*) (174)), Merozoiten (AMA-1 (59, 226)) oder Proteine auf infizierten RBC (PfEMP1 (35, 141)).

Die Malariaerreger zeigen eine beträchtliche antigene Diversität und Variation – zwischen den Spezies, den Stämmen und den Entwicklungsstadien. Sie verändern sich im Lauf der Infektion, so dass Immunität gegenüber einer Spezies, einem Stamm oder Stadium wenig Schutz vor anderen bietet (233). Des Weiteren entgeht *P. falciparum* dem Immunsystem durch Sequestrierung fernab von Organen wie Leber oder Milz, die reichlich Phagozyten enthalten, oder indem der Parasit sich in Zellen „versteckt“.

Bei der Freisetzung der Merozoiten in die Blutbahn werden Hunderte von Parasitenprodukten freigesetzt (101, 147), deren Funktion oft unbekannt ist und die mit dem Immunsystem interferieren können. Mindestens zwei dieser Produkte interagieren mit den Toll-like Rezeptoren (TLR) von Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Monozyten). TLRs stehen im Zusammenhang mit der Erzeugung und Aufrechterhaltung eines B-Zell-Gedächtnisses (26). Freigesetztes *P.f.*-GPI wird von TLR2 und zu einem kleinen Teil auch von TLR4 erkannt (166). Ergebnisse einer Studie haben gezeigt, dass das Abbauprodukt Hämozoin von TLR9 erkannt werden kann (44). Diese Erkennung scheint jedoch von der Ummantelung des Hämozoins mit Malaria-DNA abhängig zu sein (178). Ein möglicher Mechanismus, durch den das immunologische Gedächtnis unterdrückt wird, wurde in einem Mausmodell beobachtet: parasitenspezifische B-Zellen zeigten eine Apoptosereaktion, als die Maus mit Malariaparasiten infiziert wurde (242).

Sowohl Typ-1 als auch Typ-2 Zytokine spielen ebenfalls eine Rolle in der Immunantwort gegen *P. falciparum*. Manche Zytokine sind an der Pathogenese beteiligt, auf der anderen Seite profitiert der Wirt aber auch durch sie. Diese Doppelrolle wird gerade für TNF- α ersichtlich. Einerseits wurde eine starke Korrelation zwischen TNF- α -Plasmaspiegeln und zerebraler Malaria (130) bzw. der Schwere der Krankheit (82) gefunden. Ebenso gilt TNF- α in Kombination mit weiteren Zytokinen als entscheidender Beschleuniger von Malariafieber (129). Plasmodien-Produkte wie *P.f.*-GPI (129, 201) oder Hämozoin (183) induzieren eine TNF- α -Produktion in peripheren Monozyten. Andererseits zeigt TNF- α anti-parasitäre Effekte durch die Induktion von Stickstoffmonoxid (15) oder Phagozytose und Zytotoxizität (92, 106, 123).

3.6.2 Natürliche Resistenzen

Eine natürliche Resistenz besteht aufgrund einer physiologischen Inkompatibilität zwischen dem Parasiten und der Wirtsumgebung, die eine Invasion, Etablierung oder das Überleben des Parasiten ohne die Intervention von immunbasierten schützenden Antworten verhindert (233). Sie hat häufig genetische Ursachen. So sind z.B. Menschen ohne das Duffy-Blutgruppenantigen vor einer Infektion durch *Plasmodium vivax* geschützt, da für den Parasiten dieses Oberflächenmolekül der Erythrozyten für die Invasion essentiell ist (155, 156).

Eine natürliche Resistenz kann auch funktionieren, nachdem Merozoiten die Zelle invadiert haben. Individuen, die heterozygot für das Sichelzellhämoglobin (HbS) sind, sind vor einem schweren Verlauf (schwere Anämie, Hyperparasitämie, zerebrale

Malaria) (7, 149) und zum Teil auch vor einem milden Verlauf (238, 239) der Krankheit geschützt, da die Vermehrung der Parasiten in den RBC gehemmt wird.

Weitere genetische Prädispositionen, die vor einer Malaria schützen können, sind α -Thalassämie (236), β -Thalassämie (20), Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-mangel (37), Ovalozytose (Schutz vor zerebraler Malaria) (8), Hämoglobin C (157) und E (237) sowie verschiedene HLA (humanes Leukozytenantigen)-Varianten (100).

3.7 Die Milz und Malaria

Die Milz ist das wichtigste Immunorgan bei der Malaria. Hier werden gealterte und infizierte RBC von Phagozyten aus dem Blutkreislauf entfernt.

3.7.1 Aufbau und Funktion der Milz

Die Milz ist ein zentrales lymphatisches Organ. Sie ist von einer Kapsel aus lockerem Bindegewebe umgeben. Trabekel gehen aus der Kapsel hervor und septieren das Organ. Das funktionelle Milzparenchym wird in eine weiße und eine rote Pulpa sowie Retikulinfasern und Retikulumzellen, die das charakteristische Grundgewebe bilden, unterteilt (vgl. Abbildung 5).

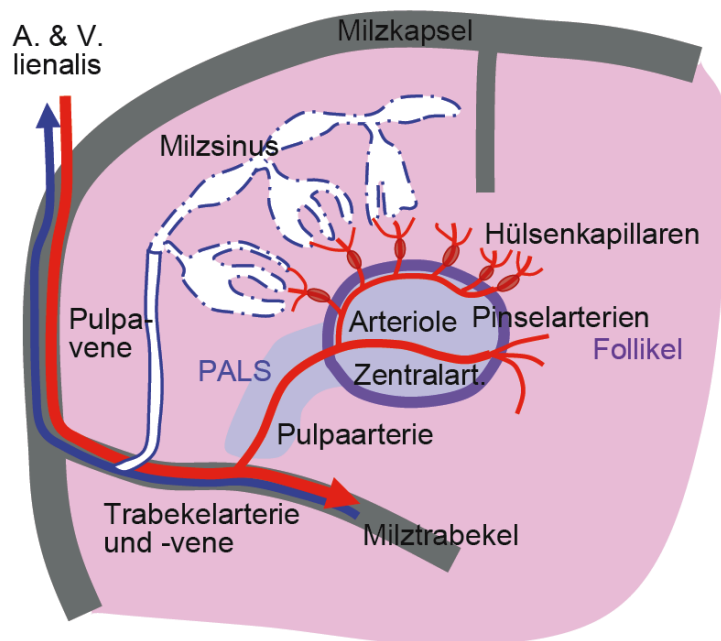


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Milz. (Quelle: PD Dr. Christiane Pfarrer, Frauenklinik, Justus-Liebig-Universität Giessen)

Die weiße Pulpa besteht aus periarteriellen lymphatischen Scheiden, Lymphfollikeln und der Marginalzone, die den Übergang zwischen weißer und roter Pulpa umfasst. Die rote Pulpa ist blutreiches, großlumiges Gewebe, das von retikulärem Bindegewebe umgeben ist, und in dessen Poren Makrophagen lokalisiert sind.

Die weiße Pulpa hat immunologische Funktionen. Dazu gehören Erzeugung und Reifung von B- und T-Lymphozyten, Antikörperbildung und Opsonisierung von Bakterien. Die rote Pulpa übernimmt retikuloendotheliale Funktionen. Gealterte Erythrozyten werden aufgrund ihrer verminderten Deformierbarkeit oder gebundener Autoantikörper (115, 116), ebenso wie Bakterien und andere Fremdkörper, aus dem Blut gefiltert. Darüber hinaus kann die Milz erythrozytäre Einschlusskörper entfernen (39). Sie dient zudem als Speicherorgan für Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten.

3.7.2 Die Rolle der Milz bei der Malaria

Die Milz ist das wichtigste Immunorgan zur Bekämpfung der Malaria tropica. Eine Splenomegalie wird bei Kindern aus Malariaendemiegebieten regelmäßig diagnostiziert, sie geht aber mit dem Abklingen der Infektion zurück (83). Die Milz ist in der Lage, parasitierte rote Blutkörperchen aus der Zirkulation zu entfernen. Weiterhin ist die „*clearance rate*“ (engl., Zeit bis zur vollständigen Entfernung dieser Zellen aus der Zirkulation) von mit IgG-opsonierten RBC bei Malaria erhöht (133). Diese Elimination parasitierter RBC aus dem Blut kann Fc-Rezeptor-vermittelte Immunmechanismen zur Ursache haben (102). Es spielen aber auch eine erhöhte retikuloendotheliale Aktivität (182) und eine verminderte Deformierbarkeit der RBC (138) eine Rolle. Die Milz verfügt darüber hinaus über einen besonderen Mechanismus, um Parasiten zu eliminieren (siehe Abbildung 6). Sie extrahiert Parasiten aus Erythrozyten, ohne diese zu lysieren (engl. *pitting*) (12, 41, 167, 200).

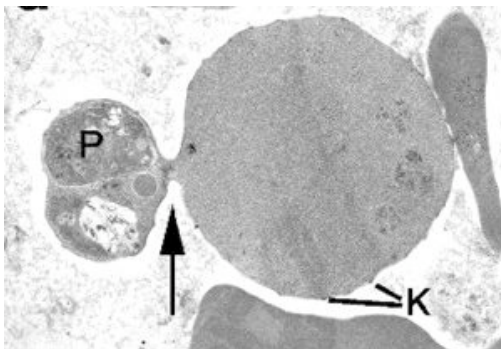


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Milz eines Malariapatienten beim „pitting“. Zu sehen ist ein infizierter Erythrozyt, der kleine Knöpfchen (engl. *knobs*, K) auf der Oberfläche zeigt. Der Teil des Erythrozyten, der den Parasiten (P) enthält, zeigt eine Einschnürung des Zytoplasmas (Pfeil). Quelle: Urban *et al.*, 2005 (227)

Die verschiedenen immunologischen Abläufe in der Milz hängen zusammen. Nach Phagozytose der Parasiten durch retikuläre Makrophagen der roten Pulpa migrieren diese in die weiße Pulpa. Dort präsentieren sie die parasitären Antigene den Lymphozyten, gegen die in der weißen Pulpa Antikörper für die Fc-vermittelte Phagozytose von den Lymphozyten gebildet werden.

Die Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES) reagieren als Antwort auf eine akute Malaria mit Proliferation und Hyperaktivität. Dies hat zur Folge, dass nicht infizierte RBC (nRBC) ebenso wie infizierte RBC (iRBC) phagozytiert und so aus der Zirkulation entfernt werden (152).

Die zentrale Bedeutung der Milz bei der Malaria wird deutlich bei Patienten, an denen eine Splenektomie vorgenommen wurde. Hier sind bei einer Infektion mit *P. falciparum* Stadien, die normalerweise nicht im Blutaussstrich sichtbar sind (späte Trophozoiten, Schizonten, unreife Gametozyten), im peripheren Blut nachweisbar (21).

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Milz einerseits eine mechanische Funktion hat, durch die fremde und pathologische Blutbestandteile herausgefiltert werden. Andererseits hat die Milz eine immunologische Funktion.

3.8 Malaria und Anämie

Malaria kann Anämie unterschiedlichen Ausmaßes hervorrufen, angefangen bei einer leichten Erniedrigung des Hämoglobinwerts in asymptomatischen Patienten (127), bis hin zu einer lebensbedrohlichen schweren Anämie aufgrund einer akuten oder anhaltenden Infektion (2). Eine schwere Anämie ist definiert als Hämoglobinwert unter 5 g/dL oder Hämatokrit von unter 15% (163). Bis zu der Hälfte aller Todesfälle durch Malaria werden einer schweren Malariaanämie zugeschrieben (121). Häufig bleibt die Anämie noch Wochen nach Elimination der Parasiten bestehen (241).

Die molekularen Mechanismen, die der Malaria assoziierten Anämie zugrunde liegen, sind komplex, multifaktoriell und bislang nicht vollständig erforscht. Es ist wahrscheinlich, dass unterschiedliche pathogene Mechanismen in die verschiedenen Formen der Anämie involviert sind (152).

Der Grad der Eliminierung nicht infizierter und infizierter RBC hängt von verschiedenen Faktoren wie Immunstatus, Alter, erblichen Faktoren, Dauer der Infektion und lokalem Malariaendemiegrad ab (62). Eine schwere Anämie entwickelt sich im Laufe einer Infektion häufig sehr schnell. Je schwerer die Krankheit verläuft, desto stärker fällt auch der Hämatokrit (163).

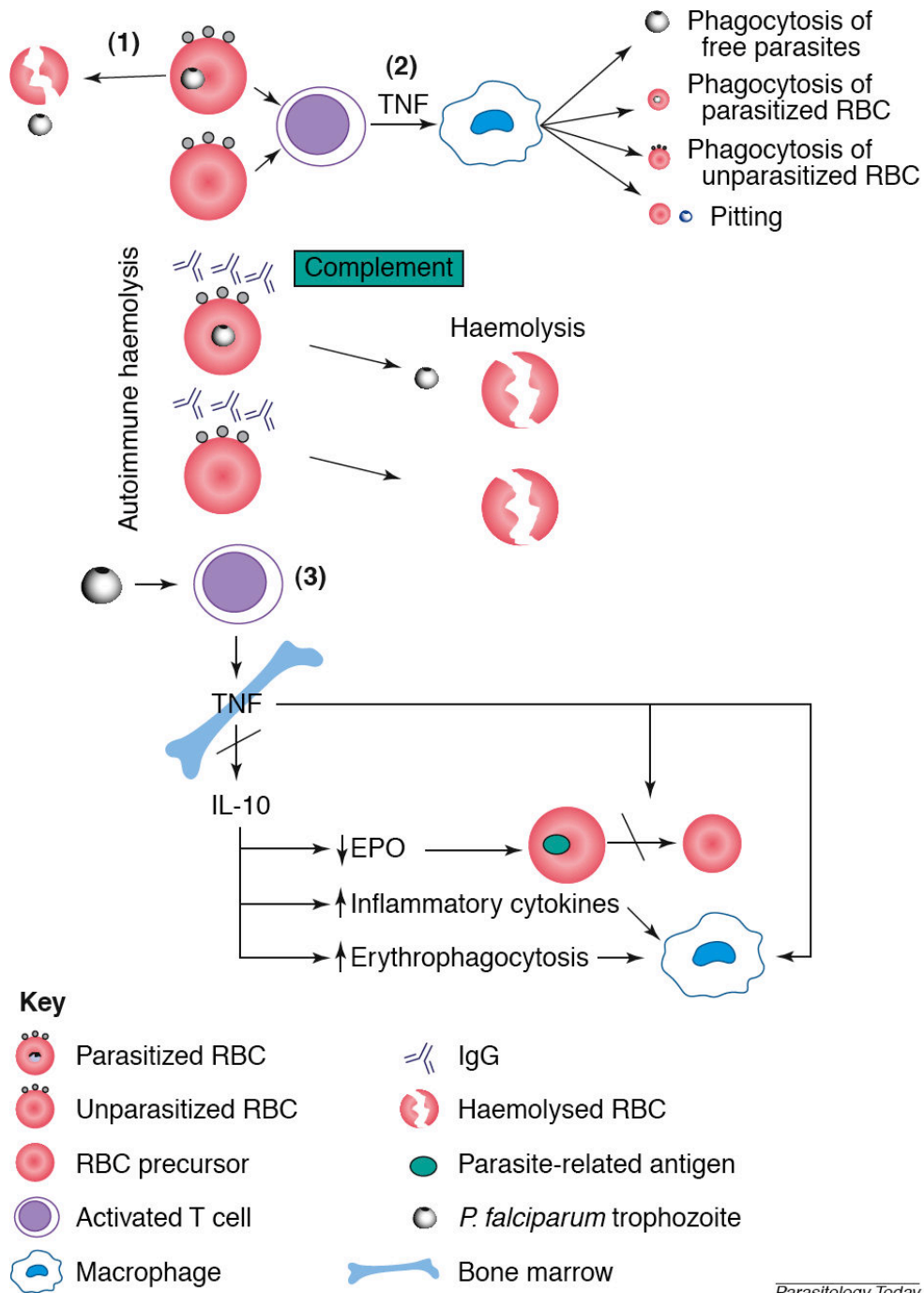


Abbildung 7: Vermutete Mechanismen der Zerstörung von Erythrozyten bei einer Malaria. (1) Ruptur infizierter Erythrozyten (RBC) durch intrazelluläre Vermehrung von Merozoiten. (2) Die Bindung von Parasitenprodukten an nicht infizierte und infizierte RBC führt zur Phagozytose durch aktivierte Makrophagen. Zusätzlich werden in der Milz Parasiten aus Erythrozyten ohne Lyse extrahiert (engl *pitting*). Deposition von Immunglobulinen oder Komplement auf der RBC-Oberfläche von sowohl nicht infizierten als auch infizierten RBC führt zur Autoimmunhämolyse. (3) Durch Parasitenantigen stimulierte T-Helfer-Zellen (Th1) produzieren Tumornekrosefaktor (TNF). Es gibt einen negativen Rückkopplungsmechanismus: durch TNF wird die Bildung von Interleukin 10 (IL-10) durch Th2-Zellen stimuliert. IL-10 reguliert die Phagozytoseantwort herunter: IL-10 inhibiert die Synthese vieler inflammatorischer Zytokine, es stimuliert die humorale Immunität und agiert synergistisch mit Erythropoietin (EPO) in der Förderung der Erythropoese. Resultate dieses Zytokinungleichgewichtes sind Knochenmarkssuppression, Dyserythropoese, Erythrophagozytose und ein Mangel des IL-10 Synergismus mit EPO. (Quelle: Menendez *et al.*, 2000 (152))

Generell liegt der Anämie ein Ungleichgewicht zwischen einer übermäßigen Elimination von RBC und einer verminderten Erythrocytenproduktion zugrunde. Zusätzlich zur Zerstörung infizierter RBC wird ein Übermaß an nicht infizierten Erythrocyten eliminiert. Die Patienten leiden weiterhin oft an einer Knochenmarksdysfunktion, die die gesteigerte Destruktion nicht infizierter RBC nicht kompensieren kann (2, 128). Hämolyse spielt eine größere Rolle bei nicht immunen Kindern mit einer akuten Infektion, wohingegen Dyserythropoiese bei Patienten mit rezidivierenden oder regelmäßigen Infektionen auftritt (152). Einige der Mechanismen, die bei der Entstehung einer Malariaanämie eine Rolle spielen, sind in der Abbildung 7 dargestellt.

3.8.1 Ursachen einer gesteigerten RBC-Zerstörung

Infizierte Erythrocyten gehen nach dem 48-Stunden-Entwicklungszyklus der Parasiten unter Freisetzung der Merozoiten unter, jedoch unterliegt nur ein Teil der Zellen intravasaler Hämolyse. Ein Großteil an RBC wird extravasal eliminiert. Wahrscheinlich geschieht dies durch Phagozytose (63). Die endgültige Zerstörung der RBC findet vermutlich in der Milz statt. Allerdings ist der Fall des Hämoglobinwerts häufig größer als sich durch die Zerstörung infizierter RBC allein erklären lässt (54, 107). Es wird geschätzt, dass ca. 9 von 10 zerstörten Erythrocyten nicht mit *P. falciparum* infiziert sind (107, 188).

Bis heute ist wenig bekannt über die Mechanismen, welche insbesondere die Entfernung der nicht infizierten Erythrocyten zur Folge haben. Da nicht infizierte RBC im Mikroskop keine morphologischen Veränderungen zeigen, wird vermutet, dass die Phagozytose durch Membranveränderungen vermittelt ist. Dabei kann z.B. die Alterung der RBC beschleunigt sein (207), wodurch Phosphatidylserin auf der RBC-Oberfläche präsentiert wird (119). Die Elimination von RBC bei Kindern mit schwerer Malariaanämie kann darüber hinaus noch verschiedene andere Ursachen haben (Tabelle 1), z.B. ein Ungleichgewicht von Zytokinen (erhöhte Konzentrationen von TNF- α und erniedrigte Interleukin (IL)-10-Spiegel) (175) oder oxidativer Stress durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (85-87). Auch ist die Deformierbarkeit der RBC bei einer schweren Malaria stark reduziert (169). Die verminderte Deformierbarkeit korreliert dabei mit dem Grad der Anämie (54, 55). RBC mit erniedrigter Deformierbarkeit unterliegen einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, von der Milz aus der Blutzirkulation entfernt zu werden (54). Gealterte RBC weisen ebenfalls eine verminderte Deformierbarkeit auf (32), so dass die Vermutung nahe liegt, dass RBC bei einer schweren Malaria schneller altern (207).

Eine Form der Anämie (auch Schwarzwasserfieber genannt) wird durch eine Hapten induzierte, intravaskuläre Hämolyse hervorgerufen und äußert sich durch Hämoglobinämie und (Met-)Hämoglobinurie. Die genaue Pathogenese ist unklar (79). Es wird angenommen, dass das Malariatherapeutikum Chinin als Hapten fungiert und zusammen mit einem unbekanntem RBC-Protein als Antigen wirkt (152). Schwarzwasserfieber wurde zunächst bei Auswanderern diagnostiziert, welche an Malaria erkrankt waren und Chinin unregelmäßig als Prophylaxe eingenommen hatten. Heute wird es durch erneuten Gebrauch von Chinin wieder häufiger beobachtet (79) und kann durch moderne Antimalariatherapeutika, wie Halofantrin oder Mefloquin, verstärkt werden (228).

Die immunvermittelte Hämolyse durch Opsonisierung ist ein weiterer vermuteter Mechanismus bei der Malaria assoziierten Anämie (163). Immunglobuline und Komplementfaktoren auf RBC wirken synergistisch in der Phagozytoseaktivierung. Es gibt Hinweise darauf, dass bei der Malariaanämie an die Erythrozytenoberfläche gebundene Immunglobuline (67, 194, 232) bzw. Komplementfaktoren (69, 81, 241) beteiligt sind (siehe auch Abbildung 7).

Tabelle 1: Mechanismen, die zur Eliminierung nicht parasitierter RBC führen können. (nach: Ekvall 2003 (62))

<i>Mögliche Mechanismen der Elimination nicht infizierter RBC</i>
IgG-Bindung <ul style="list-style-type: none"> - Autoantikörper gegen aggregierte Bande 3 - IgG spezifisch für Parasitenantigene - Immunkomplexbindung
Komplementbindung <ul style="list-style-type: none"> - Mangel an regulatorischen Komplementproteinen
Zytokinungleichgewicht (erhöhte TNF- α -, erniedrigte IL-10-Konzentrationen)
Verminderte Deformierbarkeit der RBC
Externalisation von Phosphatidylserin
Schäden durch freie Radikale
Unspezifische Milzvergrößerung

Die Erythrozyten von Patienten mit einer schweren, Malaria assoziierten Anämie zeigen Veränderungen der regulatorischen Komplementmoleküle zusammen mit einem erhöhten Vorkommen von IgG auf der Oberfläche. Dadurch kann es via Komplementaktivierung zu Phagozytose und Lyse der RBC kommen (231, 232).

Ein weiteres Phänomen, das häufig bei einer Infektion mit *P. falciparum* beobachtet wird und das zur Anämie beitragen kann, ist die Rosettenbildung (engl. *rosetting*). Unter Rosettenbildung versteht man die Fähigkeit von infizierten RBC, nicht infizierte RBC an sich zu binden (77, 179, 214). Es gibt eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Rosettenbildung und Malariaanämie: Bei Kindern mit Anämie kommt die Rosettenbildung signifikant häufiger vor als in nicht anämischen Kindern (198). Das Wissen über die molekularen Mechanismen, die zur Rosettenbildung führen, ist begrenzt, jedoch braucht der Parasit menschliches Serum oder Plasma dazu. Ein Ligand auf dem infizierten Erythrozyten ist PfEMP1 (214). Mögliche Wirtszellrezeptoren sind Komplementrezeptor 1 (engl. *complement receptor 1*, CR1) (161) und Blutgruppenantigene, insbesondere Blutgruppenantigen A (23). Dagegen schützt die Blutgruppe 0 vor einer schweren Malaria durch reduzierte Rosettenbildung (196). Es scheint sicher, dass Immunglobulin M (IgM) als Brückenmolekül agiert (198). Durch die Rosettenbildung kann der Parasit dem Immunsystem des Wirts entgehen (197).

3.8.2 Ursachen für eine verringerte RBC-Produktion

Die Ursachen für eine geminderte RBC-Produktion sind ebenfalls vielfältig. So ist die Neubildung von Retikulozyten bei einer akuten Malariainfektion verzögert, was auf eine vorübergehende Unterdrückung der normalen Antwort auf das Hormon Erythropoietin (EPO) hindeutet (128, 181). Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch einen auto-logen Serumfaktor vermittelt, der das Wachstum von Vorläuferzellen der Erythrozyten unterdrückt (108).

Bei einer chronischen Infektion mit *P. falciparum* ist das Knochenmark hyperaktiv, jedoch ist die Erythropoiese ineffektiv. Das Malariaprodukt Hämozoin verringert die Transkription des Stammzellenwachstumsfaktors (SCGF, engl. *stem cell growth factor*), und die SCGF-Spiegel korrelieren positiv mit Hämoglobinspiegeln und Retikulozytenproduktion. Bei Kindern mit reduzierter Erythropoiese und mit erhöhten Spiegeln an Hämozoin, das von Monozyten phagozytiert wird, waren die SCGF-Spiegel erniedrigt (117).

Die Rolle des Erythropoietins wird im Zusammenhang mit der Malariaanämie kontrovers diskutiert. Einerseits gibt es Hinweise darauf, dass bei afrikanischen Kindern mit Malaria das Hormon vermehrt ausgeschüttet wird (36, 170). Andererseits ist die EPO-Konzentration in Erwachsenen nicht so stark erhöht wie bei anderen Formen der Anämie ohne eine Infektion, so dass ein relativer Mangel vorliegt (65). Die Gründe für

die Dyserythropoiese in Gegenwart von EPO sind nicht abschließend geklärt. Eine Rolle spielen dabei die Sekretion von Zytokinen, die von aktivierten T-Lymphozyten während der Infektion freigesetzt werden (43, 148, 158), die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid (14, 85, 126), Makrophagendysfunktion (204) oder ein direkter Effekt der Parasiten bzw. von Parasitenprodukten auf das Knochenmark (235).

3.8.3 Zusätzliche Faktoren, die eine Anämie beeinflussen

Verschiedene Faktoren fördern die Entstehung einer Anämie. Auf Seiten des Parasiten ist das einerseits der Endemiegrad, andererseits spielen Resistenzen gegen Malariamedikamente eine Rolle. In Gegenden mit einer geringen und jahreszeitabhängigen Transmissionsrate ist die Gefahr einer zerebralen Malaria hoch, während in Gegenden mit einer anhaltend hohen Transmissionsrate Fälle von schwerer Anämie häufiger vorkommen. Trotz bekannter Medikamentenresistenzen wurden Fieberschübe häufig mit Chloroquin behandelt, was zu einem Therapieversagen und einer verstärkten Anämie führte. Denn solange die Parasiten nicht vollständig eradiziert sind, folgt nicht die erwartete Retikulozytose (64, 225).

Auf Seiten des Wirtes tragen Alter, genetische Faktoren, Eisen- und Spurenelementmangel sowie Begleitinfektionen eine Rolle. Junges Alter *per se* kann zur Anämie beitragen. So kommen Fälle von Anämie grade bei Kindern von unter zwei Jahren vor. Auch in Gegenden mit geringer Transmissionsrate ist diese Komplikation bei jungen Kindern häufiger als bei älteren (188). Eine Infektion mit *P. falciparum* setzt die Funktion des Immunsystems herab. Koinfektionen mit anderen Erregern sind häufig. Eine Bakteriämie mit nicht typhösen *Salmonellen*, *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pneumoniae* wird oft gesehen (162). Weiterhin verstärken Hakenwurm- und Schistosomeninfektionen eine Malaria assoziierte Anämie (34, 216).

3.8.4 Rolle des Malariatoxins (P.f.-GPI)

Das parasitäre GPI (*P.f.*-GPI) wird auch als Malariatoxin bezeichnet. Viele Studien sprechen dafür, dass *P.f.*-GPI eine entscheidende Rolle bei der inflammatorischen Antwort spielt, die mit der zyklischen Freisetzung von Merozoiten und periodischen Fieberphasen assoziiert ist. *P.f.*-GPI bindet an Toll-like-Rezeptoren und induziert die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-12 in peripheren Makrophagen (124, 201, 229, 243).

GPIs sind eine Klasse von Molekülen, welche unterschiedliche Proteine mit der

Zellmembran kovalent verbinden. Der Unterschied zwischen *P.f.*-GPI und GPI von Säugetieren besteht unter anderem im Vorkommen eines vierten Mannosemoleküls und der Art von Fettsäuren am Phosphatidylinositolende (50). Beispiele für GPI-verankerte *Plasmodium*-Proteine sind verschiedene MSPs, RAMA (engl. *rho*try-associated membrane antigen) und Pf34. Auch Proteine von Protozoen anderer Gattungen, wie *Trypanosoma*, *Leishmania* oder *Toxoplasma*, verfügen über GPI-Anker.

Der interzelluläre Transfer von GPI-verankerten Proteinen ist wiederholt beschrieben worden (120, 131, 187, 191, 212). Diese Beobachtung stimmt mit der Hypothese überein, dass der GPI-Anker von *P. falciparum*-Molekülen (*P.f.*-GPI) in die Membran von RBC inserieren kann. In der Konsequenz könnten derart markierte Zellen der humoralen und zellulären Immunabwehr des Wirtes zugänglich sein und lysiert werden.

3.8.5 Rolle des Malariapigments (Hämozoin)

Der Parasit ernährt sich vom intrazellulären Hämoglobin, das als Aminosäurequelle und zur Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks in der Zelle dient (134). Dabei wird das Hämoglobin zu Häm abgebaut. Verschiedene Proteine, die daran beteiligt sind, wurden identifiziert (70). *P. falciparum* kann das toxische Häm nicht weiter degradieren. Stattdessen wird es zu Hämozoin biomineralisiert (60, 61, 99). Hämozoinkristalle bestehen aus Polymeren von Hämgruppen, die über Eisen-Carboxylatbindungen miteinander verbunden sind (Abbildung 8A und Abbildung 8B) (211). Hämozoin wird auch als Malariapigment bezeichnet, da es mikroskopisch gut an seiner bräunlichen Farbe erkennbar ist. Ausserdem hat Hämozoin die Eigenschaft, Licht zu depolarisieren (Abbildung 8C). So kann es auch mit speziellen Filtern für depolarisiertes Licht im Durchflusszytometer nachgewiesen werden.

Am Ende des intraerythrozytären Kreislaufs wird das Hämozoin zusammen mit den Merozoiten in die Blutzirkulation freigegeben. Monozyten und neutrophile Granulozyten phagozytieren das freie Hämozoin. Dies ist im Durchflusszytometer daran zu erkennen, dass die betroffenen weißen Blutkörperchen positiv für eine Depolarisation sind (93, 203). Mehrere Studien sprechen für einen Zusammenhang zwischen Pigment tragenden Leukozyten (PCL) und der Schwere der Krankheit (11, 144, 154) bzw. zwischen PCL und einer Dyserythropoiese und Anämie (19, 38, 78).

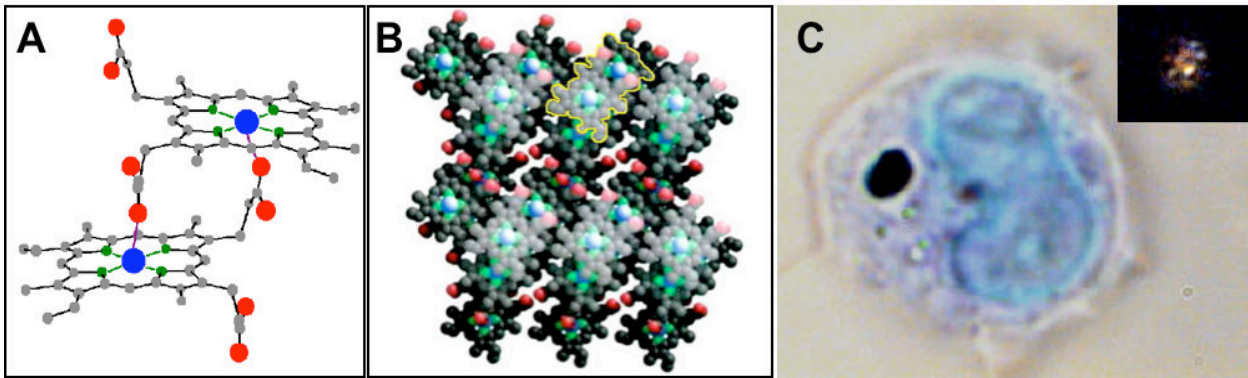


Abbildung 8: Struktur von Hämozoin. A) Zu sehen ist ein Hämdimer, das durch Eisen-Carboxylatbindungen der Monomere verbunden ist. B) Dargestellt Hämozoin, als Hämpolymer. Ein Dimer ist durch eine gelbe Linie hervorgehoben. Die Schichtstruktur ist erkennbar. (Quelle: Pagola *et al.* 2000 (177)) C) Hier ist ein Hämozoin haltiger Monozyt dargestellt. Das Hämozoin, das im großen Bild als schwarzer Einschluss erkennbar ist, leuchtet im in dem kleineren Bild rechts oben Dunkelfeldmikroskop. (Quelle: Physikalisch-Technische Bundesanstalt)

3.9 Zielsetzung

Bei der Malaria tropica mit der Komplikation einer schweren Anämie werden neben den durch *P. falciparum* infizierten Erythrozyten in großem Ausmaß auch nicht infizierte Erythrozyten eliminiert. Es wird angenommen, dass die Membran der nicht infizierten RBC auch verändert ist, so dass diese Zellen immunologisch erkannt und aus der Zirkulation entfernt werden. Diese Veränderungen können durch Bindung verschiedener Wirtsmoleküle (z.B. Immunglobulin G oder M) oder *Plasmodium*-Moleküle (z.B. Glykosylphosphatidylinositol (*P.f.*-GPI)) an der Oberfläche mit bedingt sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden:

- I. ob Erythrozyten von Malariapatienten aus einem holoendemischen Gebiet vermehrt Immunglobuline (IgG oder IgM) oder den Komplementfaktor C3d auf der Membran gebunden haben;
- II. inwieweit sich die Häufigkeit des Vorkommens einer Bindung dieser Moleküle oder deren Quantität bei Patienten mit unterschiedlichen Formen und Schweregraden der Malaria tropica unterscheiden;
- III. ob die Präsenz bzw. Zugänglichkeit wichtiger Membranrezeptoren der Erythrozyten (z.B. Glykophorin A) bei den Malariapatienten beeinflusst ist.

Bei einer Trypanosomiasis ist ein Transfer von GPI-Molekülen von Trypanosomen auf Erythrozyten beschrieben worden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden:

- IV. ob *P.f.*-GPI in die Membran gesunder Spenderzellen inserieren kann und darin durch Antikörper von Malariapatienten erkannt wird;
- V. von welchen Faktoren die Bindung und Erkennung von *P.f.*-GPI abhängt und durch welchen Antikörperisotyp diese Erkennung vermittelt wird.

Das Hämoglobinabbauprodukt Hämozoin wird von peripheren Leukozyten phagozytiert und steht möglicherweise in Beziehung zur Malaria assoziierten Anämie. Hier sollte:

- VI. die Studienkohorte auf das Vorhandensein und die Häufigkeit Pigment tragender Monozyten und Neutrophilen untersucht werden und
- VII. nach Unterschieden in der Verteilung von Pigment tragenden Leukozyten bei verschiedenen Formen und Schwere der Malaria tropica gesucht werden.

4 Material und Methoden

Ein Teil der Experimente wurde am Bernhard-Nocht-Institut (BNI) für Tropenmedizin in Hamburg, ein weiterer Teil am Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR) in Kumasi, Ghana, durchgeführt.

4.1 Patienten

4.1.1 Anämiestudie

Zur Detektion von Oberflächenveränderungen auf roten Blutkörperchen (RBC, engl. *red blood cells*) und zum Nachweis Hämozoin tragender peripherer Leukozyten wurde eine Anämiestudie an Patienten aus einem Malariaendemiegebiet in Ghana durchgeführt. In der Abbildung 9 ist die Abfolge der Untersuchungen, die mit dem Patientenblut durchgeführt worden, dargestellt. Das Plasma wurde abzentrifugiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

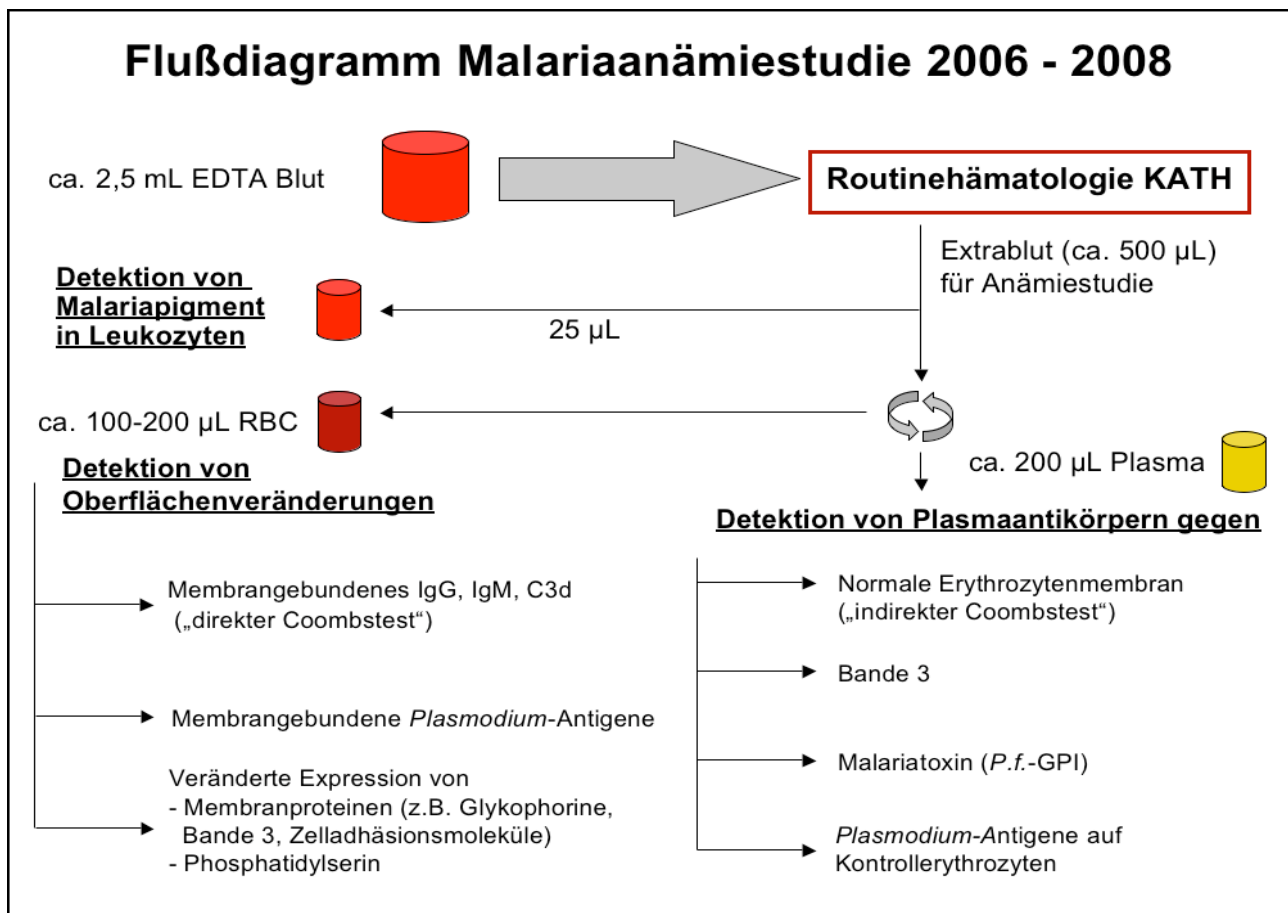


Abbildung 9: Schematische Reihenfolge der Blutuntersuchungen.

4.1.1.1 Studiengebiet

Das Studiengebiet liegt in einem hyperendemischen Malariagebiet in der Ashantiregion in Ghana. In der Region gibt es eine Hauptregenzeit von April bis August und eine kleinere Regenzeit von Oktober bis November. Die Malariapatienten präsentierten sich am lokalen Lehrkrankenhaus der zweitgrößten Stadt Ghanas, dem Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Kumasi. Sie wurden dort klinisch und hämatologisch untersucht, nach unten genannten Kriterien ausgewählt und jeweils 500 µl Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Blut wurden ins Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR) überführt.

Die Studie wurde zum Großteil während der Regenzeit durchgeführt. Der erste Teil fand in der Zeit von September bis Dezember 2006 statt, der zweite Teil von August 2007 bis Februar 2008.

Alle Untersuchungen zu Hämozoin und Oberflächenveränderungen auf Erythrozyten wurden auf dem CyFlow[®] SL blau in Kumasi durchgeführt.

4.1.1.2 Studienkohorte

Alle Patienten waren mit *Plasmodium falciparum* infiziert. Die Patienten der Studie wurden in folgende vier Gruppen zu je 30 Kindern eingeteilt:

- I. Patienten mit schwerer Malaria assoziierter Anämie ohne weitere Komplikationen (Hämoglobin \leq 5 g/dL); n = 14
- II. Patienten mit schwerer Malaria assoziierter Anämie (Hämoglobin \leq 5 g/dL) mit zusätzlichen Komplikationen (siehe Tabelle 2); n = 33
- III. Patienten mit einer schweren Malaria (siehe Tabelle 2), jedoch ohne eine schwere Anämie (Hämoglobin \geq 6 g/dL); n = 49
- IV. Asymptomatische Patienten, Hämoglobin $>$ 8 g/dL; n = 26

Das Alter der Kinder der Gruppen I und II lag zwischen sechs Monaten und fünf Jahren. Die Patienten der Gruppen III und IV waren zwischen ein und zehn Jahre alt.

Die Zahl in den Klammern gibt die tatsächlich gesammelte Anzahl der Proben in den einzelnen Gruppen an. Darüber hinaus gab es eine Kontrollgruppe mit 11 gesunden erwachsenen Europäern, welche noch nie mit *Plasmodium falciparum* infiziert waren.

Die Proben wurden von einem Masterstudenten für Labortechnologie („laboratory technology“) an der KNUST (Kwame Nkrumah University of Science and Technology (Universität in Kumasi, Ghana)) nach oben genannten hämatologischen Kriterien ausgewählt, noch am selben Tag ins KCCR gebracht und untersucht.

Tabelle 2: Komplikationen im Rahmen einer *Plasmodium falciparum*-Infektion bei Kindern mit der Häufigkeit des Auftretens.

<i>Klinische Manifestationen einer schweren Malaria tropica bei Kindern</i>	<i>Häufigkeit^a</i>
Schwere Anämie (Hämoglobin < 5g/dl bzw. Hämatokrit < 15%)	+++
Unfähigkeit zu sitzen bzw. bei kleineren Kindern die Unfähigkeit zu trinken (engl. <i>prostration</i>)	+++
Eingeschränktes Bewusstsein bis hin zum Koma	+++
Atemnotsyndrom (engl. <i>respiratory distress</i>) mit azidotischer Atmung	+++
Mehrfache Konvulsionen	+++
Kreislaufkollaps	+
Ikterus	+
Lungenödem (radiologisch)	(+)
Ungewöhnliche Blutungen	(+)
Hämoglobinurie (dunkelroter bis schwarzer Urin)	(+)
Weitere Manifestationen: <ul style="list-style-type: none"> ○ Hypoglykämie (Vollblutkonzentration <2,2 mmol/L) ○ Azidose (Hydrogencarbonatkonzentration <15 mmol/L oder Basenexzess >-10 mmol/L) ○ Hyperlaktatämie (Plasmalaktat >5 mmol/L) ○ Hyperparasitämie (> 4% bei nicht immunen Kindern, ≥ 20% in Gebieten mit stabilem Endemiegrad) ○ Nierenschädigung (Urinproduktion < 12 mL/Kg/24 Stunden) 	

^aauf einer Skala von + bis +++, (+) unregelmäßiges Vorkommen (verändert nach : NN, Severe falciparum malaria (163))

4.1.2 Seren und Erythrozyten

Für alle Serumproben liegt die Zustimmung des zuständigen Ethikkomitees vor.

4.1.2.1 Seren für *P.f.*-GPI-Test

4.1.2.1.1 Seren von Kindern mit schwerer, komplizierter Malaria

Im Rahmen einer Genassoziationsstudie wurde Kindern im Alter von sechs und 96 Monaten, die mit einer schweren Malaria im KATH in Kumasi, Ghana, aufgenommen wurden, 1 mL Blut für die Routineblutuntersuchungen abgenommen. In der Zeit von Juli bis September 2004 wurden unserem Arbeitskreis für eine Anämiepilottstudie je ca. 300 µL der Blutproben überlassen.

4.1.2.1.2 Seren von weiteren Patienten mit Malaria

Verwendet wurden drei Seren von Erwachsenen im Alter von 18 bis 58 Jahren aus einem Malariagebiet um Tamale im Norden Ghanas, die an einer schweren Malaria erkrankt waren, und welche uns von Dr. Stephan Erhardt aus der Abteilung der klinischen Forschung des BNI zur Verfügung gestellt wurden.

4.1.2.1.3 Mischung aus Immunsereen

Es wurden zwei Serungemische jeweils von Erwachsenen aus einem Malariaendemiegebiet, dem Afigya Sekyere District, in der Ashanti-Region in Ghana, verwendet:

Mischung A: Gemisch aus zwei Seren,

Mischung B: Gemisch aus acht Seren.

4.1.2.1.4 Patient mit akuter schwerer Malaria

Im Januar 2006 wurde ein Patient mit schwerer Malaria in die Bernhard-Nocht-Klinik in Hamburg aufgenommen. Er präsentierte sich dort mit folgender Symptomatik: komplizierte *Malaria tropica* mit einer Parasitämie von ca. 30%, Anämie (Hämoglobingewert (Hb) 7,4 g/dL), Thrombozytopenie, transientes akutes Nierenversagen, Koagulopathie, Bewusstseinstörung.

Die Therapie erfolgte durch Gabe von Clindamycin und Chinin.

Bei seiner Entlassung eine Woche später war der Patient parasitenfrei. Der Patient erholte sich vollständig und kam wiederholt zu Kontrolluntersuchungen in die Bernhard-Nocht-Klinik. An verschiedenen Tagen ist dem Patienten Blut abgenommen worden, welches in unseren Tests angewendet wurde: am Tag 1 (Tag, an welchem wir die erste Blutprobe bekommen haben), Tag 6, Tag 15 und am Tag 23. Am Tag 1 und

am Tag 6 wurde Serum, an den Tagen 15 und 23 wurde aus dem EDTA-Blut Plasma gewonnen, das Sediment wurde verworfen. Die Plasma- und Serumproben wurden bei -26°C gelagert.

4.1.2.1.5 Weitere Seren

Des Weiteren wurden zwei Seren von Patienten, die aufgrund einer akuten Malaria in der Bernhard-Nocht-Klinik in Hamburg behandelt wurden, verwendet.

4.1.2.1.6 Kontrollseren

Verschiedene Mitarbeiter des BNI, die noch nie an einer Malaria erkrankt sind, haben Serum bzw. Plasma gespendet. Die Proben wurden bei -26°C gelagert.

4.1.2.2 Testerythrozyten

ImuScreen 1 + 2 + 3

MTC med. Produkte GmbH, Bensheim

4.2 Material

4.2.1 Instrumente und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
CyFlow [®] SL blau Durchflußzytometer	Partec, Münster
Eppendorf-Pipette (weiß), 0,5 – 10 µL	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipette (gelb), 10 – 100 µL	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipette (gelb), 20 – 200 µL	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipette (blau), 200 – 1000 µL	Eppendorf, Hamburg
FACScan [®] Durchflußzytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
GenePix [®] Personal 4100A Mikroarrayscanner	Axon Instruments, Union City, USA
Thermoblock: „Thermomixer comfort“	Eppendorf, Hamburg

4.2.2 Software

Cell Quest [®] Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
FloMax [®]	Partec, Münster
GenePix [®] Pro 6	Molecular Devices, Sunnyvale, USA

JMP®

SAS Institute Incorporation, Cary,
USA

4.2.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung

Aldehydobjektträger
Einmalpipetten (1, 5, 10, 25 mL)
BD Falcon™ 5 ml Rundbodenröhrchen,
Polystyrol, für FACScan®
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5; 2 mL)
FlexWell-64 Schichten
Handschuhe Safe SKIN PFE, Latex und Nitril
Kryoröhrchen (1,8 mL)
Objektträger (76x26 mm)

Parafilm
Pasteurpipetten
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µL Volumen)
Rundbodenröhrchen für CyFlow® SL blau

Hersteller

Genetix, Hampshire, UK
Sarstedt, Nümbrecht
BD Biosciences Discovery
Labware, Bedford, USA
Eppendorf, Hamburg
Grace Bio-Labs, Bend, USA
Kimberley-Clark, Roswell, USA
Sarstedt, Nümbrecht
Engelbrecht Medizin- und Labor-
technik GmbH, Edermünde
Brand, Wertheim
Brand, Wertheim
Greiner Bio-one, Frickenhausen
Sarstedt, Nümbrecht

4.2.4 Verwendete Antikörper

4.2.4.1 Verwendete polyklonale Antikörper

Antikörper

Kaninchenimmunglobuline gegen humanes IgG
Kaninchenimmunglobuline gegen humanes IgM
Kaninchenimmunglobuline gegen humanes C3d
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte
Schweine-Immunglobuline (Ig) gegen Kaninchen-Ig
FITC-konjugiertes Ziegen-IgG gegen Maus-Ig

Hersteller

DakoCytomation, Hamburg
DakoCytomation
DakoCytomation
DakoCytomation
Dianova, Hamburg

4.2.4.2 Verwendete monoklonale Antikörper

Antikörper	Hersteller
FITC-konjugierter Maus-anti-humanes CD14 Antikörper (Ak) (IgG2a κ)	Becton Dickinson, Heidelberg
R-Phycoerythrin (R-PE)-konjugierter Maus-anti-humanes CD16 Ak (IgG1, κ)	Becton Dickinson
FITC-konjugierter Maus-anti-humanes Glykophorin A (CD235a) Ak (IgG1, κ)	DakoCytomation
Maus IgG ₁ gegen humanes Glykophorin C, Klon E5	Sigma, Deisenhofen

4.2.5 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad (*pro analysi*). Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bezogen. Spezielle Chemikalien sind im Folgenden aufgelistet.

Bezeichnung	Hersteller
N,N-Diisopropylethylamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung (D-PBS) (Pulver)	Gibco, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe
6-Maleimidohexansäure-N-hydrosuccinimidester	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 10-fach	Sigma-Aldrich, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween-20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

4.2.6 Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
CyLyse® (Reagenz A und B)	Partec, Münster

4.2.7 Lösungen

PBS

50 mL	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 10-fach
450 mL	demineralisiertes Wasser

D-PBS

Inhalt eines Beutels in 800 mL demineralisiertem Wasser lösen, auf 1000 mL mit demineralisiertem Wasser auffüllen.

Hüllflüssigkeit für CyFlow® SL blau

5 mL	Stammlösung von Triton X-100
5 mL	Stammlösung von Natriumazid
490 mL	demineralisiertes Wasser

1% Stammlösung von Triton X-100

467 µL	Triton X-100
50 mL	demineralisiertes Wasser

1% Stammlösung von Natriumazid

500 mg	Natriumazid
50 mL	demineralisiertes Wasser

4.2.8 *P. falciparum* (*P.f.*)-Glykosylphosphatidylinositol

4.2.8.1 *P.f.*-Glykosylphosphatidylinositol (GPI) für Erythrozytentest

Das verwendete *P.f.*-GPI (Abbildung 10) wurde vom Arbeitskreis von Peter H. Seeberger im Labor für Organische Chemie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich, Schweiz, chemisch synthetisiert und uns zur Verfügung gestellt. Das lipidierte *P.f.*-GPI wurde in DMSO gelöst, es entstand eine 1 mM Lösung.

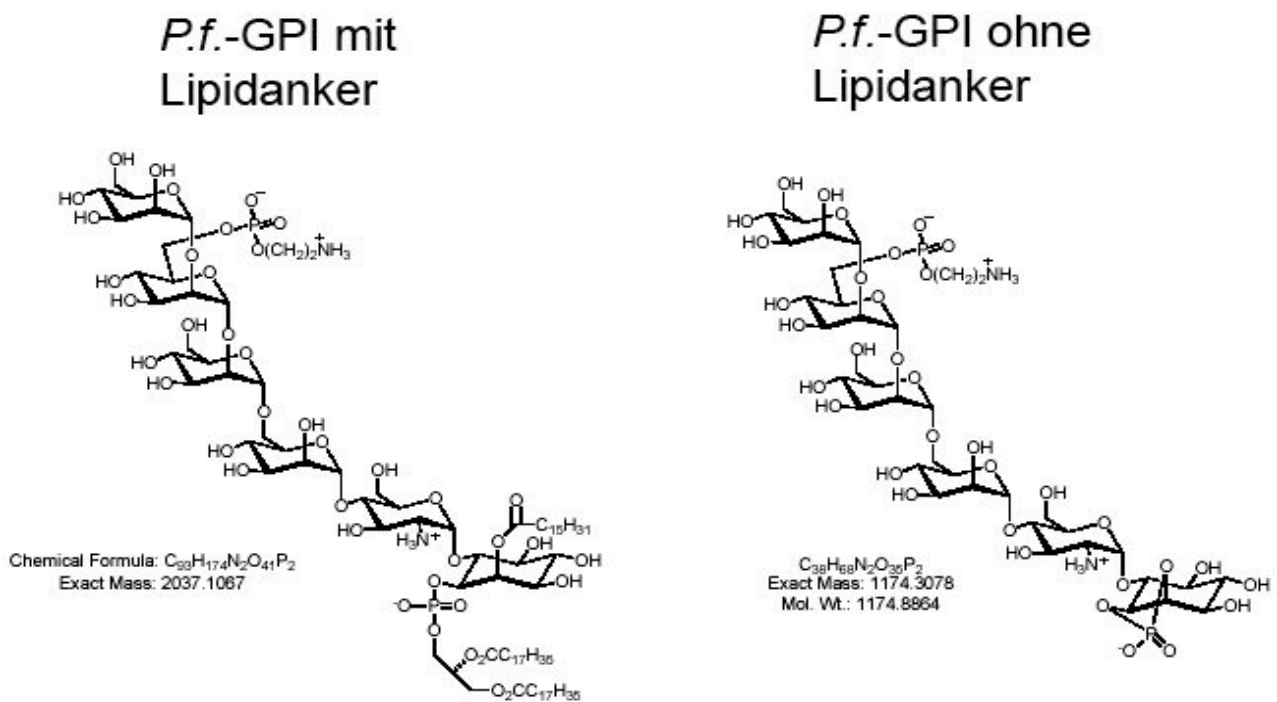


Abbildung 10: Struktur des *P.f.*-GPI. *P.f.*-GPI mit und ohne Lipidanker.

4.2.8.2 P.f.-Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Derivate im Mikroarray

Die in Abbildung 11 vorgestellten Kohlenhydrate wurden ebenfalls vom Arbeitskreis von Peter H. Seeberger im Labor für Organische Chemie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich, Schweiz, chemisch synthetisiert und dort für den Mikroarraytest verwendet.

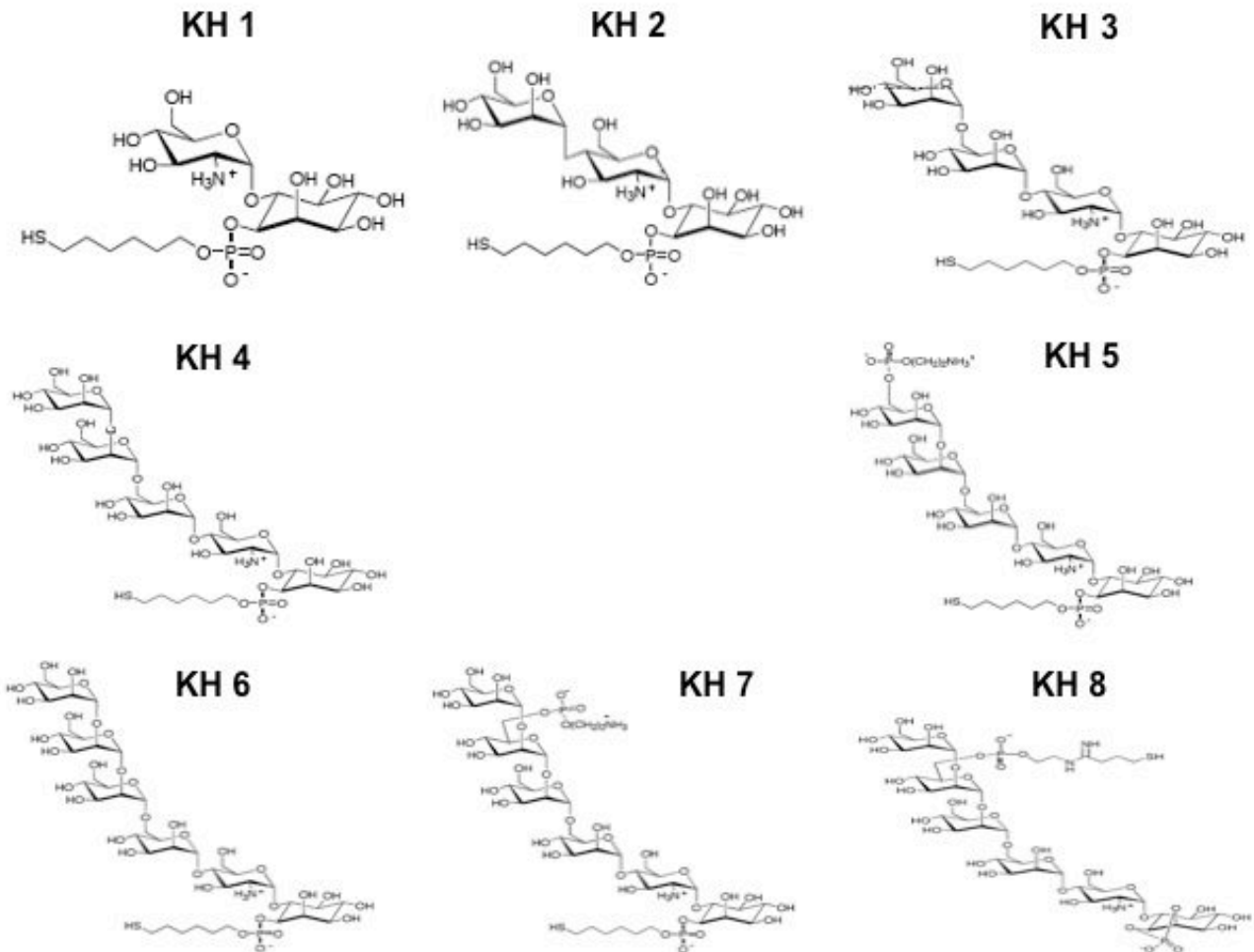


Abbildung 11: P.f.-GPI und seine unvollständigen Vorstufen. Die einzelnen Kohlenhydrate (KH) binden über die Thiolgruppe kovalent an den vorbehandelten Aldehydobjektträgern. (KH1): Kernstruktur des GPI mit einem Glukosamin (GlcN), Inositol, Phosphat und einer Lipidkette mit einer Thiolgruppe; (KH2): wie KH1, aber mit einem Mannoserest (Man) über eine 1,4'-Bindung am GlcN; (KH3): wie KH2 mit einem zusätzlichen Man am vorhandenen Mannoserest; (KH4): wie KH3, aber mit einem dritten Man in 1,4-Stellung; (KH5): wie KH4, aber mit einem Phosphodimethylaminrest in 6-Stellung am dritten Man; (KH6): wie KH4, aber mit einem zusätzlichen Man über eine 1,2-Bindung; (KH7): wie KH5 mit einem zusätzlichen Man über ein 1,2-Bindung am vierten Man; (KH8): ähnlich KH7, allerdings ohne Lipidrest am Inositol, dafür ist ein Lipidschwanz mit einer Thiolgruppe am Phosphat über eine Hydrazingruppe gebunden, dadurch veränderte Bindung am Objektträger.

4.3 Methoden

4.3.1 Durchflusszytometrie

Für die Durchflussanalyse sind das am Bernhard-Nocht-Institut (BNI) in Hamburg stehende FACScan[®] und das im KCCR in Kumasi, Ghana, befindliche CyFlow[®] SL blau verwendet worden.

4.3.1.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie (FACS, engl.: *fluorescence-activated cell sorting*) ist eine optische Methode, um einzelne Partikel und Zellen in einer Suspension aufgrund von Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften zu charakterisieren und zu sortieren. Dazu können die Partikel oder Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen auf der Oberfläche oder im Zellinneren markiert sein.

Im Gerät werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Kapillare geführt und vereinzelt. Danach treffen sie auf einen Laserstrahl. Dabei streuen sie einerseits das einfallende Licht in unterschiedliche Richtungen, andererseits emittieren sie - je nach Färbung - Licht höherer Wellenlängen (Fluoreszenz). Das gestreute und emittierte Licht passiert die optische Bank des Gerätes und wird dort gefiltert. Jeder Parameter wird von einem Photomultiplier detektiert und in ein digitales Signal umgewandelt.

4.3.1.1.1 Strömungsmechanisches System

Das Flüssigkeitssystem besteht aus zwei Komponenten, der Hüllflüssigkeit und der Probensuspension, welche beide durch einen vom Kompressor erzeugten Luftdruck in das Herzstück des Geräts, die Durchflusszelle, geleitet werden.

Die Hüllflüssigkeit wird mit einer konstanten Geschwindigkeit zur Durchflussküvette geleitet. Die Probensuspension wird dem Hüllstrom über eine Kapillare zentral zugeführt, und vor dem Eintritt in die Küvette verengt sich der Strom aus Hüllflüssigkeit und Probensuspension konisch ebenfalls auf eine Kapillare. Durch die so erfolgte Beschleunigung der Zellen werden vorhandene Aggregate aufgelöst. Die Flüssigkeiten fließen in laminarer Strömung mit maximal einer Zelle im Zentrum durch die Durchflussküvette (hydrodynamische Fokussierung; Abbildung 12). Im weiteren Fluss durch die Küvette treffen die Zellen auf den Laserstrahl.

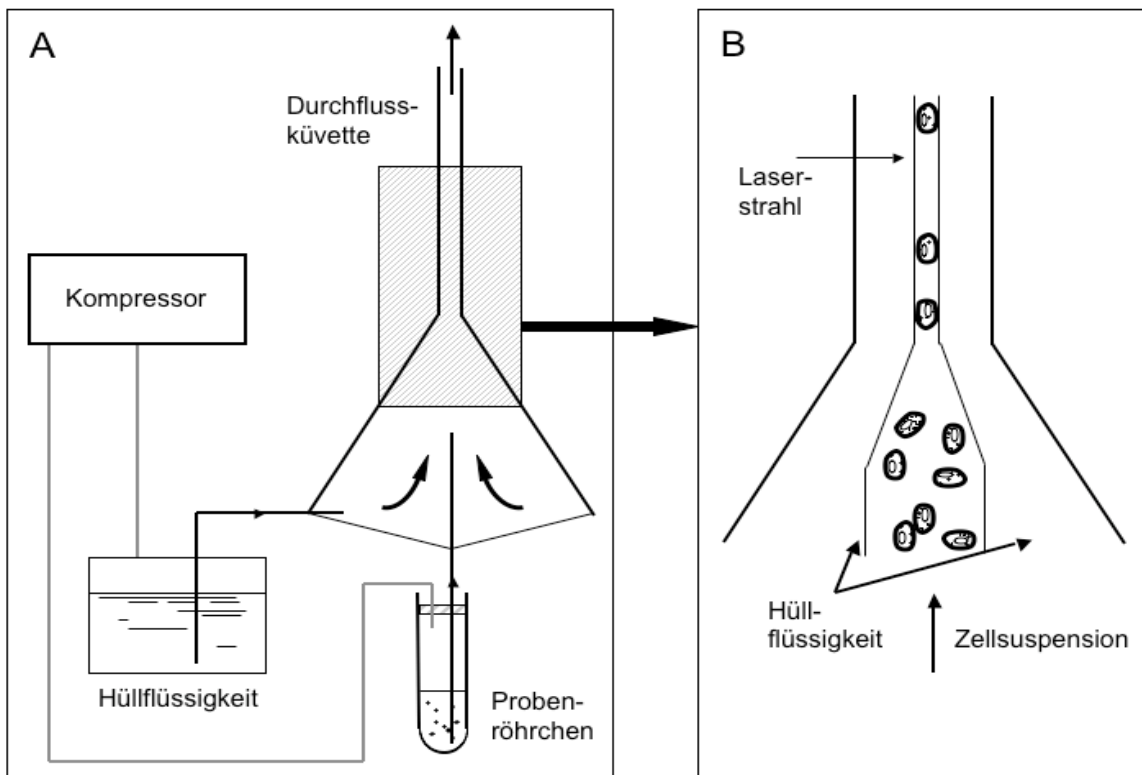


Abbildung 12: Aufbau eines Durchflusszytometers (A) und hydrodynamische Fokussierung (B). Stark vereinfachte, schematische Darstellung des Flüssigkeitssystems eines Durchflusszytometers (nicht maßstabgetreu). A) Der Kompressor erzeugt einen Luftdruck, welcher die Hüllflüssigkeit und die Probenflüssigkeit durch das Gerät fließen lässt. B) Vor dem Eintritt in die Durchflusszelle zieht der Hüllstrom die Zellen mit sich und fokussiert sie im Zentrum des Stroms.

4.3.1.1.2 Optik

In beiden verwendeten Geräten (FACScan[®], CyFlow[®] SL blau) beträgt die Anregungswellenlänge des Laserlichtes 488 nm, welches in FACScan[®] durch einen Argon-Ionen-Laser und im CyFlow[®] SL blau durch einen Festphasenlaser generiert wird. Das Licht wird durch die Zellen in alle Richtungen gestreut.

4.3.1.1.2.1 Streulichtparameter

Das Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter*) ist das Streulicht, welches in Richtung des einfallenden Laserstrahls durch die Zellen gestreut wird, und ist ein Maß für die Größe der gemessenen Partikel (Abbildung 13). Als Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) bezeichnet man das Licht, welches in einem rechten Winkel gestreut wird und proportional zur zellulären Granularität ist (Abbildung 13).

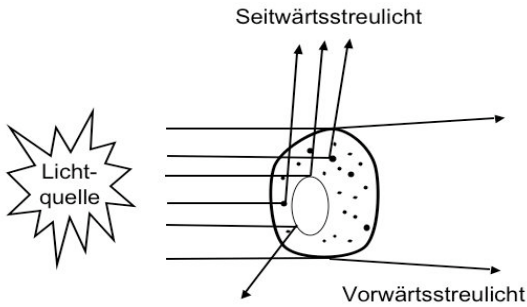


Abbildung 13: Seit- und Vorwärtsstreulicht. Als Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) bezeichnet man das Licht, welches von der Zelle in Richtung des einfallendes Lichtes in kleinem Winkel gestreut wird. Das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) ist jenes Licht, welches von Zellpartikeln im rechten Winkel gestreut wird.

4.3.1.1.2 Detektion von Fluoreszenzen

Fluorochrome können bei bestimmten Wellenlängen angeregt werden. Dabei absorbieren sie Lichtenergie in einem für den Farbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich (Absorptionsspektrum). Die zugeführte Energie sorgt dafür, dass Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Fallen diese Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, wird Licht mit einer geringeren Energie und einer höheren Wellenlänge als das Anregungslicht abgestrahlt. Das abgegebene Licht bildet das für das Fluorochrom charakteristische Emissionsspektrum.

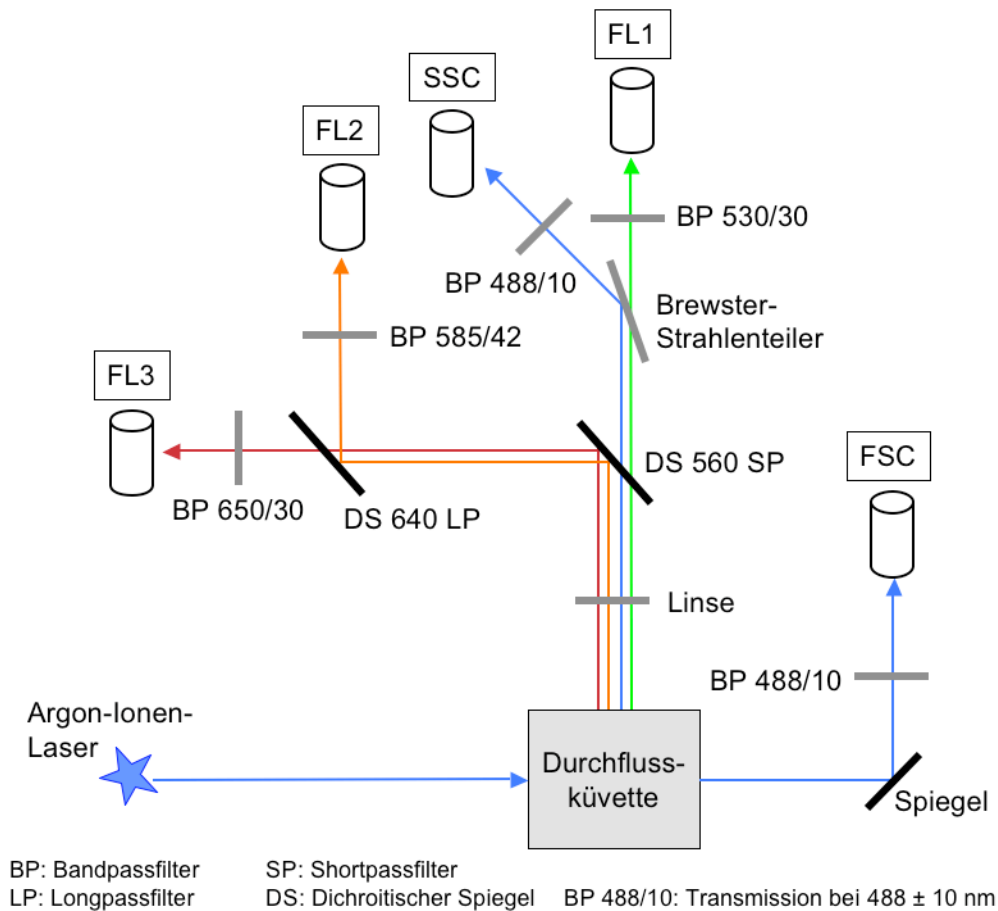


Abbildung 14 (vorherige Seite): Vereinfachtes Schema des Strahlengangs im FACScan®. Der Argon-Ionen-Laser erzeugt einen Lichtstrahl bei 488 nm und trifft auf die Zellen, welche durch die Durchflussküvette laufen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) wird in Richtung des einfallenden Lichtes gestreut, umgelenkt, passiert einen Filter und wird detektiert. Das übrige Licht trifft auf einen dichroitischen Spiegel (DS), welcher Licht über 560 nm reflektiert und alles Übrige durchlässt (engl. *Shortpassfilter*, SP). So treffen das Seitwärtsstreulicht (SSC) und Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von rund 530 nm (FL1) auf einen Brewsterstrahlenteiler. Die beiden nach der Teilung entstandenen Strahlen passieren einen Bandpassfilter (BP) mit 488 ± 10 nm bzw. 530 ± 30 nm und treffen anschließend auf den Detektor. Licht mit einer Wellenlänge von über 560 nm wurde am ersten DS gespiegelt und trifft auf einen weiteren DS, welcher Licht mit Wellenlängen über 640 nm passieren lässt und unter 640 nm spiegelt (engl. *Longpassfilter*, LP). Das gespiegelte Licht trifft auf einen BP von 585 ± 42 nm und wird dann vom Detektor FL2 detektiert. Das transmittierte Fluoreszenzlicht (FL3) passiert einen Bandpassfilter von 650 ± 30 nm und wird detektiert.

Aufgrund unterschiedlicher Absorptions- und Emissionsspektren können simultan verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, wobei hier die spektrale Überlappung der Emissionsschemata zu beachten ist.

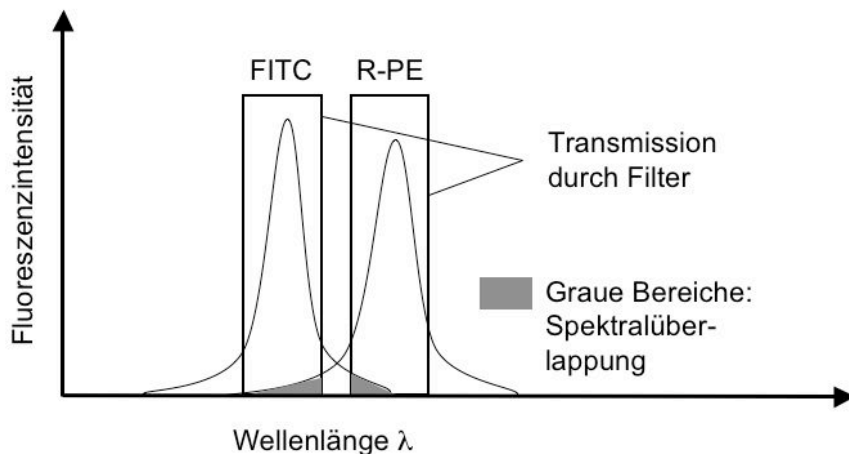


Abbildung 15: Spektrale Überlappung am Beispiel von FITC und R-PE. Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder R-Phycoerythrin (R-PE) lassen sich bei 488 nm anregen, aber emittieren bei unterschiedlichen Wellenlängen. So zeigt FITC einen Peak bei 520 nm, während R-PE diesen bei 575 nm hat, jedoch überlappen sich die Emissionsspektren zum Teil.

Es kommt zur spektralen Überlappung, wenn ein Fluorochrom zum Teil bei einer Wellenlänge Licht abgibt, bei welcher auch ein anderes Fluorochrom Licht emittiert (Abbildung 15). Durch Auswahl geeigneter Fluorochromkombinationen und Filter können die Signale aufgrund der Spektralüberlappung minimiert, jedoch selten ganz vermieden werden.

Als Kompensation bezeichnet man den rechnerischen Vorgang, bei dem der verbleibende erhöhte Anteil eines Signals durch die spektrale Überlappung eines anderen Fluorochroms vom Gesamtsignal dieser Wellenlänge subtrahiert wird. Diese muss für jede Farbstoffkombination neu eingestellt werden.

Das emittierte Licht, welches im 90°-Winkel zum Anregungslichtstrahl in das Gerät fällt, passiert eine Reihe von Filtern und Spiegeln, bis es auf den Detektor trifft. Die verwendeten Filter lassen Licht nur mit bestimmten Wellenlängen durch. Jeder Detektor misst nur Lichtsignale aus einem bestimmten Wellenlängenbereich. Bandpassfilter lassen Licht in einem engen Wellenlängenbereich passieren, während *Longpassfilter* Licht bis zu einer bestimmten Wellenlänge spiegeln und erst ab dieser Wellenlänge durchlassen. Im Gegensatz dazu lassen *Shortpassfilter* Licht nur unterhalb einer bestimmten Wellenlänge durch und reflektieren Licht mit größeren Wellenlängen. Die detektierte Fluoreszenzintensität ist hierbei direkt proportional zur Anzahl der zu untersuchenden Moleküle auf oder in der Zelle. Alle gemessenen optischen Signale werden in elektrische Signale umgewandelt und können je nach Bedarf selektiv verstärkt werden. Es ist jedoch erforderlich, dass die Einstellungen bei den Experimenten identisch sind.

4.3.1.1.2.3 Depolarisation des Lichtes

Laserlicht ist im CyFlow® SL blau horizontal polarisiert. Substanzen wie Hämoglobin sind in der Lage, Licht zu depolarisieren. Das um 90° zur Schwingungsebene des polarisierten Lichtes gedrehte (depolarisierte) Licht wird durch einen Filter gelenkt und das Signal wird mit einem Photomultiplier detektiert. Das depolarisierte vertikale Seitwärtsstreulicht wird im Folgenden mit SSC-v, das horizontale Seitwärtsstreulicht mit SSC-h abgekürzt (Abbildung 16). Das SSC-h aus dem CyFlow® SL blau entspricht dem SSC aus dem FACScan®. Das Vorwärtsstreulicht und die Seitwärtsstreulichter haben in den benutzten Geräten eine Wellenlänge von 488 nm.

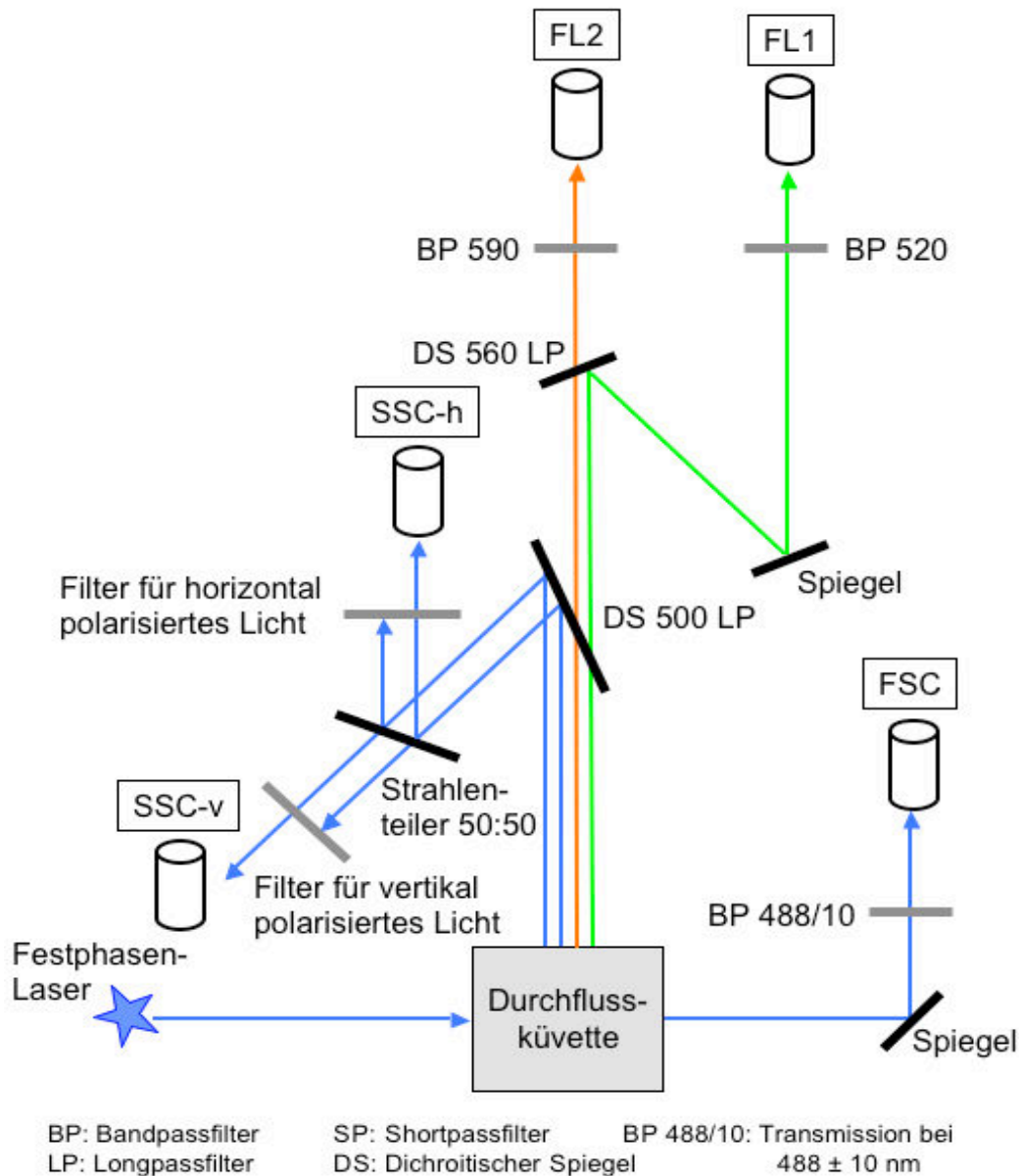


Abbildung 16: Vereinfachtes Schema des Strahlengangs in CyFlow® SL blau. Das Gerät ist standardmäßig für zwei Streulichtparameter und drei Fluoreszenzen entwickelt worden. Die gezeigten Spiegel und Filter sind so nicht standardmäßig eingebaut, sondern in Absprache mit der Firma Partec für unsere Zwecke zum Teil speziell angefertigt, um depolarisiertes Licht detektieren zu können. So wurde das Gerät vor Ort von mir umgebaut, um die gezeigten Strahlengänge zu erzielen. Der Laser erzeugt einen horizontal polarisierten Lichtstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm und trifft auf die Zellen, welche durch die Durchflusskuvette laufen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) wird in Richtung des einfallenden Lichtes gestreut, umgelenkt, passiert einen Filter und wird detektiert. Alle anderen, im rechten Winkel gestreuten Parameter treffen auf einen dichroitischen Spiegel (DS). Dieser lässt Licht mit Wellenlängen über 500 nm passieren, alles andere wird reflektiert. Das gespiegelte Licht (Seitwärtsstreulicht, SSC) trifft auf einen Strahlenteiler und wird in zwei Strahlen aufgeteilt. Der eine Strahl trifft auf einen Bandpassfilter (BP) mit $488 \pm 10\text{ nm}$, der nur horizontal polarisiertes Licht durchlässt. Dieses Signal wird detektiert (SSC-h) und entspricht dem üblichen Seitwärtsstreulicht. Der andere Strahl trifft auf einen BP mit $488 \pm 10\text{ nm}$, der nur vertikal polarisiertes („depolarisiertes“) Licht durchlässt, und trifft auf den Detektor (SSC-v). Das durch den DS transmittierte Licht trifft auf einen weiteren DS, welcher Licht mit einer größeren Wellenlänge als 560 nm passieren lässt, Licht mit Wellenlängen unter 560 nm wird gespiegelt. Das transmittierte Licht trifft auf einen BP mit $590 \pm 10\text{ nm}$, und wird als Fluoreszenz 2 (FL2) detektiert. Das gespiegelte Licht wird durch einen weiteren Spiegel umgelenkt und passiert einen BP für eine Wellenlänge von $520 \pm 10\text{ nm}$ und wird als FL1 detektiert.

Das FACScan® kann die Streulichtparameter FSC und SSC detektieren und ist mit Bandpassfiltern für folgende Wellenlängen ausgestattet: 530 nm (Fluoreszenz 1 (FL1)), 585 nm (FL2) und 650 nm (FL3) (siehe Abbildung 14). Das CyFlow® SL blau detektiert FSC, SSC-h und SSC-v und verfügt Bandpassfilter für 520 (FL1) und 590 nm (FL2) (siehe Abbildung 16). Die verwendeten Farbstoffe (Tabelle 3) können mit beiden Geräten detektiert werden.

Tabelle 3: Tabelle der verwendeten Fluorochrome.

Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge (Peak)
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	488 nm	ca. 520 nm
R-Phycoerythrin (R-PE)	488 nm	ca. 575 nm
Ethidiumbromid (EtBr)	488 nm	ca. 582 nm

4.3.1.1.3 Darstellung und Auswertung

Die am häufigsten verwendeten Darstellungsweisen sind das Histogramm (für einen Parameter) und das Streudiagramm (zwei Parameter) (Abbildung 17). Alle Parameter werden in relativen Einheiten angegeben. Für die Fluoreszenzen wird häufig ergänzend entweder die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zur Betrachtung der Verschiebung einer ganzen Zellpopulation als Maßstab zugrunde gelegt. Alternativ kann der Anteil der verschobenen Zellen im Vergleich zur Kontrollprobe werden.

Zur Auswertung kann man über die einzelnen Parameter im Histogramm oder im Streudiagramm Regionen definieren, die nur Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität oder einem bestimmten Maß an gestreutem Licht umfassen, und diese Regionen auf andere Histogramme oder Streudiagramme anwenden.

Die Auswertung der FACScan®-Daten erfolgte mit der Cell Quest® Pro-Software; die Daten des CyFlow® SL blau wurden mit der FloMax®-Software ausgewertet.

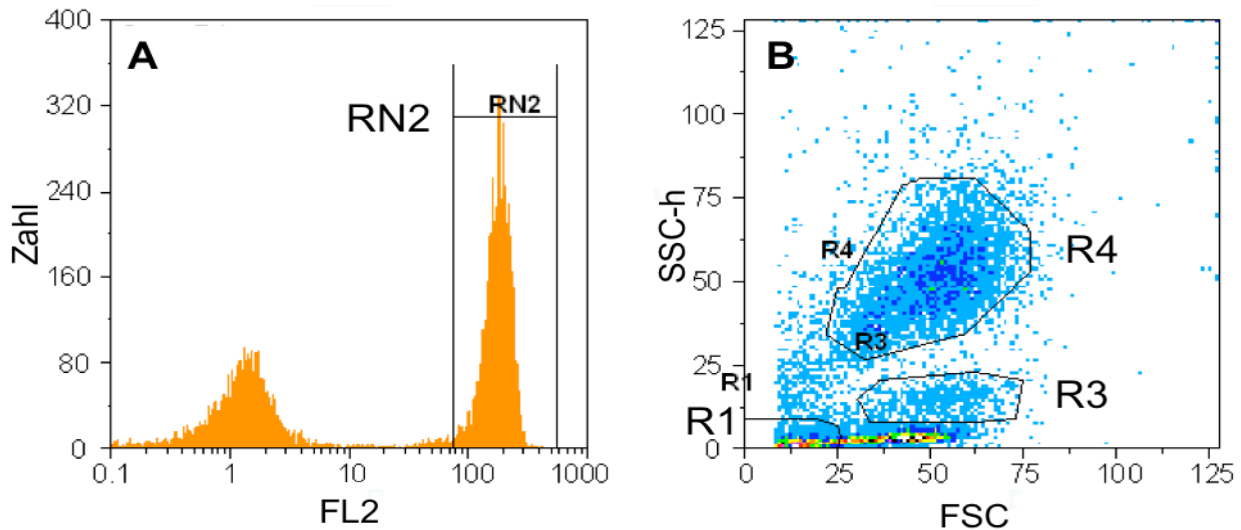


Abbildung 17: Beispiele für ein typisches Histogramm (A) und Streudiagramm (B). A: Das Histogramm stellt die Häufigkeit der gemessenen Signale in den einzelnen Kanälen dar. Zu sehen ist hier ein Beispiel von humanen Leukozyten, die mit einem R-PE-markierten Antikörper gegen CD16 gefärbt wurden. Auf der Abszisse ist die Intensität des Fluoreszenz 2- (FL2) Signals abgebildet; auf der Ordinate ist die Anzahl der Zellen in dem jeweiligen Kanal zu sehen. Ein Kanal erfasst alle Zellen mit einer bestimmten, eng gefassten Fluoreszenzintensität. Die angefärbten Zellen werden mit der Region RN2 erfasst. B: Im Streudiagramm werden jeweils zwei Parameter einer Zelle abgebildet, wo sie ein typisches Muster bilden. Dargestellt ist in diesem Beispiel die Leukozytenverteilung in humanem Vollblut aufgrund ihrer Streulichteigenschaften (Vorwärtsstreulicht (FSC) vs. vertikales Seitwärtsstreulicht (SSC-h)). Es sind verschiedene Leukozytenpopulationen voneinander unterscheidbar. Ganz links unten sind Artefakte und Zelltrümmer erkennbar (R1), die Population rechts daneben bilden die Lymphozyten (unterhalb der Region 3). Darüber und etwas nach rechts verschoben ist in der Region R3 die Monozytenpopulation erkennbar, und oben in der Region R4 liegen die neutrophilen Granulozyten.

4.3.1.2 Nachweis von Hämozoin tragenden peripheren Leukozyten

Das zu untersuchende Blut stammt von den Kindern mit Malaria aus der Anämie-studie. 50 μ L Vollblut wurden in ein Röhrchen gegeben, mit 10 μ L Anti-CD14-FITC Ak und 10 μ L Anti-CD16-R-PE Ak gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 50 μ L des Reagenzes A des CyLyse[®]-Kits zur Fixierung der Leukozyten hinzugegeben, gemischt und 10 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden 1,25 mL des Reagenzes B des CyLyse[®]-Kits zur Lyse der RBC hinzugegeben, gut gemischt und mindestens 20 Minuten inkubiert. Die Probe wurde im Anschluss, spätestens jedoch nach 24 Stunden, auf dem CyFlow[®] SL blau eingelesen.

Getestet wurde auf Pigment tragende Monozyten (PCM) und neutrophile Granulozyten (PCN). Im Streudiagramm Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC-h) befinden sich mit einer geringen Granularität unten rechts die Lymphozyten. Links davon sind Zelltrümmer und Artefakte erkennbar, welche durch die Region R1 definiert werden (Abbildung 18). Oberhalb der Lymphozyten sind mit einer

etwas höheren Granularität die Monozyten erkennbar, welche die Region R3 definieren. Die neutrophilen Granulozyten haben eine deutlich höhere Granularität und liegen über den Monozyten. Mit der Region R4 werden die Neutrophilen definiert. Außerhalb des Neutrophilenblots liegen die Eosinophilen mit einer noch höheren Granularität, die durch die große Zahl von Granula und Kristallprotein bedingt ist.

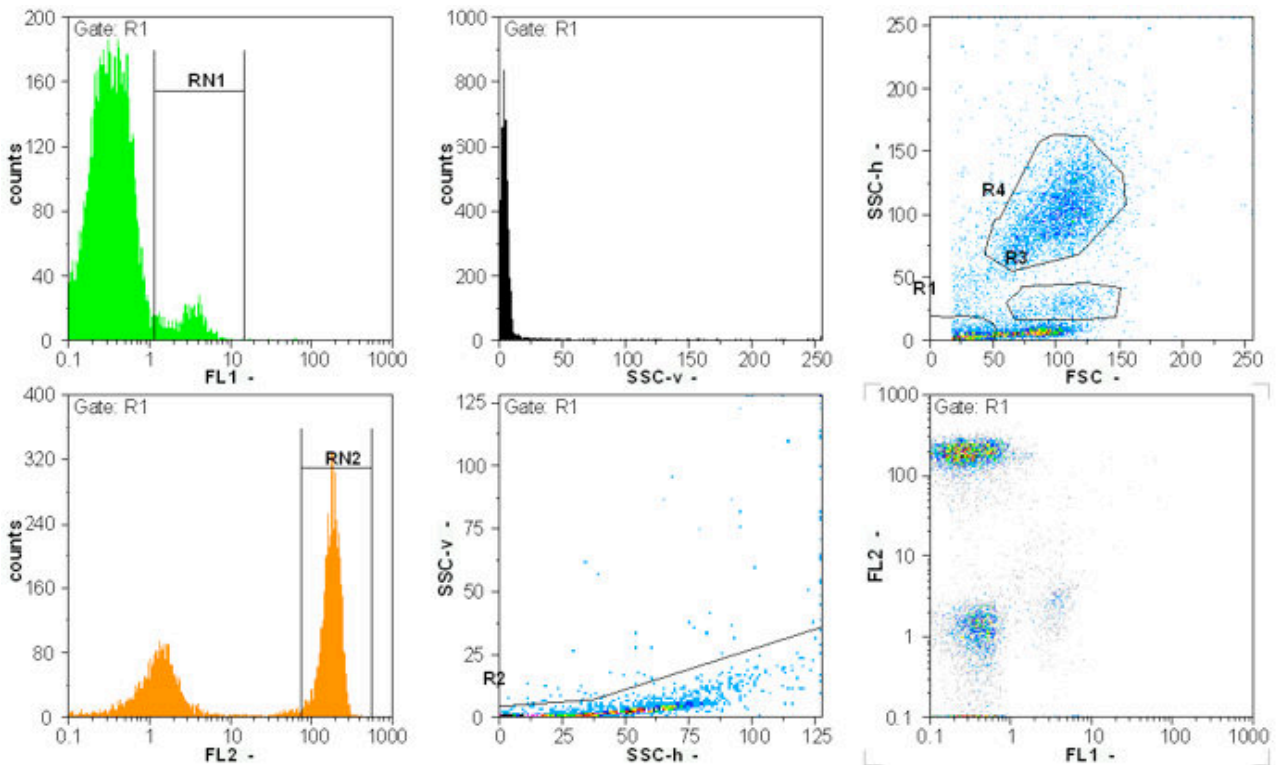


Abbildung 18: Beispiel einer Patientenprobe zum Nachweis von Hämozoin tragenden Leukozyten. Im Streudiagramm FSC gegen SSC-h (Fenster oben rechts) sind die verschiedenen Leukozytenpopulationen zu erkennen: unten rechts die Lymphozyten, darüber in der Region R3 die Monozyten. Die obere Population besteht aus neutrophilen Granulozyten. Ganz unten links liegen in diesem Fenster Zelltrümmer und Artefakte, welche durch die Region R1 ausgeschlossen werden. Durch die Region R1 sind auch in allen anderen Fenstern Zelltrümmer und Artefakte ausgeschlossen, so dass dort nur die Leukozyten ausgewertet werden. Im Fenster oben links ist die Fluoreszenz 1 (FITC) dargestellt. In der Region RN1 sind Monozyten zu erkennen, die mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen CD14 markiert wurden. Das Fenster oben in der Mitte zeigt die Signale für depolarisiertes Licht. Im Histogramm unten links sind in der Region RN2 sind neutrophile Granulozyten zu erkennen, die mit einem R-PE-gekoppelten Antikörper gegen CD16 markiert wurden. Das Fenster unten in der Mitte zeigt das Streudiagramm SSC-h gegen SSC-v. Die große Population unten umfasst alle Leukozyten den Eosinophilen, die weiter rechts oben liegen. Die Region R2 liegt über diesen Populationen und zeigt die depolarisierenden Signale. Im Fenster unten rechts ist das Streudiagramm mit den Achsen FL1 und FL2 gezeigt. Oben sind die Neutrophilen aufgrund Ihrer R-PE-Markierung von CD16 erkennbar, unten rechts die Monozyten aufgrund der Färbung mittels Anti-CD14-FITC Ak.

Die Region R1 wurde auf die übrigen Fenster angewendet, so dass die Zelltrümmer und Artefakte von der weiteren Auswertung ausgeschlossen sind. Im Streudiagramm SSC-h gegen SSC-v sind die Leukozyten weit unten erkennbar, ein

wenig nach rechts und oben verschoben liegen die eosinophilen Granulozyten. Oberhalb der Leukozyten ist die Region R2 definiert, welche alle depolarisierenden Zellen erfasst. Durch Anwendung der Region R3 bzw. der Region R4 ist im Streudiagramm SSC-h gegen SSC-v unterscheidbar, ob diese Signale von PCM oder PCN stammen.

Die PCM wurden folgendermaßen charakterisiert: die Region R3 (Monozytenpopulation), welche die Monozyten im Fenster FSC gegen SSC umfasst, wurde auf das Streudiagramm SSC-h gegen SSC-v gelegt. Alle Ereignisse, die dann in der Region R2 liegen, wurden als positiv für Hämozoin betrachtet (PCM).

PCN wurden ganz ähnlich erfasst: Für diese Analyse wurde die Region R4 (Neutrophilenpopulation) aus dem Streudiagramm FSC gegen SSC-h auf das Streudiagramm SSC-h vs. SSC-v angewendet. Ereignisse, die nun in der Region R2 liegen, werden als positiv für eine Depolarisation und damit für das Vorkommen von Hämozoin erachtet (PCN).

Pro Test wurden jeweils 10.000 Zellen gemessen und dabei analysiert, wie viele Monozyten und Neutrophile sowie wie viele PCM und PCN vorkommen. Es gibt zwei unterschiedliche Arten der Auswertung: Entweder man betrachtet die absoluten Zahlen der PCM und PCN, oder den Anteil der PCM und PCN an der Gesamtzahl der Monozyten bzw. Neutrophilen.

Die statistische Analyse wurde mit der JMP[®]-Software durchgeführt.

Zunächst wurde nach Unterschieden (Kruskal-Wallis- bzw. Wilcoxon Rangsummentest) zwischen Kindern mit und ohne schwere Anämie im Vergleich zu europäischen Kontrollen gesucht. Dazu wurden die Gruppen I und II zur Hauptgruppe der Patienten mit schwerer Anämie (A+) zusammengefasst. Ebenso wurden die Gruppen III und IV zur Hauptgruppe der Patienten ohne eine schwere Anämie (A-) zusammengefasst. Es gibt 15 Proben von Patienten mit schwerer Anämie, die nicht eindeutig den Gruppen I oder II zugeordnet werden können. Diese wurden hier in die Gruppe der Kinder mit schwerer Anämie einbezogen.

Bei signifikanten Unterschieden wurde die Gruppe der Patienten ohne schwere Anämie bei der weiteren Analyse in die klinischen Gruppen III und IV unterteilt, während die Gruppe der anämischen Patienten unverändert blieb.

Waren signifikante Unterschiede zu finden, so wurde bei der weiteren Analyse die Hauptgruppe A+ in die klinischen Gruppen I und II unterteilt. Die 15 Patienten, die

nicht eindeutig den Gruppen I oder II zugeordnet werden konnten, sind hier nicht miteinbezogen worden.

4.3.1.3 Nachweis von IgG, IgM und C3d auf der RBC-Membran

Nach Entnahme des Blutes für den Hämozointest wurden die Probenröhrchen zentrifugiert. Das Plasma wurde in ein Kryoröhrchen gefüllt und bei -80°C eingefroren. 10 μL des Zellpellets wurden zu 990 μL Dulbeccos Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. *Dulbecco's phosphate buffered saline*, D-PBS) gegeben und gut gemischt. Daraus entstand eine 1%-ige (v/v) RBC-Suspension. Je zwei Röhrchen wurden mit 50 μL der 1%-igen RBC-Suspension, 50 μL D-PBS und 100 μL einer 1:125-Verdünnung (Endverdünnung 1:250) des primären Antikörpers Kaninchen-anti-Human IgG, Kaninchen-anti-Human IgM oder Kaninchen-anti-Human C3d (Dianova, Hamburg) in D-PBS vermischt und 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zweimal gewaschen (1 mL D-PBS, 670 x g, 5 min), der Überstand verworfen und das Röhrchen auf den Kopf gestellt, damit alle Flüssigkeit auslaufen konnte. Das gebildete Pellet wurde durch kräftiges Ziehen über den Probenständer resuspendiert.

Für die nächste Inkubation (30 min, RT in Dunkelheit) wurden 100 μL einer 1:10-Verdünnung des FITC-gekoppelten Schwein-anti-Kaninchen Ak (Endverdünnung 1:20) zugegeben und mit den Zellen gemischt. Bei den ersten 73 Proben enthielten die 100 μL der 1:10-Verdünnung des FITC-gekoppelten Schwein-anti-Kaninchen Ak 25 μL EtBr (entspricht 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zur Färbung der Plasmodien. Ab der 74. Probe wurden zur besseren Trennung und Kompensation der Fluoreszenzen zu jedem Röhrchen 100 μL einer 1:10 Verdünnung des FITC-Ak-Verdünnung zugegeben, aber nur zu jeder zweiten Probe der Farbstoff EtBr. Nach zwei Waschschritten (1 mL D-PBS, 670 x g, 5 min) wurde das Zellpellet resuspendiert und mit 500 μL D-PBS gemischt. Die auf diese Weise vorbereiteten Zellen wurden innerhalb der nächsten sechs Stunden mit dem CyFlow[®] SL blau eingelesen.

Pro Patientenprobe wurden ca. 40.000 Zellen gemessen und 10.000 Zellen wurden ausgewertet. Für die Auswertung wurden im Streudiagramm FL2 vs. SSC-h zwei Regionen definiert (Abbildung 19). Die Region R1 entspricht den nicht parasitierten (nicht mit Ethidiumbromid gefärbten) roten Blutkörperchen; die Region R2 beinhaltet die parasitierten (mit EtBr angefärbten und damit für die FL2 positiven) Erythrozyten. Für die Auswertung aller RBC wurde keine Region definiert. Für die Auswertung nicht parasitierter Erythrozyten wurde die Region R1 auf die übrigen

Histogramme und Streudiagramme gelegt, so dass hier nur die nicht infizierten RBC abgebildet und analysiert wurden. Dementsprechend wurde für die Auswertung infizierter RBC mit der Region R2 verfahren.

Im Histogrammfenster der FL1 wurde eine Region RN1 definiert, welche die gesamte Population umfasst und an welcher die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) erfasst worden ist. Bei der Auswertung wurde einerseits die MFI analysiert, welche auf eine Verschiebung der gesamten Population hindeutet. Andererseits wurde die Anzahl der Zellen ermittelt, die in der Fluoreszenz 1 über einem bestimmten Schwellenwert liegt und als positiv für ein Antigen (IgG, IgM oder C3d) betrachtet wird. Der Schwellenwert wurde anhand einer mit EtBr gefärbten Kontrollprobe festgelegt, bei welcher der sekundäre Antikörper gefehlt hat.

Durch Legen eines Kreuzes werden im Streudiagramm FL1 vs. FL2 die vier Quadranten Q1 (links oben) bis Q4 (rechts unten) definiert. Bei der ungefärbten Kontrollprobe liegen nahezu alle Zellen im linken unteren Quadranten (Q3). Im Quadranten Q1 liegen die infizierten RBC (positiv für FL2 durch Färbung mit EtBr). Im Quadranten Q2 liegen dagegen die infizierten RBC, welche ebenfalls positiv für FL1 (FITC-Ak) sind. Der Quadrant Q4 umfasst nicht infizierte Zellen, welche positiv für eine Färbung durch FITC sind.

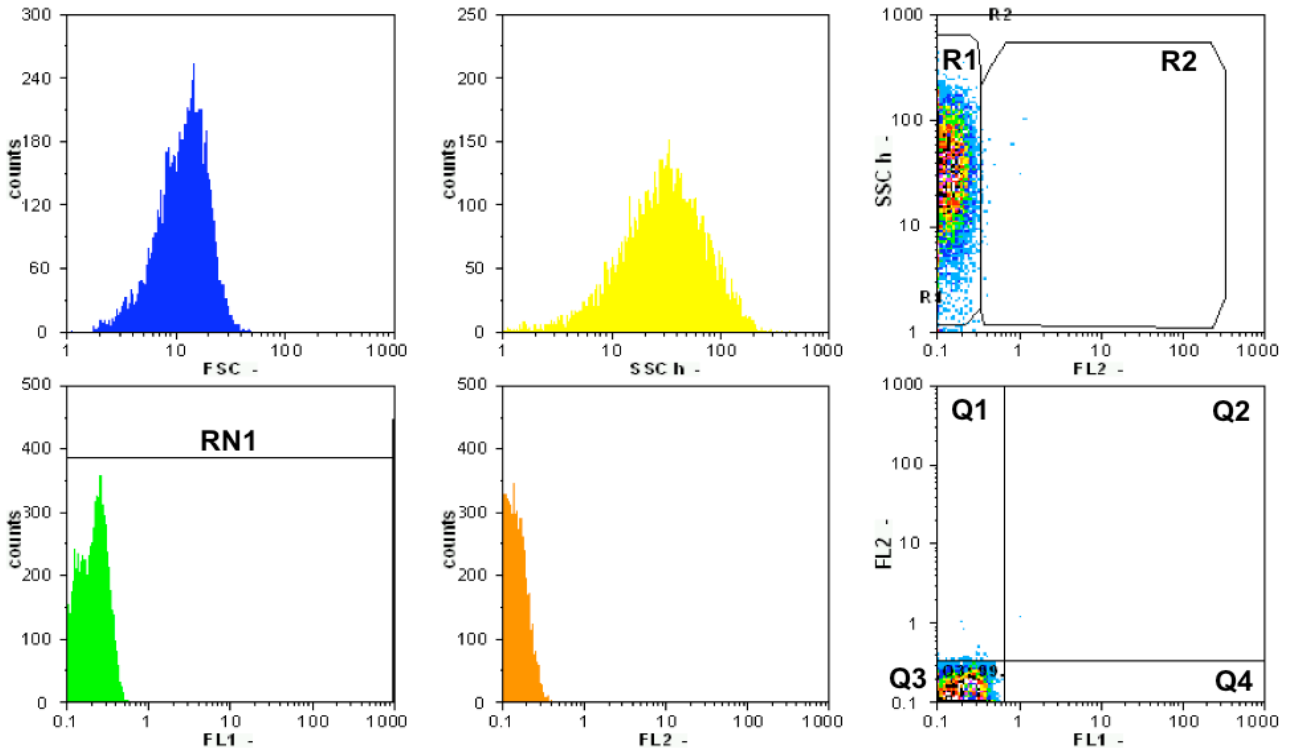


Abbildung 19: Darstellung einer ungefärbten Kontrollprobe der Versuche zu Oberflächenveränderungen auf RBC mit der FloMax[®]-Software.

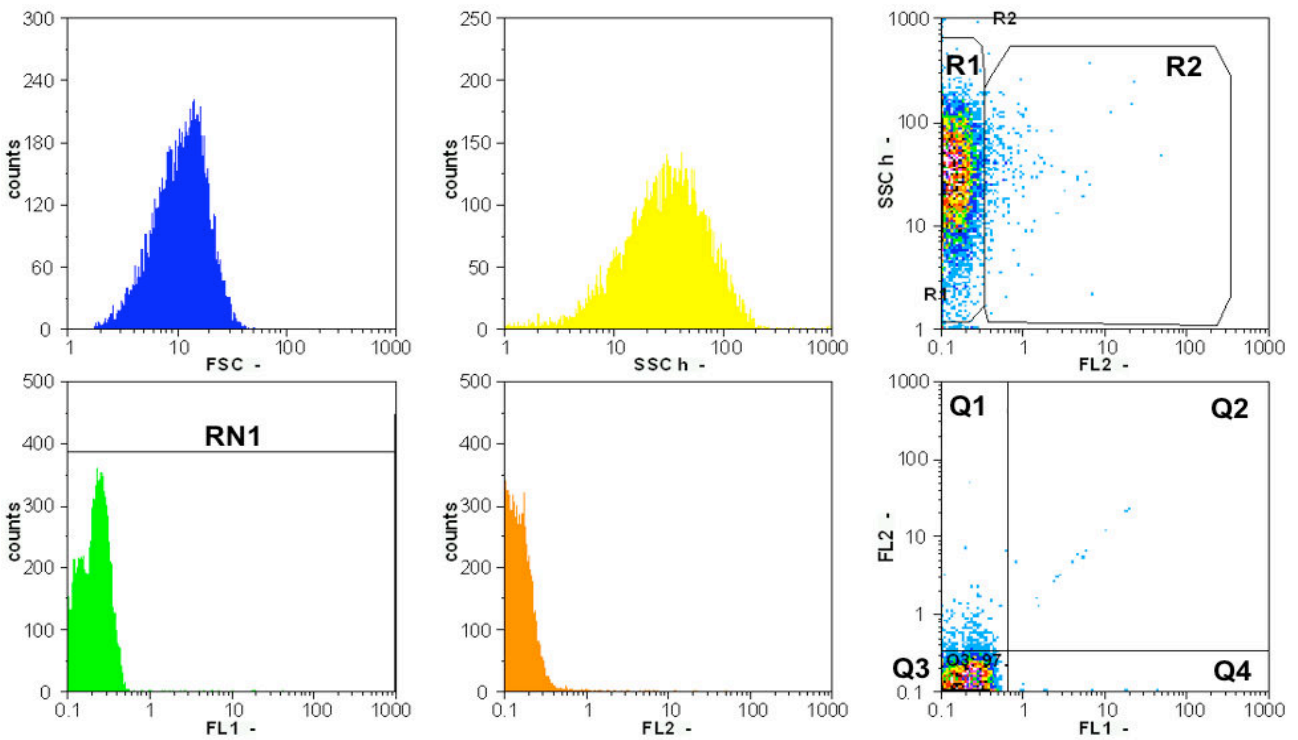


Abbildung 20: Darstellung einer Probe der Versuche zu Oberflächenveränderungen auf RBC mit der FloMax[®]-Software.

Abbildung 19 und Abbildung 20 (vorherige Seite): Auf diesen Abbildungen ist jeweils als Histogramm im linken oberen Fenster das Vorwärtsstreulicht und im mittleren oberen Fenster das Seitwärtsstreulicht dargestellt. Unten links ist die Fluoreszenz (FL) 1 (entspricht der Bindung von FITC-markierten Antikörpern (Ak) an einen Membranrezeptor oder an ein membrangebundenes Protein) abgebildet. Hier ist die Region RN1 definiert, welche alle Zellen umfasst, und an der die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Probe für die FL1 erfasst wird. Im mittleren unteren Bild erkennt man die FL2. Ein erhöhtes Signal in der FL2 entspricht der Färbung mit Ethidiumbromid (EtBr), und stellt parasitierte rote Blutkörperchen (RBC) dar. Das Fenster rechts oben zeigt das Streudiagramm der FL2 gegen das Seitwärtsstreulicht (SSC-h), in welchem man die parasitierten RBC (R2) gut von den nicht parasitierten RBC (R1) unterscheiden kann. Der Unterschied zwischen den beiden Proben ist hier gut erkennbar: In der Abbildung 19 ist kein EtBr verwendet worden, und so liegen wenige Zellen in der Region R2. Dagegen sind in der Abbildung 20 die mit EtBr angefärbten RBC in der Region R2 gut sichtbar. Im Diagramm der FL1 vs. FL2 (Fenster unten rechts) teilt ein Kreuz die Population, es kann zwischen parasitierten und nicht parasitierten Erythrozyten sowie Zellen mit und ohne gebundene Antikörper unterschieden werden. Hier liegen im linken oberen Quadranten Q1 die parasitierten Zellen, rechts oben (Q2) liegen parasitierte Zellen, welche ebenfalls positiv für eine Antikörperbindung durch einen FITC-gekoppelten Ak sind. In der Abbildung 20 sind positive Zellen im Quadranten Q2 sichtbar. Im Quadranten rechts unten (Q4) sind jene RBC erkennbar, die nicht parasitiert sind, aber positiv für eine Antikörperbindung durch einen FITC-gekoppelten Ak sind. Im Quadranten links unten (Q3) liegen ungefärbte Zellen.

Zur Bestimmung der Anzahl der für einen Antikörper oder für ein Komplementmolekül positiven Zellen wurde von der Probe der Wert der ungefärbten Kontrollprobe subtrahiert. Bei negativen Werten wurden diese gleich Null gesetzt. Zur Bestimmung der MFI einer Probe wurde der Wert der Probe durch den Wert der ungefärbten Kontrollprobe dividiert. Bei Werten von unter eins wurde der Wert gleich eins gesetzt.

Es wurde analysiert, ob es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen (Wilcoxon-Rangsummentest bei zwei Gruppen bzw. Kruskal-Wallis-Test bei mehr als zwei Gruppen), jeweils für die Quadranten Q2 und Q4 und deren Summe, gibt. Auf Unterschiede in der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wurde ebenfalls geprüft.

4.3.1.4 Test auf Glykophorin A auf Erythrozyten

Für diesen Test wurden auch die roten Blutkörperchen der Anämiestudie verwendet. 10 μ L der 1%-igen RBC-Suspension wurden zu 90 μ L einer 1:500 Verdünnung des FITC-konjugierten Antikörpers gegen Glykophorin A in D-PBS gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde zweimal mit 1 ml D-PBS bei RT 5 Minuten bei 670 x g gewaschen. Nach Zugabe von 500 μ L D-PBS wurde die Probe im CyFlow[®] SL blau mit den selbst generierten und optimierten Einstellungen für rote Blutkörperchen eingelesen.

4.3.1.5 Test auf Glykophorin C auf Erythrozyten

Für diese indirekte Färbung von Glykophorin C auf RBC wurden 10 µL der 1%-igen RBC-Suspension aus der Anämiestudie zu 90 µL einer 1:2.500 Verdünnung des monoklonalen Ak gegen humanes Glykophorin C in D-PBS hinzugefügt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde zweimal gewaschen (1 mL D-PBS, 670 x g, 5 min) und 100 µL des sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-Ak einer 1:25 Verdünnung in D-PBS zu dem im Röhrchen verbleibenden Volumen hinzugegeben. Es wurde 30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend zweimal gewaschen (1 mL D-PBS, 670 x g, 5 min). Nach Zugabe von 500 µL D-PBS wurde die Probe im CyFlow® SL blau mit den selben Einstellungen wie für die Glykophorin A-Proben eingelesen.

4.3.1.6 Probenbereitung für *P.f.*-GPI-Test

Wenn nicht anders angegeben, wurden diese Proben folgendermaßen vorbereitet: Die ImuScreen 3 Zellen (Blutgruppe 0 Rhesus negativ (Rh⁻), nicht infizierte rote Blutkörperchen, nRBC) wurden zweimal in 500 µL PBS bei Raumtemperatur (RT) (670 x g, 5 min) gewaschen. 10 µl gepackte Zellen wurden auf 990 µL PBS gegeben und kurz mit dem Vortexer gemischt, um eine 1%-ige Suspension zu erhalten.

50 µL nRBC-Suspension, 49 µL PBS und 1µL *P.f.*-GPI wurden auf dem Thermomixer (150 x g) eine Stunde bei 37°C inkubiert. In einigen Experimenten:

- (i) wurden äquimolare Mengen an lipidiertem und nicht lipidiertem *P.f.*-GPI (Abbildung 10) verwendet;
- (ii) 0,5; 1 oder 2 nmol (Endkonzentration 5 – 20 µM) *P.f.*-GPI wurden pro Probe verwendet;
- (iii) wurden nRBCs in folgenden Konzentrationen appliziert: 1% ($10^7/100$ µL); 3% ($3 \times 10^7/100$ µL); 10% ($10^8/100$ µL);
- (iv) variierte die Serumkonzentration zwischen 1:2 und 1:900;
- (v) wurde Triton X-100 in Endkonzentrationen zwischen 0,00044 und 0,004 % (v/v) zugegeben;
- (vi) wurde die Inkubationstemperatur auf 4°C gesenkt;
- (vii) wurde 1 µL *P.f.*-GPI mit 1 µL Serum des Patienten mit akuter schwerer Malaria und 8 µl PBS präinkubiert, bevor die Mischung anstelle des reinen *P.f.*-GPIs zu den nRBC gegeben wurde.

Nach der Inkubation wurden die behandelten nRBCs zweimal mit jeweils 1 mL PBS gewaschen (670 x g, 5 min), der Überstand wurde verworfen und das Pellet im verbleibenden PBS resuspendiert. Abhängig vom Test wurde nun zwischen 0,11 und 100 µL Serum hinzugefügt, was zu Serumverdünnungen zwischen 1:2 und 1:900 führte, und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurden die nRBCs zweimal mit 1 mL PBS gewaschen (670 x g, 5 min), der Überstand wurde verworfen und das Pellet im verbleibenden PBS resuspendiert. Ein 100 µL Aliquot der Kaninchen-anti-human IgG und/oder Kaninchen-anti-human IgM Antikörperverdünnung (1:125) wurde hinzugegeben (Endverdünnung 1:250), gemischt und das Gemisch 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die nRBCs wurden zweimal mit 1 mL PBS gewaschen (670 x g, 5 min), der Überstand wurde verworfen und das Pellet im verbleibenden PBS resuspendiert. 100 µL einer 1:10 Verdünnung des Schwein-anti-Kaninchen Ak wurde hinzugegeben (Endverdünnung 1:20). Der Inkubation bei 37°C für 30 Minuten folgten zwei Waschschritte, und die Zellen wurden umgehend mit einem Durchflusszytometer (FACScan®) analysiert. Die Einstellungen wurden in einer Vorstudie optimiert und blieben über den gesamten Studienzeitraum gleich. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Cell Quest® Pro Software. Alle Experimente wurden mindestens zweimal in unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Die Daten wurden als Histogramme und als Streudiagramme dargestellt. In dem Fluoreszenzkanal 1 (FL1, 530 nm) wurde über die Fluoreszenzintensität eine Region definiert. Alle Zellen, deren Fluoreszenzintensität größer als die der Negativkontrolle war, wurden als positiv für Antikörperbindung, respektive als signifikante Bindung von Antikörpern in Abhängigkeit von dem Vorhandensein von *P.f.*-GPI, betrachtet. Im Folgenden bezeichnet die Erkennung von *P.f.*-GPI die Prozentzahl der positiv fluoreszierenden Zellen.

4.3.2 Mikroarray mit *P.f.*-GPI

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Erkennung von *P.f.*-GPI an nRBC mit Patientenserum wurde ein Mikroarraytest von Dr. Faustin Kamena aus der Laborgruppe von Prof. Peter H. Seeberger in Zürich entwickelt und durchgeführt (vgl. Kamena *et al.* (109)).

Dazu wurden Aldehydobjektträger in PBS mit 1% Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA; g/v) getaucht und über Nacht bei RT inkubiert.

Anschließend wurden die Objektträger zweimal mit destilliertem Wasser und zweimal mit 95%-igem Ethanol abgespült und unter einem trockenen Argonstrom getrocknet. Die trockenen Objektträger wurden in wasserfreiem Dimethylformamid, welches jeweils 100 nM 6-Maleimidohexansäure-*N*-hydrosuccinimidester und *N,N*-Diisopropylethylamin enthielt, getaucht, für 24 Stunden bei RT inkubiert, viermal mit 95%-igem Ethanol gewaschen und in einem Vakuumexsikkator bis zum Gebrauch gelagert.

Viermal je 3 nL einer 10 µM-Lösung der acht synthetischen *P.f.*-GPI-Glykane (Abbildung 11) in PBS wurden auf die Oberfläche des vorbereiteten Aldehydobjektträgers aufgebracht und bildeten die Mikroarray-Spots für einen Genetix-Array-Scanner. Im Anschluss wurden die Objektträger in einer humiden Kammer 24 Stunden inkubiert, bevor sie mit 1 mM β-Mercaptoethanol für zwei Stunden bei RT behandelt wurden.

Die gespotteten Mikroarray-Objektträger wurden mit FlexWell-64 Schichten bedeckt. Anschließend wurden die Löcher mit 5% Milchpulver enthaltendem PBS für 60 Minuten bei RT blockiert und dreimal mit PBS, welches 0,05% Tween-20 enthielt, gewaschen. Die Löcher wurden danach mit dem Serum des Patienten mit akuter schwerer Malaria oder weiteren Seren von Patienten mit unterschiedlichem Verlauf der Malaria (jeweils unverdünnt) in PBS, welches 0,05% Tween-20 und 0,5% Milchpulver enthielt, zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Objektträger mit fluoreszierenden anti-human IgG- bzw. IgM- Antikörpern (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) jeweils in einer 1:1000-Verdünnung für 60 Minuten bei RT inkubiert und nachfolgend gewaschen. Die getrockneten Objektträger wurden mit einem GenePix[®] Personal 4100A Mikroarrayscanner eingelesen. Die Auswertung erfolgte mit der GenePix[®] Pro 6-Software.

4.3.3 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der JMP[®] Software, Version 5.0.1, durchgeführt. Die Daten sind unabhängig voneinander und nicht normalverteilt. Auf Unterschiede zwischen den Gruppen wurde daher mittels der parameterfreien Verfahren des Kruskal-Wallis-Tests (bei mehr als zwei Gruppen) bzw. des Wilcoxon-Rangsummentests (bei zwei Gruppen) getestet. Die Nullhypothese besagt, dass zwischen zwei Gruppen kein Unterschied besteht. Zweiseitige p-Werte von <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Anschließend wurde die Bonferronikorrektur angewandt.

5 Ergebnisse

In einer klinischen Studie zur Malariaanämie in Kumasi, Ghana, wurden die Blutproben von 122 Patienten einerseits auf das Vorkommen von Hämozoïn in peripheren Leukozyten, andererseits auf Veränderungen der Erythrozytenmembran untersucht.

Allen durchgeführten Analysen ist hierbei gemeinsam, dass die Gruppen I (14 Kinder mit schwerer Malariaanämie, aber ohne weitere Komplikationen) und II (33 Patienten mit komplizierter Malariaanämie) zunächst zur Hauptgruppe Anämie (A+) zusammengefasst worden sind. Die Gruppen III (49 Patienten mit komplizierter Malaria ohne schwere Anämie) und IV (26 asymptomatische Kinder mit einer *P. falciparum*-Parasitämie) sind zur Hauptgruppe Malaria ohne Anämie (A-) zusammengefasst worden. Es gibt ausserdem Proben von 15 Patienten mit schwerer Anämie, die zwar nicht eindeutig den Gruppen I oder II zugeordnet werden können, die hier jedoch in die Anämiegruppe (A+) eingeordnet worden sind. Bei allen durchgeführten Analysen gab es zusätzlich zu den vorbenannten Gruppen noch eine Gruppe mit elf gesunden Erwachsenen, die europäische Kontrollgruppe (Ktrl).

5.1 Hämatologische Daten der Studienkohorte

Zentrale Blutparameter der Patienten sind in der Tabelle 4 für die vier klinischen Gruppen zusammengefasst. Angegeben sind hier jeweils der Median sowie die 10. und 90. Perzentile. Es fallen die niedrigen Hämoglobinwerte der Gruppen der Anämiepatienten (Gruppen I und II) auf. Dies war ein Einschlusskriterium für diese Gruppen, jedoch hat auch die Gruppe der Patienten mit einer schweren Malaria aber ohne schwere Anämie (Gruppe III) signifikant erniedrigte Werte. Ebenso liegen in den Anämiegruppen I und II die Werte für die Erythrozytenzahl sehr stark unter dem Normbereich. Auffällig sind weiterhin die niedrigen Thrombozytenwerte der Gruppen II und III sowie die relativ hohen Leukozytenwerte der beiden Anämiegruppen I und II.

In der Tabelle 5 sind signifikante Unterschiede einiger Blutparameter zwischen den verschiedenen Patientengruppen der Anämiestudie dargestellt.

Tabelle 4: Multiple Blutbildparameter der Studienkohorte. Angegeben sind jeweils der Median sowie die 10. und 90. Perzentile; n = Anzahl Patienten pro Gruppe

<i>Blutparameter</i>	<i>Normbereich</i> (für Kinder von 1 bis 16 Jahren)	Gruppe I (n = 14) Schwere Anämie, ohne weitere Komplikationen		Gruppe II (n = 33) Schwere Anämie, weitere Komplikationen		Gruppe III (n = 49) Schwere Malaria ohne schwere Anämie		Gruppe IV (n = 26) Parasitämie, aber ohne klinische Malaria	
		<i>Median</i>	<i>10./90. Perzentile</i>	<i>Median</i>	<i>10./90. Perzentile</i>	<i>Median</i>	<i>10./90. Perzentile</i>	<i>Median</i>	<i>10./90. Perzentile</i>
Parasitämie^a	k.A.	3,5	2/4	4	2/4	3,5	1/4	4	1/4
Hämoglobin (g/dl)	11,5-14,5	4	2,6/ 4,9	4,3	2,64/ 4,8	7,9	6,4/ 10,7	10,4	8,17/ 12,62
Hämatokrit (in %)	32-45	12,5	8,64/ 14,68	13,1	8,9/ 15,4	24	19,2/ 31,9	31,45	24,72/ 36,93
Erythrozyten (*10 ⁶ /µl)	3,9-5,1	1,64	1,06/ 2,03	1,75	0,98/ 2,05	3,44	2,59/ 4,24	4,29	3,28/ 5,12
Thrombozyten (*10 ³ /µl)	140-440	124	45,6/ 206,6	79	26,2/ 192,6	65,5	24/ 363,5	134,5	35,5/ 328
Gesamtleukozyten (*10 ³ /µl)	4-18	14,7	5,66/ 24,62	11,6	4,38/ 30,22	9,15	6,08/ 15,7	7,15	5,09/ 11,55
Neutrophile (*10 ³ /µl)	1-8,5	5,5	2,94/ 12,04	5,8	2,14 / 15,26	5,65	2,3/ 9,6	4,05	1,52/ 7,44
Lymphozyten (*10 ³ /µl)	1-14,5	7,2	2,24/ 14,74	4,8	1,74/ 14,1	3,05	1,48/ 5,97	1,75	0,87/ 4,81
Laktat (mmol/l)	0,63-2,44	3,05	1,28/ 6,46	7,54	4,6/ 14,16	4,33	1,42/ 9,37	2,24	0,85/ 5,4

^aauf einer Skala von 1 bis 4; 1 = < 50 Malariaparasiten (MP) pro 200 Leukozyten (WBC); 2 = 50 – 100 MP/200 WBC; 3 = 101-200 MP/200 WBC; 4 = >200 MP/200 WBC

Ergebnisse

Tabelle 5: Signifikante Unterschiede der Blutparameter zwischen klinischen Gruppen. Signifikanzen nach Auswertung mittels Wilcoxon-Rangsummentest mit einem p-Wert <0,0005 sind fett unterlegt.

<i>Blut- parameter</i>	Gruppe I vs. Gruppe II (p-Wert)	Gruppe I vs. Gruppe III (p-Wert)	Gruppe I vs. Gruppe IV (p-Wert)	Gruppe II vs. Gruppe III (p-Wert)	Gruppe II vs. Gruppe IV (p-Wert)	Gruppe III vs. Gruppe IV (p-Wert)
Hämoglobin	0,3846	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Erythrozyten	0,306	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Thrombozyten	0,031	0,0112	0,9425	0,2309	0,0268	0,0065
Leukozyten	0,5555	0,01	0,0004	0,0516	0,002	0,0021
Lymphozyten	0,2957	0,0003	<0,0001	0,0169	0,0002	0,0121
Laktat	<0,0001	0,0392	0,2688	0,0003	<0,0001	0,0007

5.2 Nachweis von Hämozoin in peripheren Leukozyten

Hämozoin stellt ein für Malariainfektionen charakteristisches Hämoglobinabbauprodukt dar, welches von peripheren Phagozyten - wie Monozyten oder neutrophilen Granulozyten - aufgenommen werden kann. Da das unlösliche Hämozoin im Lichtmikroskop bräunlich erscheint, spricht man auch von Malariapigment (vgl. Abbildung 21). Aufgrund der depolarisierenden Eigenschaften der Hämozoinkristalle lassen sich Zellen, die Hämozoin enthalten, in einem Durchflusszytometer mit Filtern für depolarisiertes Licht nachweisen (Abbildung 22).

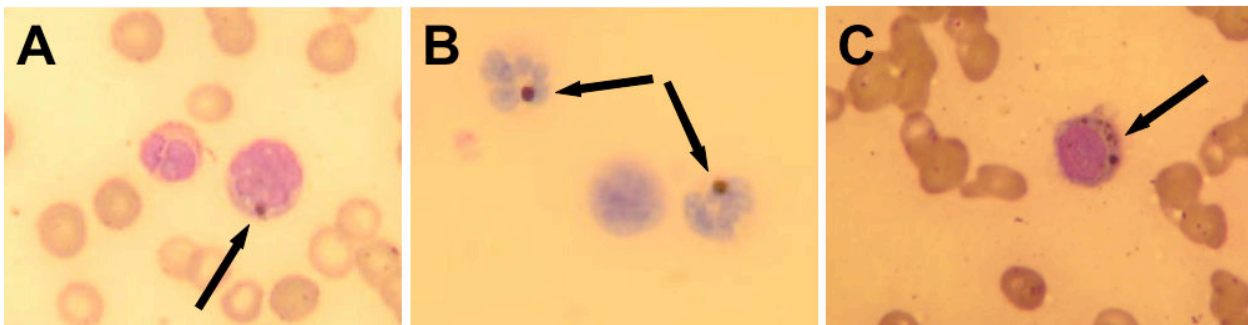


Abbildung 21: Mikroskopischer Nachweis im Blutausstrich von Hämozoin in Leukozyten nach Giemsa-Färbung. A) Abgebildet ist ein Hämozoin haltiger Monozyt. B) Hier sind zwei Hämozoin haltige neutrophile Granulozyten zu sehen. C) Die Identität dieser Zelle ist unklar, eventuell handelt es sich hierbei um einen Monozytenvorläufer mit geringer FcγRIII- (CD16) Expression. Mehrere bräunliche Einschlüsse sind an der rechten oberen Seite erkennbar.

Es wurde zunächst mit dem Kruskal-Wallis- bzw. Wilcoxon Rangsummentest nach Unterschieden im Vorkommen von Pigment tragenden Leukozyten (PCL) zwischen Kindern mit und ohne schwere Anämie (A-) im Vergleich zur europäischen Kontrollgruppe gesucht. Bei signifikanten Unterschieden wurde bei der weiteren Analyse die Hauptgruppe Malaria ohne Anämie in die klinischen Gruppen III und IV unterteilt, da diese Hauptgruppe aus zwei inhomogenen Untergruppen besteht. Die Gruppe der anämischen Patienten (A+) ist bei dieser Teiluntersuchung so bestehen geblieben. Waren bei dieser Analyse signifikante Unterschiede festzustellen, wurden die Patienten der Anämiegruppe bei der weiteren Analyse in die klinischen Gruppen I und II unterteilt. Die 15 Patienten, die nicht eindeutig den Gruppen I oder II zugeordnet werden können, werden hier nicht mehr mit einbezogen.

Für den Nachweis von Hämozoin wurde einerseits geprüft, ob signifikante Unterschiede in der absoluten Anzahl an Pigment tragenden Monozyten (PCM) und

Ergebnisse

Neutrophilen (PCN) bestehen, andererseits ob Unterschiede im prozentualen Anteil der PCM bzw. PCN an der jeweiligen Gesamtpopulation zwischen den Patientengruppen zu erkennen sind.

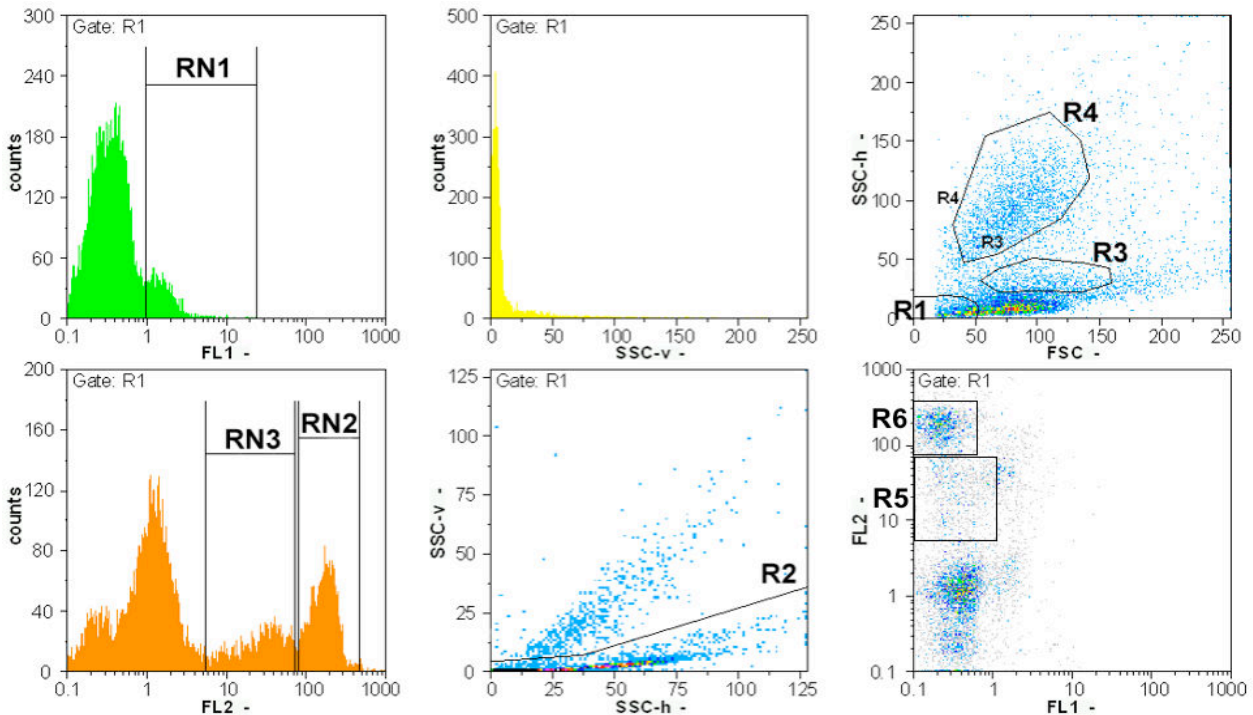


Abbildung 22: Beispiel einer Patientenprobe zum Nachweis von Hämozoin tragenden Leukozyten im Durchflusszytometer. Im Streudiagramm FSC gegen SSC-h (Fenster oben rechts) sind die verschiedenen Leukozytenpopulationen zu erkennen: unten rechts liegen die Lymphozyten, darüber in der Region R3 die Monozyten. Die obere Population besteht aus neutrophilen Granulozyten. Ganz unten links liegen in diesem Fenster Zelltrümmer und Artefakte, welche durch die Region R1 ausgeschlossen werden. Durch die Region R1 sind auch in allen anderen Fenstern Zelltrümmer und Artefakte ausgeschlossen, so dass dort nur die Leukozyten ausgewertet werden. Im Fenster oben links ist die Fluoreszenz 1 (FITC) dargestellt. In der Region RN1 sind Monozyten zu erkennen, die mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen CD14 markiert wurden. Das Fenster oben in der Mitte zeigt die Signale für depolarisiertes Licht. Im Histogramm unten links sind in der Region RN2 neutrophile Granulozyten zu erkennen, die mit einem R-PE-gekoppelten Antikörper gegen CD16 markiert wurden. Die Region RN3 umfasst Zellen mit einer geringeren CD16-Expression. Das Fenster unten in der Mitte zeigt das Streudiagramm SSC-h gegen SSC-v. Die Region R2 zeigt die depolarisierenden Zellen. Im Fenster unten rechts ist das Streudiagramm mit den Achsen FL1 und FL2 gezeigt. Oben sind die Neutrophilen aufgrund ihrer R-PE-Markierung von CD16 erkennbar (R6), unten rechts die Monozyten aufgrund der Färbung mittels Anti-CD14-FITC Ak. Mit der Region R5 werden die Zellen erfasst, die schwach positiv für CD16 sind.

Im Streudiagramm des Vorwärtsstreulichts (FSC) gegen das Seitwärtsstreulicht (SSC-h) liegen in der Region R3 die Monozyten und in der Region R4 die Neutrophilen (Abbildung 22). Schaut man sich im Fenster des Seitwärtsstreulichts (SSC-h) gegen das depolarisierte Seitwärtsstreulicht (SSC-v) nur die Monozyten bzw. die Neutrophilen an, so erhält man durch die Region R2 die Anzahl der Pigment tragenden Monozyten (PCM) bzw. der Pigment tragenden Neutrophilen (PCN).

5.2.1 Unterschiede in der Anzahl der Hämozoin tragenden Leukozytenpopulationen

Bei dieser Analyse wurde geprüft, ob sich die Anzahl der Hämozoin haltigen Zellen in den einzelnen Gruppen unterscheidet. Zum einen wurden Monozyten, zum anderen neutrophile Granulozyten untersucht.

5.2.1.1 Hämozoin tragende Monozyten

Die Anzahl der Hämozoin tragenden Monozyten (PCM) reicht bei den Patienten von 0 bis 366 pro 10.000 Zellen. Vergleicht man die Anzahl der PCM in den einzelnen Gruppen, so erkennt man signifikante Unterschiede zwischen der Anämiegruppe (A+), der Gruppe der Kinder mit Malaria ohne schwere Anämie (A-) und der europäischen Kontrollgruppe (Ktrl), wobei die Gruppe der Patienten mit schwerer Anämie den höheren Anteil an Pigment tragenden Monozyten aufweist (Abbildung 23A). Allerdings ist der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen schwach signifikant ($p=0,0447$). Gegenüber der Kontrollgruppe unterscheiden sich beide Patientengruppen jedoch deutlich ($p<0,0001$). Berücksichtigt man die Bonferronikorrektur, so bleiben nur p -Werte $< 0,001$ signifikant. Einen Trend zeigen p -Werte über 0,001 auf.

Teilt man die Gruppe A- wieder in die Gruppen III (Kinder mit einer schweren Malaria, aber ohne schwere Anämie) und IV (asymptomatische Patienten) auf, so wird erkennbar, dass die Hauptgruppe der Anämiepatienten (A+) eine signifikant höhere Anzahl an PCM aufweist als die Gruppe IV. Dabei unterscheidet sich die Gruppe A+ jedoch nicht signifikant von der Gruppe III (Abbildung 23B).

In der weiteren Analyse wird die Hauptgruppe A+ in die klinischen Gruppen I (Anämiepatienten ohne weitere Komplikationen) und II (Anämiepatienten mit zusätzlichen Komplikationen) aufgeteilt. Vergleicht man jetzt die Gruppen I bis IV und die Kontrollgruppe miteinander, so finden sich schwach signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen II und IV ($p=0,0184$), wobei die Gruppe IV deutlich weniger PCM aufweist als die Gruppe II. Weitere signifikante Unterschiede bestehen zwischen den Gruppen I bis IV im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 23C).

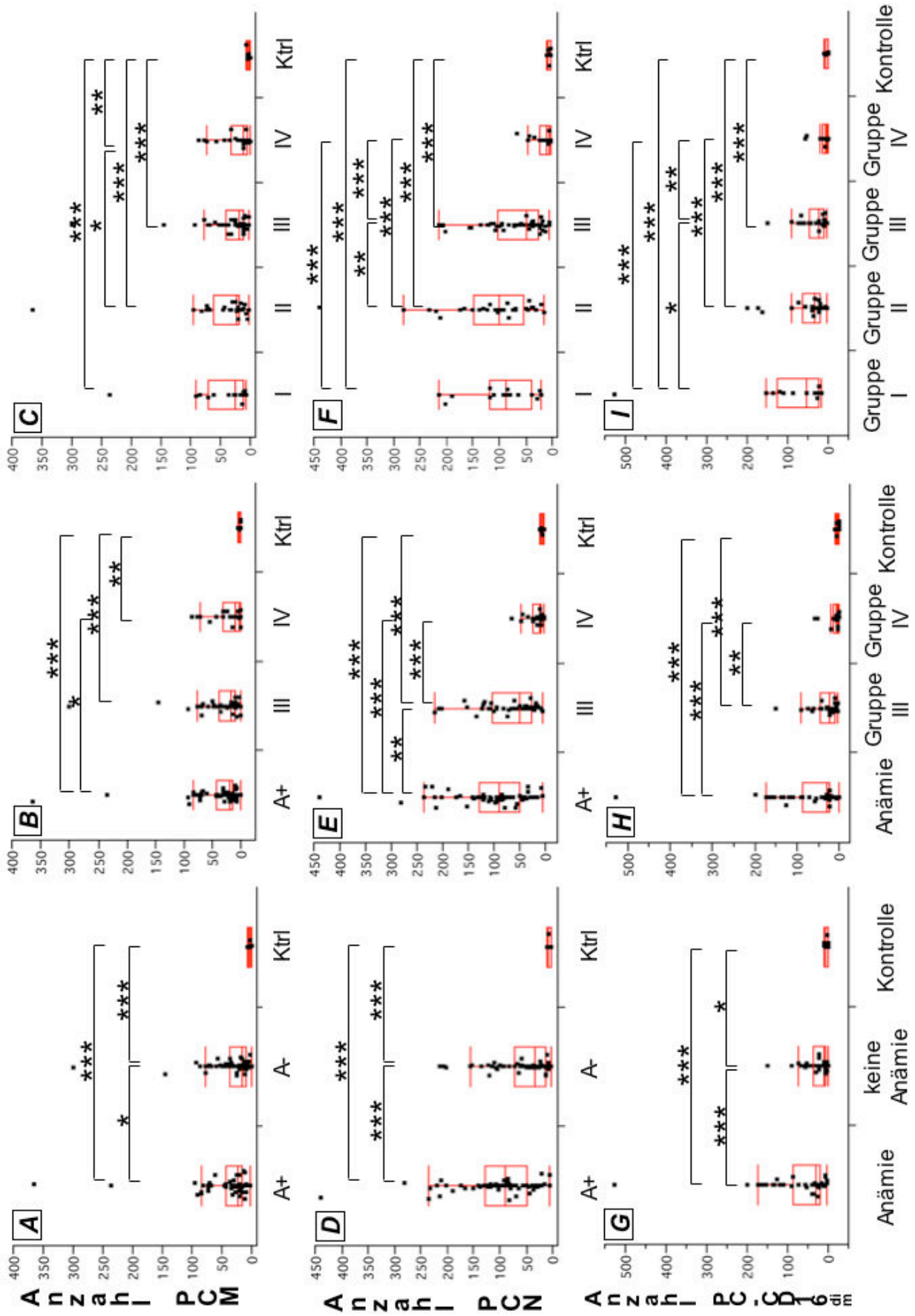


Abbildung 23

Abbildung 23 (vorherige Seite): Verteilung der Anzahl der Pigment tragenden Zellen auf die verschiedenen Gruppen. In der oberen Zeile (Fenster A bis C) ist jeweils die absolute Anzahl der Pigment tragenden Monozyten (PCM), in der mittleren Zeile (Fenster D bis F) die der Pigment tragenden Neutrophilen (PCN) und in der unteren Zeile (Fenster G bis I) die der Pigment tragenden CD16^{dim}-Leukozyten abgebildet. In der linken Spalte (Fenster A, D und G) erfolgte die Aufteilung der Proben in die Gruppen der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Patienten ohne schwere Anämie (A-) und die Gruppe der europäischen Kontrollen (Ktrl). In der mittleren Spalte (Fenster B, E und H) ist die Gruppe A- in die klinischen Gruppen III (komplizierte Malaria ohne schwere Anämie) und IV (Patienten ohne klinische Symptome einer Malaria) aufgegliedert und steht im Vergleich mit den Gruppen A+ und Ktrl. Die rechte Spalte (Fenster C, F und I) zeigt die Aufteilung der Anzahl der jeweiligen Pigment tragenden Zellen auf die klinischen Gruppen I bis IV und die europäischen Kontrollen (Ktrl), wobei die Gruppe I die Gruppe der Anämiepatienten ohne zusätzlich Komplikationen darstellt, und die Gruppe II die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie und weiteren Komplikationen ist. Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet. Drei Sternchen (***) bedeuten, dass der p-Wert $\leq 0,0005$ liegt, zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen $0,0005$ und $\leq 0,005$, und ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen $0,005$ und $0,05$.

5.2.1.2 Hämozoin tragende Neutrophile

Die Anzahl an Pigment tragenden Neutrophilen (PCN) in den analysierten Proben reicht von 2 bis 440. Ähnlich wie bei den Monozyten unterscheiden sich auch hier die drei Patientengruppen (A+, A- und Ktrl) signifikant voneinander, wobei Patienten der Anämiegruppe die höchste und die Kontrollgruppe die geringste Zahl an PCN haben (Abbildung 23D).

Teilt man die Hauptgruppe der Patienten ohne Anämie (A-) in die Gruppen III und IV ein, so ist zu sehen, dass sich diese beiden Gruppen sowohl voneinander ($p < 0,0001$) als auch gegenüber der Anämiegruppe (A+) klar signifikant unterscheiden (Abbildung 23E). Die Gruppe A+ zeigt hier deutlich höhere Zahlen an PCN als die Gruppen III, IV und Ktrl.

Bei Aufgliederung der Patientenproben in die klinischen Gruppen I bis IV und Ktrl erkennt man jeweils signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen I und IV ($p < 0,0001$), II und III ($p = 0,0028$), II und IV ($p < 0,0001$) sowie III und IV ($p < 0,0001$). Darüber hinaus unterscheidet sich die Gruppe der europäischen Kontrollpersonen signifikant von den Gruppen I ($p < 0,0001$), II ($p < 0,0001$) und III ($p < 0,0001$) (siehe Abbildung 23F). Die Zahl der PCN in den Gruppen, gemessen am Median, sinkt dabei in folgender Reihenfolge: II > I > III > IV > Ktrl.

5.2.1.3 Population schwach CD16-positiver, Hämozoin tragender Leukozyten (PC-CD16^{dim})

Eine Erstbeschreibung stellte der Nachweis einer Leukozytenpopulation dar, die nicht bei allen Patienten vorkam. Diese Population ist im Streudiagramm FL1 vs. FL2 positiv für den Fc γ -Rezeptor III (CD16), allerdings deutlich geringer als die Neutrophilen,

und negativ für CD14. Im Streudiagramm FSC gegen SSC-h liegen diese Zellen bei der Population der Lymphozyten. Im Folgenden wird diese für CD16 schwach positive Population CD16^{dim} genannt. Diese Population wurde ebenfalls darauf hin untersucht, ob sie in der Lage ist, Hämozoin zu phagozytieren.

Die Pigment haltigen CD16^{dim}-Leukozyten (PC-CD16^{dim}) wurden folgendermaßen analysiert: Durch Eingrenzung der Zellen mit der Region R1 wurden Zelltrümmer und Artefakte ausgeschlossen. Im Streudiagramm FL1 gegen FL2 wurde anhand der Fluoreszenzintensität der FL2 eine Region definiert (R5), welche jene Zellen umfasst, die schwach positiv für CD16 sind (CD16^{dim}). Die Region R5 wurde auf das Fenster mit dem Streudiagramm der Seitwärtsstreulichte SSC-h gegen SSC-v angewendet und analysiert, wie viele Zellen in der Region R2 liegen (PC-CD16^{dim}) und somit positiv für Hämozoin sind.

Die Spanne der Anzahl der schwach CD16 positiven, Pigment tragenden Leukozyten (PC-CD16^{dim}) in den analysierten Proben betrug 0 bis 527. Bezüglich des Vorkommens von Hämozoin unterscheiden sich die Anämiegruppe (A+), die Nichtanämiegruppe (A-) sowie die Kontrollgruppe (Ktrl) signifikant voneinander, wobei die Gruppe der Patienten mit Anämie die höchste und die Kontrollgruppe die geringste Anzahl an PC-CD16^{dim} enthält (Abbildung 23G).

Weiterhin wurde geprüft, ob Unterschiede zwischen der Hauptgruppe A+, den Gruppen III und IV und der Kontrollgruppe bestehen. Signifikante Unterschiede sind zwischen den Gruppen III und IV ($p=0,0009$) sowie A+ und IV ($p<0,0001$) erkennbar, nicht jedoch zwischen A+ und III (Abbildung 23H). Ähnlich wie bei den PCM und PCN ist auch in der Gruppe A+ die Anzahl Hämozoin haltiger Leukozyten höher als in den Gruppen III, IV und Ktrl.

Gliedert man nun die Gruppe A+ wieder in die Gruppen I und II auf, so ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen diesen Untergruppen. Es unterscheiden sich die Patientengruppen I, II und III signifikant sowohl von der Gruppe IV als auch von der Kontrollgruppe. Darüber hinaus unterscheiden sich auch die Gruppen I und III signifikant voneinander ($p=0,0101$) (vgl. Abbildung 23I).

Insgesamt ist für diesen Teil festzustellen, dass sich die höchste Frequenz Hämozoin positiver Leukozyten in der Gruppe I findet, gefolgt von den Gruppen II, III und IV. Die niedrigste Anzahl ist in der Kontrollgruppe erkennbar.

5.2.1.4 Korrelationen der Anzahl Hämozoin tragender Leukozyten

Vergleicht man die absolute Anzahl der verschiedenen Pigment tragenden Leukozyten (PCM, PCN und PC-CD16^{dim}) untereinander, so erkennt man, dass alle drei Pigment tragenden Leukozytenpopulationen miteinander korrelieren. Die Korrelationskoeffizienten r^2 liegen dabei zwischen 0,188 ($r = 0,433$, $p < 0,0001$) für PCM und PCN und 0,385 ($r = 0,620$, $p < 0,0001$) für PCN und PC-CD16^{dim}. Je mehr Hämozoin von einer Zellpopulation eines Patienten aufgenommen wird, desto höher ist folglich die Wahrscheinlichkeit, dass derselbe Patient auch eine hohe Anzahl einer anderen Pigment tragenden Leukozytenpopulation aufweist.

5.2.2 Unterschiede des Anteiles Hämozoin tragender Leukozyten in den Leukozytenpopulationen

Dieser Abschnitt befasst sich mit der Analyse des relativen Anteils einer Leukozytenpopulation, der Malariapigment phagozytiert hat. Auch hier wurde nach signifikanten Unterschieden zwischen den Patientengruppen gesucht.

5.2.2.1 Hämozoin tragende Monozyten

Insgesamt reicht der Anteil der PCM in den analysierten Patientenproben von 0% bis 32,1%. Bei der Auswertung sind Unterschiede zwischen den klinischen Gruppen erkennbar.

Die drei Gruppen A+, A- und Ktrl unterscheiden sich signifikant voneinander, allerdings ist der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen A+ und A- gering ($p = 0,0103$). Die Gruppe der Patienten mit schwerer Anämie (A+) weist dabei den größten, die Kontrollgruppe den geringsten Anteil an PCM auf (Abbildung 24A).

Gliedert man die Gruppe der Patienten ohne schwere Anämie in die Gruppen III und IV auf, so zeigt sich, dass die Gruppe der Anämiepatienten sich von den Gruppen III und IV signifikant unterscheidet. Die Gruppen III und IV unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 24B).

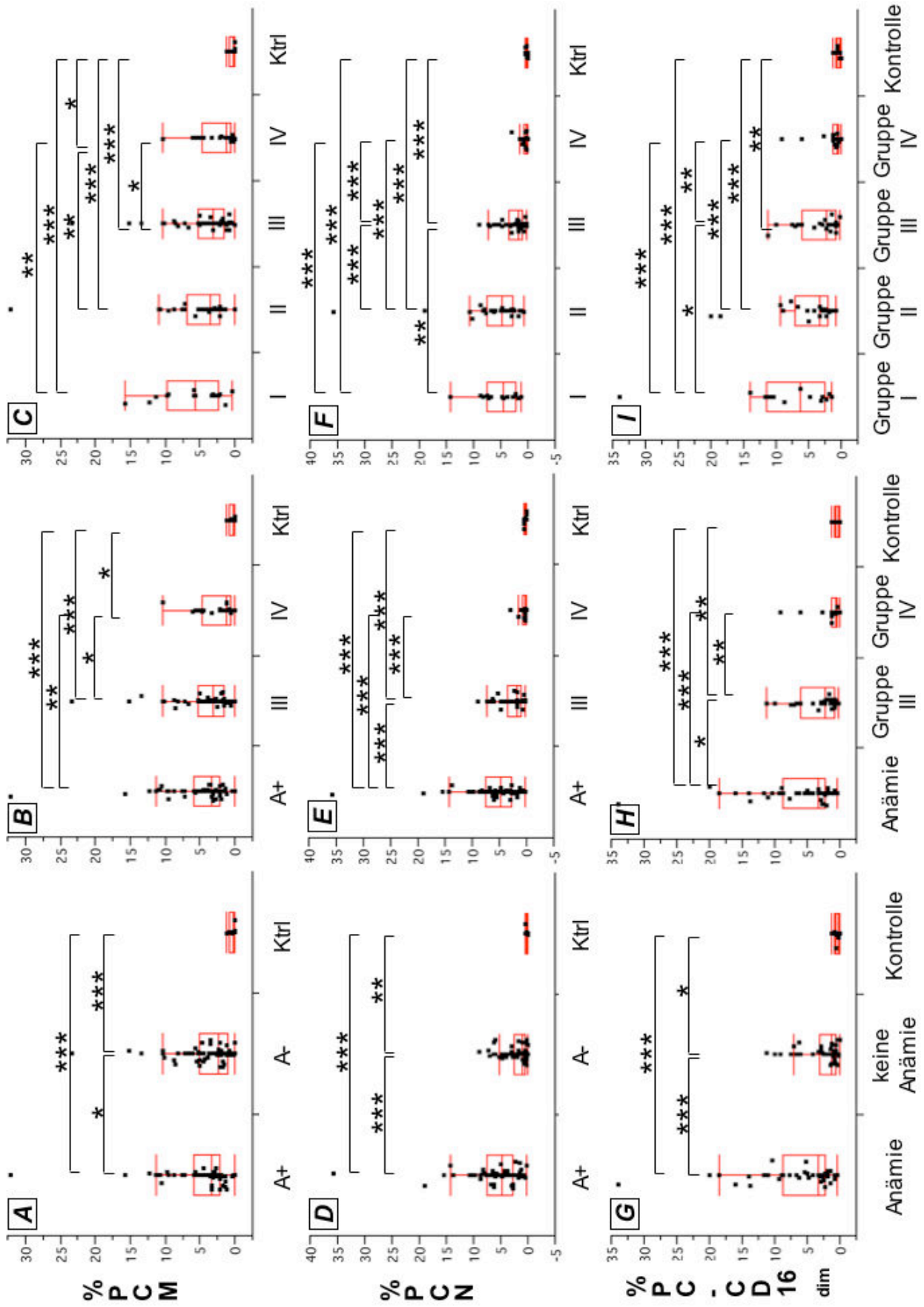


Abbildung 24

Abbildung 24 (vorherige Seite): Verteilung der prozentualen Anteile der Pigment tragenden Leukozyten in den Gruppen. In der ersten Zeile (Fenster A bis C) ist jeweils der relative Anteil der Pigment tragenden Monozyten (PCM) an den Gesamtmonozyten, in der zweiten Zeile (Fenster D bis F) der prozentuale Anteil der Pigment tragenden Neutrophilen (PCN) an den Gesamtneutrophilen und in der dritten Zeile (Fenster G bis H) der relative Anteil der Pigment tragenden CD16^{dim}-Leukozyten an der Gesamtpopulation der CD16^{dim}-Leukozyten abgebildet. In der linken Spalte (Fenster A, D und G) erfolgte die Aufteilung in die Gruppen der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Patienten ohne schwere Anämie (A-) und die europäische Kontrollgruppe (Ktrl). In der mittleren Spalte (Fenster B, E und H) ist die Gruppe A- in die klinischen Gruppen III und IV aufgeteilt und wird mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. Die rechte Spalte (Fenster C, F und I) zeigt die Aufteilung der Anzahl der jeweiligen Pigment tragenden Zellen auf die klinischen Gruppen I bis IV und die europäischen Kontrollen (Ktrl). Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet. Drei Sternchen (***) bedeuten, dass der p-Wert $\leq 0,0005$ liegt. Zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen $0,0005$ und $\leq 0,005$. Ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen $0,005$ und $0,05$, die einen Trend anzeigen.

Bei der weiteren Analyse und Aufteilung in die einzelnen klinischen Gruppen I bis IV und Ktrl ist erkennbar, dass es auch hier signifikante Unterschiede gibt. So unterscheiden sich die Gruppen I, II und III von der Gruppe der europäischen Kontrollen sowie von der Gruppe IV. Die Gruppe IV und die europäischen Kontrollen unterscheiden sich ebenfalls (Abbildung 24C). Der Anteil der PCM (gemessen am Median) sinkt in folgender Reihenfolge in den klinischen Gruppen: $I > II > III > IV > Ktrl$.

5.2.2.2 Hämozoin tragende Neutrophile

Der Anteil an PCN variiert zwischen $0,3\%$ und $35,9\%$. Die drei Gruppen A+, A- und Ktrl unterscheiden sich alle signifikant voneinander, wobei die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie (A+) den größten und die Kontrollgruppe (Ktrl) den geringsten Anteil an PCN aufweist (siehe Abbildung 24D).

In der weiteren Analyse wird die Gruppe der Patienten ohne eine schwere Anämie (A-) in die Patientengruppe mit schwerer Malaria, aber ohne eine schwere Anämie (III) und die Gruppe der asymptomatischen Patienten (IV) aufgegliedert. Es ist zu erkennen, dass die Gruppe A+ im Vergleich zu den Gruppen III und IV einen signifikant erhöhten Anteil an PCN aufweist (Abbildung 24E). Ebenso unterscheiden sich die Gruppen III und IV voneinander, wobei die Gruppe III mehr Hämozoin tragende Neutrophile aufweist.

Bei Betrachtung der Unterschiede zwischen allen klinischen Gruppen erkennt man, dass sich die Gruppen I, II und III sowohl von der Gruppe IV als auch von der Gruppe der europäischen Kontrollen unterscheiden. Darüber hinaus unterscheiden sich die Gruppen I und II von der Gruppe III signifikant (siehe Abbildung 24F). Die größte

Frequenz an PCN tritt hier in der Gruppe II auf, gefolgt von den Gruppen I, III, IV, und die niedrigste Anzahl an PCN ist in der Kontrollgruppe (Ktrl) zu finden.

5.2.2.3 Hämozoin tragende, schwach CD16-positive Leukozyten

Die Anteile der Hämozoin enthaltenden, schwach CD16-positiven (PC-CD16^{dim})-Zellen an der Gesamtpopulation der CD16^{dim} reichen in diesen Analysen von 0% bis 34%. Wie bei den Monozyten unterscheiden sich auch bei dieser Analyse die drei Gruppen A+, A- und Ktrl signifikant voneinander. Dabei ist der Anteil der PC-CD16^{dim}-Zellen in der Anämiegruppe am höchsten und in der Kontrollgruppe am niedrigsten (Abbildung 24G).

Gliedert man die Patienten ohne schwere Anämie (A-) wieder in die Gruppen III und IV auf, so ist zu erkennen, dass sich beide von der Gruppe der Anämiepatienten (A+) signifikant unterscheiden. Auch die Gruppen III und IV unterscheiden sich voneinander (Abbildung 24H).

In der weiteren Analyse und Aufteilung der Patienten in die Gruppen I bis IV und Ktrl ist zu sehen, dass sich die Gruppen I, II und III von den Gruppen IV sowie den europäischen Kontrollen unterscheiden. Darüber hinaus unterscheiden sich die Gruppen I und III signifikant voneinander. Die prozentualen Anteile der PC-CD16^{dim}, gemessen am Median, sinken dabei in folgender Reihenfolge: I > II > III > IV > Ktrl (Abbildung 24I).

5.2.2.4 Korrelationen der Anteile Hämozoin haltiger Leukozyten in den unterschiedlichen Populationen

Vergleicht man die relativen Anteile - wie zuvor die Anzahl - Pigment tragender Leukozyten (PCM, PCN und PC-CD16^{dim}) untereinander, so stellt man fest, dass alle drei Pigment tragenden Leukozytenpopulationen positiv miteinander korrelieren. Die Korrelationskoeffizienten r^2 liegen dabei zwischen 0,1 ($r = 0,317$) für die Korrelation von PCM und PCN und 0,297 ($r = 0,545$) für PCM und PC-CD16^{dim}.

Es bestätigt sich hier die Beobachtung, die schon bei der Korrelation der Anzahl der PCL auffiel: je mehr Hämozoin von einer Population aufgenommen wird, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass derselbe Patient auch einen hohen Anteil an anderen Pigment tragenden Leukozytenpopulationen aufweist (vgl. Kapitel 5.2.1.4).

5.2.3 Vergleich der unterschiedlichen Auswertungsmethoden

Betrachtet man einerseits die Ergebnisse der Verteilung der absoluten Anzahl der Pigment tragenden weißen Blutkörperchen (PCL) sowie andererseits die Ergebnisse der prozentualen Anteile Pigment tragender Zellen an der jeweiligen Leukozytenpopulation und vergleicht diese miteinander, so erhält man sehr ähnliche Ergebnisse. Sämtliche Signifikanzen, die bei der Analyse der Verteilung der Anzahl der PCL auf die Gruppen aufgetreten sind, waren ebenso bei der Auswertung der prozentualen Anteile der PCL vorhanden; teilweise bei den prozentualen Anteilen sogar noch deutlicher. Darüber hinaus gibt es bei den prozentualen Anteilen weitere signifikante Unterschiede. Nur in wenigen Fällen ist eine Signifikanz bei den prozentualen Anteilen schwächer ausgeprägt als bei den absoluten Anzahlen.

5.2.4 Auffällige Patienten

Bei der Auswertung der Hämozoin tragenden weißen Blutkörperchen (sowohl des relativen Anteils als auch der absoluten Zahl) fiel auf, dass es drei Patienten gab, die häufig deutlich höhere Werte an Hämozoin tragenden Zellen zeigten als andere Patienten. Ein Patient war der Gruppe I, und die beiden anderen der Gruppe III zugeordnet. Das Kind der Gruppe I war zum Zeitpunkt der Studie 36 Monate alt und hatte mit 2,6 g/dL einen der niedrigsten Hämoglobinwerte der gesamten Studie. Es zeigte in drei von sechs Analysen hohe Werte. Der erste Patient der Gruppe III war 36 Monate alt, litt an einer zerebralen Malaria (Blantyre Coma Score = 2) mit einem Hämoglobinwert von 8,8 g/dL und zeigte ebenfalls in drei von sechs Analysen auffällig hohe Hämozoin-Werte. Der zweite Patient der Gruppe III wies einen Hämoglobinwert von 7,1 g/dL auf, war zum Studienzeitpunkt bereits sieben Jahre alt und zeigte in fünf von sechs Analysen hohe Werte. Die Gemeinsamkeiten der drei Patienten bestanden im Krankheitsbild einer schweren Malaria sowie hohen Gesamtleukozytenwerten ($> 8,5 \cdot 10^3/\mu\text{L}$).

5.3 Veränderungen der Oberflächeneigenschaften von nicht infizierten und infizierten Erythrozyten

Die folgenden Versuche stehen im Zentrum der vorgestellten Arbeit. Es wurde bei den bereits vorgestellten Patientengruppen der Anämiestudie (vgl. Kapitel 4.1.1.2) untersucht, ob und in welchem Ausmaß IgG- und IgM-Antikörper sowie das Komplementprotein C3d auf der Membran peripherer Erythrozyten im Blut von Kindern mit verschiedenen Formen der Malaria tropica nachweisbar sind. Dazu wurden die Blutproben der Patienten der Anämiestudie untersucht. Zunächst wurden hier die Ergebnisse für die Gesamtheit der RBC (aRBC) analysiert, anschließend wurden nicht infizierte (nRBC) und infizierte rote Blutkörperchen (iRBC) getrennt betrachtet.

Für die Unterscheidung zwischen nicht infizierten und infizierten Erythrozyten wurden die Erythrozyten mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt.

5.3.1 Bindung von IgG, IgM und C3d auf Plasmodium-infizierten sowie nicht infizierten Erythrozyten

Grundlage dieser Analyse ist das Streudiagramm der FL1 (x-Achse) vs. FL2 (y-Achse) (vgl. Abbildung 25). Es wurde hier stets der Anteil jener Zellen betrachtet, welche dort positiv für die Fluoreszenz 1 sind, was durch eine Bindung von FITC-Antikörpern (Ak) an die Immunglobulin bindende RBC-Oberfläche bedingt ist. Die für die FL1 positiven RBC liegen in den Quadranten Q2 (rechts oben) und Q4 (rechts unten). Die mit EtBr gefärbten (infizierten) Zellen sind positiv für die FL2, und so konnten im Streudiagramm des SSC-h vs. FL2 zwei Regionen, R1 und R2, definiert werden. R1 umfasst die nicht infizierten RBC (nicht mit EtBr gefärbten Zellen ohne Zellkern), wohingegen die mit EtBr-gefärbten (parasitierten) Zellen in der Region R2 zu sehen sind (Abbildung 25).

Analysiert wurde zunächst die Gesamtheit der RBC ohne Unterscheidung in nicht infizierte und infizierte Zellen. Für die Auswertung der nicht infizierten RBC werden nur Zellen betrachtet, die in der Region R1 liegen. Damit entfällt die Auswertung des Quadranten rechts oben (Q2), da in dieser Analyse der Quadrant Q2 bei den Proben keine Zellen enthält. Ebenso gibt es keine Summe der Quadranten Q2 und Q4. Ähnlich ist es bei der Auswertung der infizierten RBC, in der die Region R2 für die weitere Analyse zugrunde gelegt wird. Allerdings entfällt hier die Auswertung des rechten

Ergebnisse

unteren Quadranten (Q4) und folglich auch der Summe aus Q2 und Q4, da in dieser Analyse im Quadranten Q4 keine Zellen liegen.

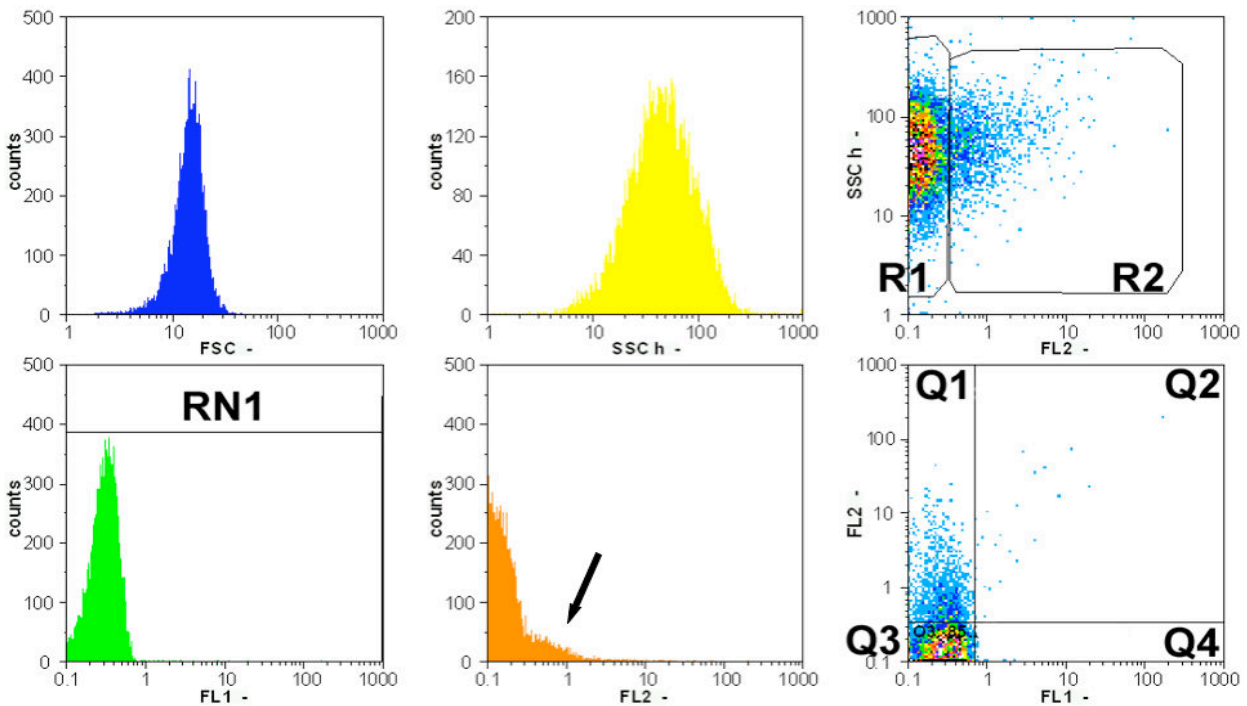


Abbildung 25: Beispielhafte Darstellung einer Patientenprobe für den Nachweis von Oberflächenveränderungen auf RBC im Durchflusszytometer. Im linken oberen Fenster liegt das Vorwärtstreulicht und im mittleren oberen Fenster das Seitwärtstreulicht, jeweils als Histogramm dargestellt. Das Fenster unten links zeigt die Fluoreszenz (FL) 1 (entspricht dem Nachweis von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Antikörpern (Ak) gegen einen Membranrezeptor oder gegen ein membrangebundenes Protein, z.B. IgG). Im Histogrammbild der FL1 ist die Region RN1 definiert, welche alle Zellen umfasst, und an der die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Probe für die FL1 erfasst wird. Im unteren mittleren Bild ist die FL2 dargestellt. Die Zellen mit einer höheren Fluoreszenzintensität (Pfeil) entsprechen der Färbung durch Ethidiumbromid (EtBr), also den kernhaltigen (parasitierten) roten Blutkörperchen (RBC). Das Fenster rechts oben zeigt das Streudiagramm der FL2 gegen das Seitwärtstreulicht. Hier wurden zwei Regionen definiert: Die Region R1 umfasst die nicht parasitierten RBC, die Region R2 beinhaltet die parasitierten RBC. Im Streudiagramm der FL1 vs. FL2 (Fenster unten rechts) teilt ein Kreuz die Population. Es wird zwischen nicht infizierten und infizierten Erythrozyten sowie Zellen mit und ohne gebundene FITC-Antikörper unterschieden. Die infizierten Zellen liegen im linken oberen Quadranten Q1, rechts oben (Q2) liegen infizierte Zellen, welche ebenfalls positiv für eine Antikörperbindung durch einen FITC-gekoppelten Ak sind, und im Quadranten rechts unten (Q4) sind die RBC erkennbar, die nicht infiziert, aber positiv für die Bindung eines FITC-gekoppelten Ak sind. Im Quadranten links unten (Q3) liegen nicht gefärbte Zellen.

Besonders wichtig für die weitere Auswertung ist die Tatsache, dass aufgrund der relativ schwachen Verstärkungen der FL1 und der FL2 des CyFlow® SL blau eine korrekte Kompensation unmöglich war. Bei Betrachtung der doppelt gefärbten Proben fiel auf, dass viel mehr Zellen positiv für EtBr waren, als in jener Kontrolle, die nur einfach mit EtBr gefärbt war. Diese erhöhte Anzahl FL2-positiver RBC kam wahrscheinlich durch Überlappung der Fluoreszenzschemata zustande (siehe Kapitel 4.3.1.1.2.2).

Bei genauerer Betrachtung der doppelt gefärbten Proben fiel auf, dass der Anteil der RBC im linken oberen Quadranten (Q1) (Abbildung 25) der Anzahl der Protein bindenden Zellen im Quadranten Q1 der nur mit EtBr gefärbten Kontrolle entsprach. Aus diesem Grund wurde die positive Fluoreszenz im Quadranten Q2 nur der Anfärbung durch FITC zugeschrieben. In den folgenden Analysen zu Oberflächenveränderungen von RBC wird deshalb bei der Erwähnung des Quadranten Q2 nicht von infizierten Zellen gesprochen.

Wie bei den Untersuchungen auf Hämozoin tragende Leukozyten wurden zunächst die Gruppen I und II zur Hauptgruppe A+, und die Gruppen III und IV zur Hauptgruppe A- zusammengefasst. Wurden signifikante Unterschiede zwischen diesen drei Gruppen erkannt, wurde die Gruppe der Patienten ohne eine schwere Malariaanämie (A-) in die Gruppen III und IV aufgeteilt und dort nach Unterschieden gesucht. In einer weiteren Analyse wurde zusätzlich die Gruppe der Anämiepatienten (A+) in die Gruppen I und II aufgegliedert, und es wurde auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen klinischen Gruppen I bis IV und Ktrl getestet.

In weiteren Analysen wurde getestet, ob signifikante Unterschiede in der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der FL1 zwischen den Gruppen zu finden sind. Die MFI für die FL1 ist auf eine Bindung des FITC-gekoppelten Antikörpers zurückzuführen (Abbildung 25). Ist der FITC-Ak an eine Zelle gebunden, so ist diese – je nach Experiment – positiv für membrangebundenes IgG, IgM oder C3d.

5.3.1.1 Nachweis von IgG auf der Membran von RBC

In diesem Teil der Experimente wurde auf das Vorhandensein von membrangebundenem IgG auf RBC von Kindern mit Malaria getestet und die Verteilung der Anzahl IgG-positiver Erythrozyten auf die unterschiedlichen Patientengruppen ausgewertet. Bei der Analyse der Gesamtheit der RBC (aRBC) sieht man, dass es keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gibt, weder für den Quadranten Q2 (Abbildung 26A-C), noch für den Quadranten Q4 (Abbildung 27A-C) oder die Summe aus beiden (Abbildung 28A-C). Auch durch die Aufgliederung in nicht infizierte und infizierte RBC über die Regionen R1 und R2 mittels Färbung der Zellkerne mit EtBr sind keine Unterschiede zwischen verschiedenen Patientengruppen ersichtlich (Abbildung 26D-F und Abbildung 27D-F).

Anteile IgG-positiver Zellen im Quadranten Q2 (in %)

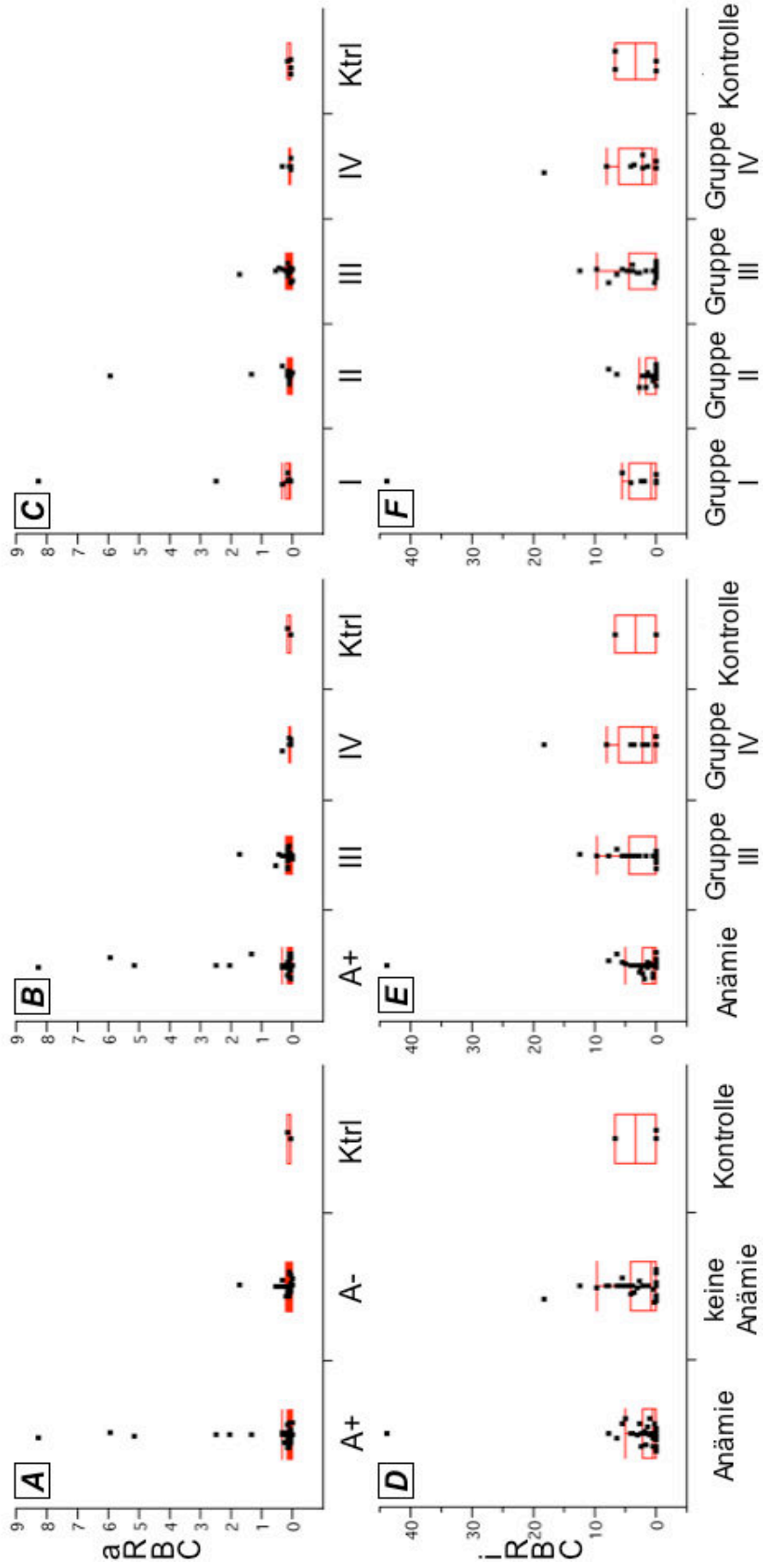


Abbildung 26

Ergebnisse

Abbildung 26 (vorherige Seite): Anteile IgG-positiver Zellen im Quadranten Q2 (in %). Vergleich der Anteile der Zellen, die im Quadranten Q2 positiv für Immunglobulin G (IgG) sind. In der oberen Zeile (Bilder A bis C) werden die Ergebnisse für alle roten Blutkörperchen (aRBC) ohne Unterteilung in nicht infizierte und infizierte Erythrozyten gezeigt, in der unteren Zeile (Bilder D bis F) sind die Ergebnisse für die infizierten roten Blutkörperchen (iRBC) abgebildet. In der linken Spalte (Bilder A und D) werden die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malariapatienten ohne eine schwere Anämie (A-) und die Gruppe der Kontrollen (Ktrl) miteinander verglichen. In der mittleren Spalte (Bilder B und E) ist die Gruppe A- in die Gruppen der Patienten mit schwerer Malaria, aber ohne schwere Anämie (III) und der asymptomatischen Kinder (IV) aufgeteilt. Diese beiden Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. In der Spalte rechts (Bilder C und F) sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV plus Ktrl dargestellt. Es sind bei dieser Analyse keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Abbildung 27 (nächste Seite): Anteile IgG-positiver Zellen im Quadranten Q4 (in %). Dargestellt ist der Vergleich der Anteile der Zellen, die im Quadranten Q4 positiv für Immunglobulin G (IgG) sind. Die Zellen, die im Quadranten Q4 liegen, sind nicht infiziert. In der oberen Zeile (Fenster A bis C) werden die Ergebnisse für alle roten Blutkörperchen (aRBC) gezeigt. In der unteren Zeile (Fenster D bis F) sind die Ergebnisse für die nicht infizierten roten Blutkörperchen (nRBC) abgebildet. In der linken Spalte (Fenster A und D) werden die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malariapatienten ohne eine schwere Anämie (A-) und die Gruppe der Kontrollen (Ktrl) miteinander verglichen. In der mittleren Spalte (Fenster B und E) ist die Gruppe A- in die Gruppen der Patienten mit schwerer Malaria, aber ohne schwere Anämie (III) und die der asymptomatischen Kinder (IV) aufgeteilt. Beide Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. In der Spalte rechts (Fenster D und F) sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV plus Ktrl dargestellt. Es sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Anteile IgG-positiver Zellen im Quadranten Q4 (in %)

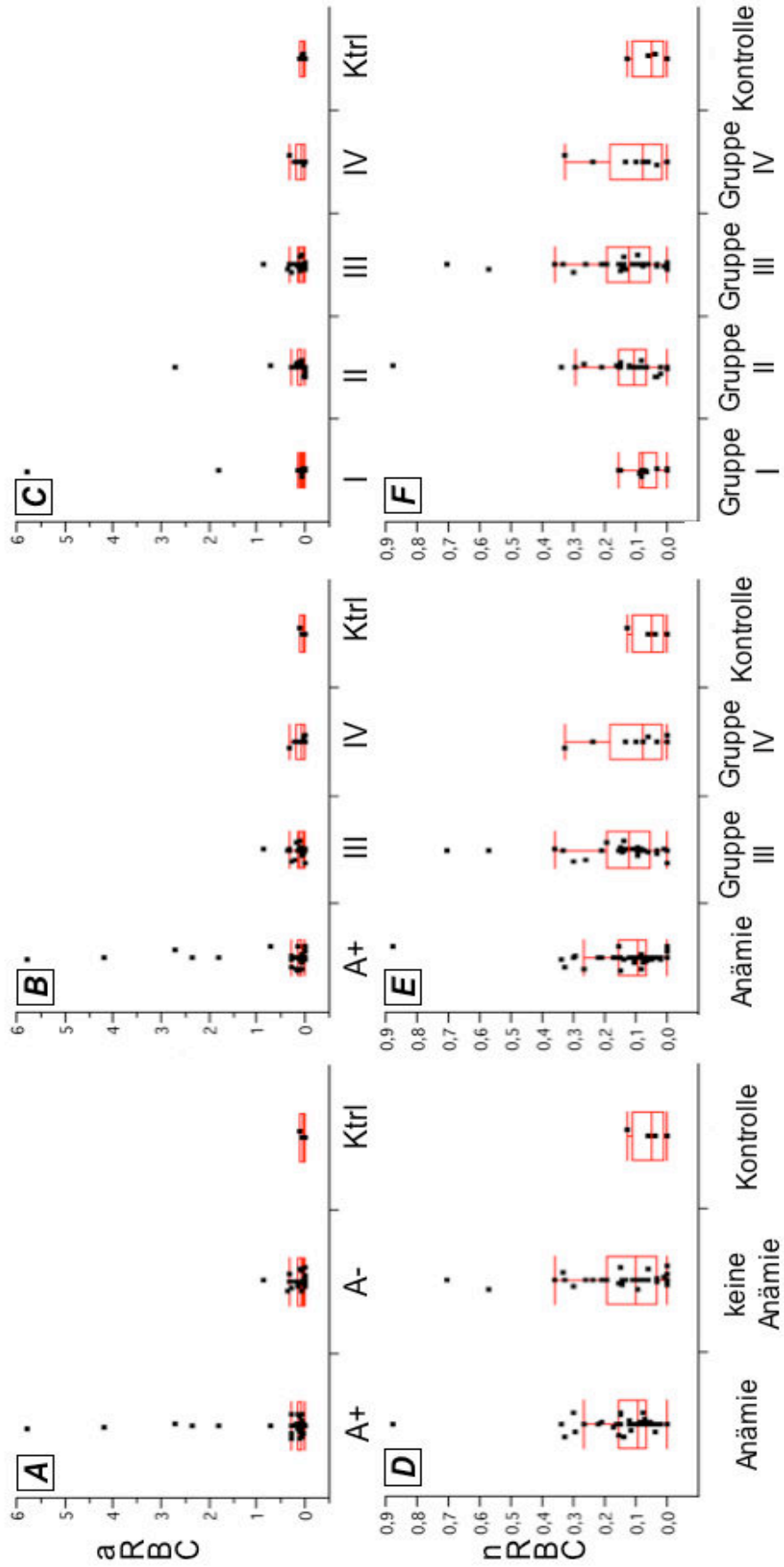


Abbildung 27

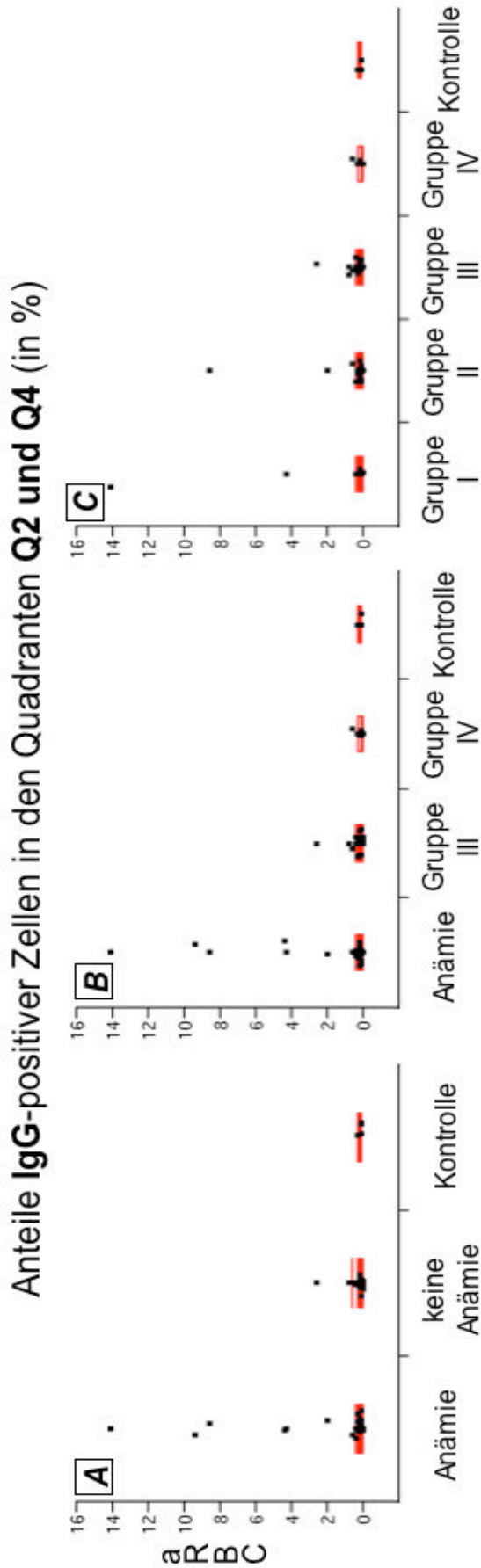


Abbildung 28: Anteile IgG-positiver Zellen in den Quadranten Q2 und Q4 (in %). Dargestellt ist der Vergleich der Anteile der Zellen, die in den Quadranten Q2 und Q4 positiv für Immunglobulin G (IgG) sind. Analysiert wurden die Ergebnisse für alle roten Blutkörperchen (aRBC) ohne Unterteilung in nicht infizierte und infizierte Erythrozyten. Im linken Fenster (Bild A) werden die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malaria-patienten ohne eine schwere Anämie (A-) und die Gruppe der Kontrollen (KtrI) miteinander verglichen. In der Mitte (Bild B) ist die Gruppe A- in die Gruppen der Patienten mit schwerer Malaria, aber ohne schwere Anämie (III) und die der asymptomatischen Kinder (IV) aufgeteilt. Beide Gruppen werden mit den Gruppen A+ und KtrI verglichen. Im Fenster rechts (Bild C) sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV plus KtrI dargestellt. Hier sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

5.3.1.2 Nachweis von IgM auf der Erythrozytenmembran

Bei der Untersuchung einer Bindung von Immunglobulin M (IgM) an die Erythrozytenmembran konnte festgestellt werden, dass IgM - ähnlich wie IgG - nur schwach auf den RBC nachweisbar ist. In den meisten Fällen lag die Anzahl IgM-positiver Zellen unter einem Prozent, dennoch gibt es hier signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

Zunächst wurde die Gesamtheit der RBC (aRBC) ohne Aufgliederung in nicht infizierte und infizierte Erythrozyten analysiert. Dabei wurde getestet, ob es Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit und ohne schwere Anämie (A+ bzw. A-) und der europäischen Kontrollgruppe (Ktrl) für nicht infizierte RBC im Quadranten Q4 gibt (Abbildung 29A). Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Gruppe der Patienten mit schwerer Anämie und der ohne schwere Anämie erkennbar, wobei die Gruppe A+ die höhere Anzahl an Zellen mit gebundenen IgM-Ak auf der Oberfläche aufweist. Im Vergleich der Anämiegruppe A+ mit den Gruppen III und IV weist die Gruppe A+ nur gegenüber der Gruppe IV signifikant höherer Werte für die Anzahl IgM positiver Zellen auf (Abbildung 29B). Teilt man die Hauptgruppe A+ in die klinischen Gruppen I und II auf, so ist erkennbar, dass sich beide Gruppen signifikant von der Gruppe der asymptomatischen Patienten (IV) unterscheiden (Abbildung 29C). Die Gruppe IV hat dabei die niedrigste Anzahl an IgM positiven Zellen.

Bei der Analyse der Zellen, die positiv für IgM sind und im Quadranten Q2 liegen, sieht man, dass sich sowohl die Gruppe der Malariapatienten ohne schwere Anämie (A-), als auch die Kontrollgruppe signifikant von den Anämiepatienten (A+) unterscheiden (Abbildung 30A). Teilt man die Gruppe A- in die Gruppen III und IV auf, so ist erkennbar, dass sich die beiden Gruppen sowohl voneinander, als auch von der Gruppe A+ signifikant unterscheiden (Abbildung 30B). Die höchste Anzahl IgM positiver Zellen ist in der Gruppe A+ zu finden, die geringste in der Gruppe IV. Die Aufteilung der Anämiegruppe in die Gruppen I und II ergibt signifikant erhöhte Werte der Gruppe I im Vergleich zur Gruppe der asymptomatischen Patienten (IV) und der Gruppe der europäischen Kontrollen (Ktrl). Des Weiteren unterscheidet sich die Gruppe II von den Gruppen IV und Ktrl (vgl. Abbildung 30C).

Betrachtet man schließlich für alle RBC (aRBC) die Summe der Werte aus den Quadranten Q2 und Q4 (Abbildung 31A-C), so wird deutlich, dass es bei den gleichen

Ergebnisse

Gruppen signifikante Unterschiede gibt wie bereits ausschließlich im Quadranten Q2 (Abbildung 30A-C).

Abbildung 29 (nächste Seite): Anteile IgM-positiver Zellen im Quadranten Q4 (in %). Alle Zellen, die im Quadranten Q4 liegen, sind nicht infiziert. Dargestellt sind die relativen Anteile der Zellen im Quadranten Q4 als Nachweis für Immunglobulin M (IgM) auf nicht infizierten Zellen in den verschiedenen klinischen Gruppen. In der oberen Zeile (Fenster A bis C) sind die Ergebnisse für die Gesamtheit der RBC (aRBC) zu erkennen. In der unteren Zeile (Fenster D bis F) sind die Ergebnisse für die nicht infizierten RBC (nRBC) abgebildet. In der linken Spalte (Fenster A und D) erfolgte die Aufteilung der Proben in die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malariapatienten ohne schwere Anämie (A-) und in die Kontrollgruppe (Ktrl). In der mittleren Spalte (Fenster B und E) ist die Gruppe A- in die Gruppe der Patienten mit schwerer Malaria, aber ohne eine schwere Anämie (III) und in die Gruppe der asymptomatischen Patienten (IV) gegliedert. Beiden Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. In der Spalte rechts (Fenster C und F) sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV und Ktrl dargestellt. Die Gruppe I ist die Gruppe der Kinder mit einer schweren Malariaanämie, bei der weitere Komplikationen fehlen, und die Gruppe II umfasst Patienten mit schwerer Anämie und weiteren Komplikationen. Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet: Drei Sternchen (***) bedeuten, dass der p-Wert $\leq 0,0005$ liegt, zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen $0,0005$ und $\leq 0,005$, und ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen $0,005$ und $0,05$.

Anteile IgM-positiver Zellen im Quadranten Q4 (in %)

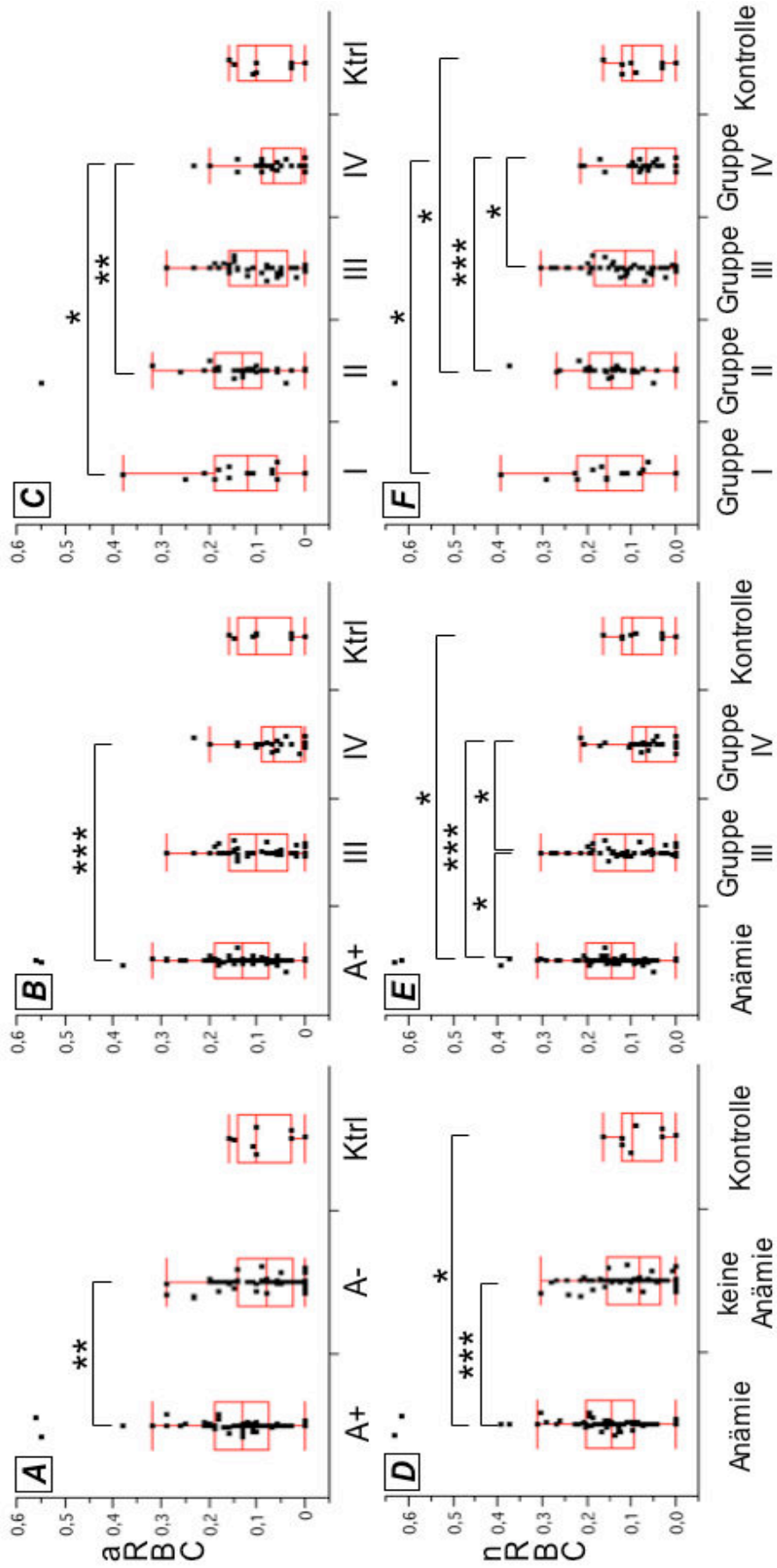


Abbildung 29

Ergebnisse

Bei der Auswertung der nicht infizierten RBC (Region R1, vgl. Abbildung 25) ist erkennbar, dass sich die Anzahl der Zellen im Quadranten Q4 zwischen der Anämiegruppe (A+) und sowohl der Gruppe der Kinder ohne schwere Anämie (A-) als auch der Kontrollgruppe signifikant unterscheidet (Abbildung 29D). Die Gruppe A+ weist den höchsten Anteil an IgM positiven Zellen auf. Der Anteil ist geringer bei der Kontrollgruppe, und die Gruppe A- hat den kleinsten Anteil IgM-positiver Zellen. Beim Vergleich der Gruppe A+ mit den Gruppen III, IV und Ktrl sind signifikante Unterschiede sowie ein Unterschied zwischen den Gruppen A+, III und IV erkennbar (Abbildung 29E). Die Gruppe IV weist dabei die niedrigste Anzahl an Zellen auf, die positiv für eine IgM Bindung sind. Die Anzahl in der Kontrollgruppe liegt etwas höher, und in der Gruppe III ist sie noch etwas größer. Der höchste Anteil ist in der Anämiegruppe (A+) zu finden. Sucht man nun in den klinischen Gruppen I bis IV plus Ktrl nach weiteren Unterschieden, so sind diese zwischen folgenden Gruppen zu finden: I und IV, II und IV sowie II und Ktrl (siehe Abbildung 29F). Dabei sinkt der Anteil der RBC, der IgM gebunden hat, in folgender Reihenfolge (jeweils am Median gemessen): I, II, III, Ktrl, IV.

Des Weiteren wurden die infizierten RBC (definiert mit der Region R2, vgl. Abbildung 25) auf Unterschiede zwischen den klinischen Gruppen geprüft. Allerdings sind hier für den relativen Anteil IgM-positiver Zellen im Quadranten Q2 keine Unterschiede erkennbar (Abbildung 30D-F).

Abbildung 30 (nächste Seite): Anteile IgM-positiver Zellen im Quadranten Q2 (in%). Dargestellt ist die Auswertung der Anteile der Zellen im Quadranten Q2 für den Test auf IgM auf Erythrozyten. In der oberen Zeile sieht man die Ergebnisse für alle roten Blutkörperchen (aRBC) ohne Unterteilung in nicht infizierte und infizierte Erythrozyten. In der unteren Zeile sind die Ergebnisse für die infizierten roten Blutkörperchen (iRBC) abgebildet. In der Spalte links erfolgte die Aufgliederung der Proben in die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malariapatienten ohne eine schwere Anämie (A-) und die Gruppe der Kontrollen (Ktrl). In der mittleren Spalte ist die Gruppe der Patienten ohne Anämie (A-) in die Gruppen III (schwere Malaria ohne schwere Anämie) und IV (asymptomatische Patienten) aufgeteilt, und beide Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. In der Spalte rechts sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV plus Ktrl dargestellt, wobei I die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie ist und II die Gruppe der Kinder mit einer schweren Anämie mit zusätzlichen Komplikationen. Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet: Drei Sternchen (***) bedeuten, dass der p-Wert $\leq 0,0005$ liegt, zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen $0,0005$ und $\leq 0,005$, und ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen $0,005$ und $0,05$.

Anteile IgM-positiver Zellen im Quadranten Q2 (in %)

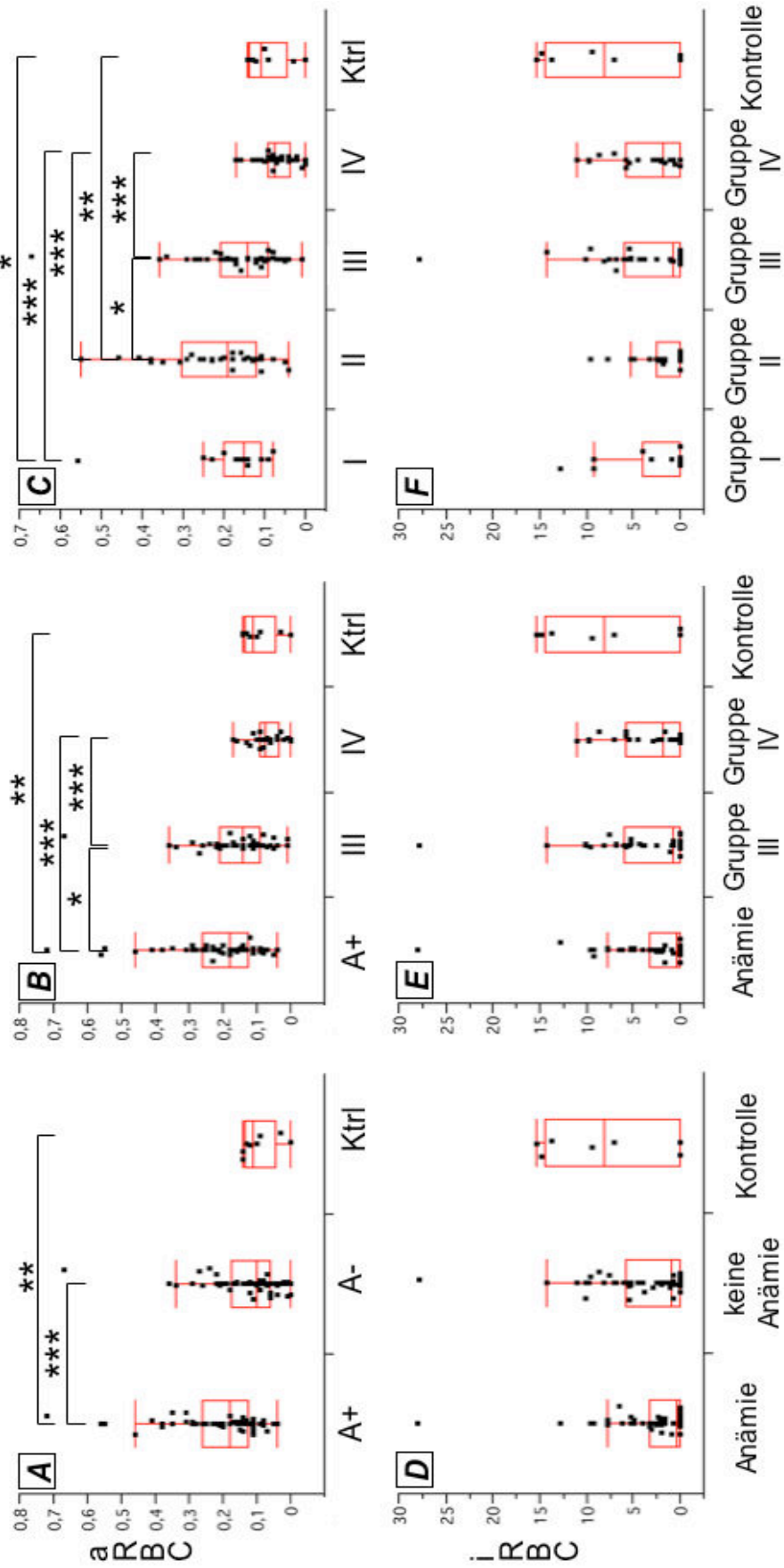


Abbildung 30

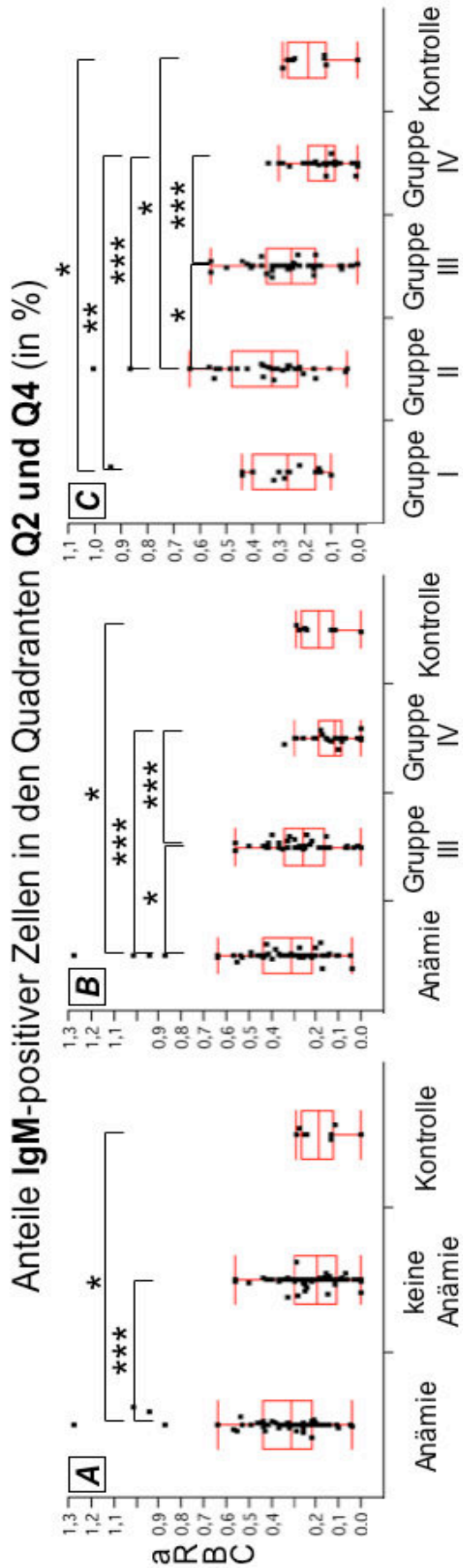


Abbildung 31: Anteile IgM-positiver Zellen in den Quadranten Q2 und Q4 (in%). Dargestellt ist die Auswertung der relativen Anteile der Zellen in den beiden Quadranten Q2 und Q4. Zu sehen sind die Ergebnisse für alle Zellen (aRBC) ohne Unterteilung in nicht infizierte und infizierte rote Blutkörperchen (RBC). Im linken Bild A erfolgte die Aufgliederung der Proben in die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malaria-patienten ohne eine schwere Anämie (A-) und die Gruppe der Kontrollen (Ktrl). Im mittleren Bild B ist die Gruppe der Patienten ohne Anämie (A-) in die Gruppen III (schwere Malaria ohne schwere Anämie) und IV (asymptomatische Patienten) aufgeteilt worden. Beide Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. Im rechten Bild C sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV plus Ktrl dargestellt, wobei I die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie und II die Gruppe der Kinder mit einer schweren Anämie und zusätzlichen Komplikationen darstellt. Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet: Drei Sternchen (***) bedeuten, dass der p-Wert $\leq 0,0005$ liegt, zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen $0,0005$ und $\leq 0,005$, und ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen $0,005$ und $0,05$.

5.3.1.3 Nachweis von C3d auf der Membran von RBC

In diesem Teil der Analyse wurde auf eine Bindung des Komplementproteins C3d an der Erythrozytenoberfläche getestet, welches - wie IgM - vermehrt an der Oberfläche von RBC nachweisbar ist.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Gesamtheit der roten Blutkörperchen (aRBC) ohne Aufgliederung in nicht infizierte und infizierte RBC zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen, sowohl in den Quadranten Q4 und Q2 (vgl. Kapitel 2.3.2.3) als auch in deren Summe. Die Auswertung des Anteils FITC positiver RBC im Quadranten Q4 zeigt Unterschiede zwischen der Gruppe der Anämiepatienten (A+) und den Gruppen A- und der Ktrl auf (Abbildung 32A). Im Vergleich zwischen der Anämiegruppe und den Gruppen III und IV zeigt die Gruppe A+ eine signifikant erhöhte Anzahl an C3d positiven Zellen (Abbildung 32B). Die Analyse der Gruppen I bis IV und Ktrl ergibt, dass sich die beiden Anämiegruppen I und II signifikant von den Gruppen III und IV unterscheiden. Dabei nimmt die Anzahl der Zellen im Quadranten Q4 in folgender Reihenfolge (gemessen am Median) ab: I > II > III > IV (Abbildung 32C).

Die Auswertung der Anzahl der Zellen im Quadranten Q2 ergibt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen A+ und A- (Abbildung 33A). Die Anämiegruppe hat dabei den größten, die Gruppe A- einen geringeren, und die Kontrollgruppe den geringsten Anteil an C3d-positiven Zellen. Gliedert man die Gruppe A- wieder in die Gruppen III und IV auf, so zeigt sich, dass sich beide Gruppen von der Gruppe der Malariapatienten mit einer schweren Anämie (A+) unterscheiden (siehe Abbildung 33B). Bei der Analyse aller klinischen Gruppen (I – IV und Ktrl) im Vergleich sieht man, dass es zwischen folgenden Gruppen signifikante Unterschiede gibt: I und III, II und III sowie II und IV. Die Anzahl C3d positiver Zellen nimmt in folgender Reihenfolge, gemessen am Median, ab: II > I > IV > III > Ktrl (Abbildung 33C).

Des Weiteren wurde für die Gesamtheit der RBC (aRBC) auf Unterschiede in der Anzahl an C3d positiven Zellen in der Summe der Quadranten Q2 und Q4 getestet. Es ist zu erkennen, dass signifikante Unterschiede zwischen jenen Gruppen bestehen, die sich auch signifikant voneinander im Quadranten Q4 unterscheiden (Abbildung 34A-C).

Anteile C3d-positiver Zellen im Quadranten Q4 (in %)

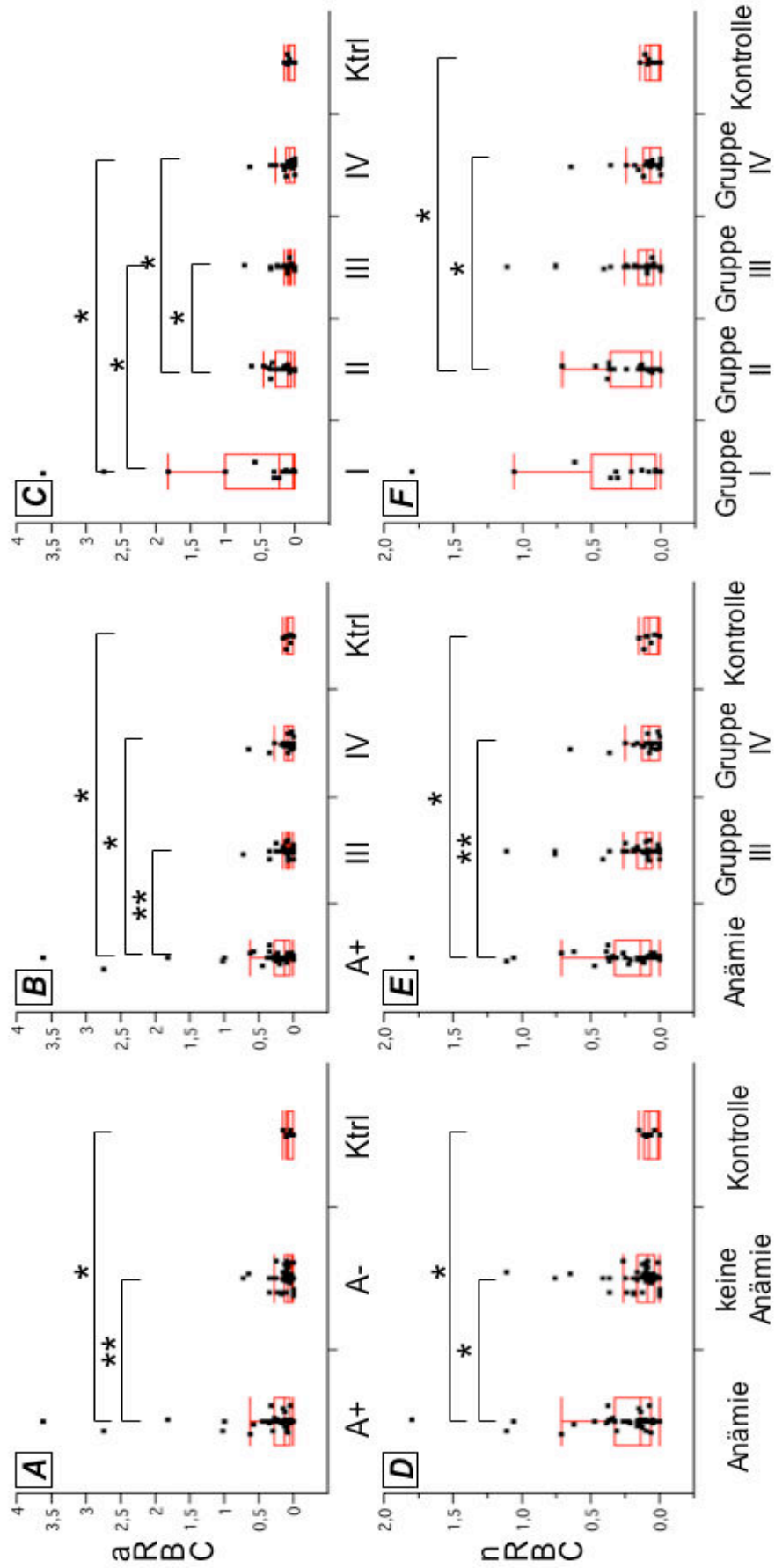


Abbildung 32

Ergebnisse

Abbildung 32 (vorherige Seite): Anteile C3d-positiver Zellen im Quadranten Q4 (in%). Alle Zellen, die im Quadranten Q4 liegen, sind nicht infiziert. In der oberen Zeile (Bilder A bis C) sieht man die Ergebnisse für alle Zellen (aRBC). In der unteren Zeile (Bilder D bis F) sind die Ergebnisse für die nicht infizierten RBC (nRBC) abgebildet. In der Spalte links (Bilder A und D) erfolgte die Aufgliederung der Proben in die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malariapatienten ohne eine schwere Anämie (A-) und die in Kontrollgruppe (Ktrl). In der mittleren Spalte (Bilder B und E) ist die Gruppe A- in die Gruppe der Patienten mit schwerer Malaria, aber ohne eine schwere Anämie (III) und in die Gruppe der asymptomatischen Patienten (IV) aufgeteilt worden. Beide Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. In der Spalte rechts (Bilder C und F) sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV plus Ktrl dargestellt. Die Gruppe I ist die Gruppe der Kinder mit einer schweren Malariaanämie, bei der weitere Komplikationen fehlen. Die Gruppe II umfasst jene Patienten mit schwerer Anämie und zusätzlichen Komplikationen. Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet: Zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen 0,0005 und $\leq 0,005$, und ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen 0,005 und 0,05.

Weiterhin wurden die im Quadranten Q4 liegenden, nicht infizierten roten Blutkörperchen analysiert, die positiv für eine FITC-Färbung gewesen sind. Auch hier ist ein Unterschied zwischen der Anämiegruppe (A+), der Gruppe der Patienten ohne schwere Anämie (A-) und der europäischen Kontrollgruppe (Ktrl) zu erkennen (Abbildung 32D). Teilt man die Gruppe der Patienten ohne Anämie (A-) weiter in die klinischen Gruppen III und IV auf, so ist ein Unterschied zwischen der Anämiegruppe A+ und der Gruppe IV zu erkennen (Abbildung 32E). Gliedert man die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie (A+) weiter in die klinischen Gruppen I und II auf, so ist erkennbar, dass sich die Gruppe II einerseits von der Kontrollgruppe (Ktrl), andererseits von der Gruppe IV signifikant unterscheidet (Abbildung 32F). Die Anzahl der RBC, die positiv für C3d sind, sinkt in folgender Reihenfolge: I > II > III > Ktrl > IV.

Bei der Auswertung der infizierten roten Blutkörperchen (iRBC) sind für den Anteil der Zellen im Quadranten Q2 keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen zu finden (Abbildung 33D-F).

Abbildung 33 (nächste Seite): Anteile C3d-positiver Zellen im Quadranten Q2 (in%). In der oberen Zeile (Fenster A bis C) sieht man die Ergebnisse für alle roten Blutkörperchen (aRBC) ohne Unterteilung in nicht infizierte und infizierte Erythrozyten. In der unteren Zeile (Fenster D bis F) sind die Ergebnisse für die infizierten roten Blutkörperchen (iRBC) abgebildet. In der Spalte links (Fenster A und D) erfolgte die Aufteilung der Proben in die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malariapatienten ohne eine schwere Anämie (A-) und die europäische Kontrollgruppe (Ktrl). In der mittleren Spalte (Fenster B und E) ist die Gruppe der Patienten ohne Anämie (A-) in die Gruppen III (schwere Malaria ohne schwere Anämie) und IV (ohne klinische Symptome einer Malaria) aufgegliedert, und beide Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. In der Spalte rechts (Fenster C und F) sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV sowie Ktrl dargestellt, wobei I die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie und II die Gruppe der Kinder mit einer schweren Anämie mit zusätzlichen Komplikationen darstellt. Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet: Zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen 0,0005 und $\leq 0,005$, ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen 0,005 und 0,05.

Anteile C3d-positiver Zellen im Quadranten Q2 (in %)

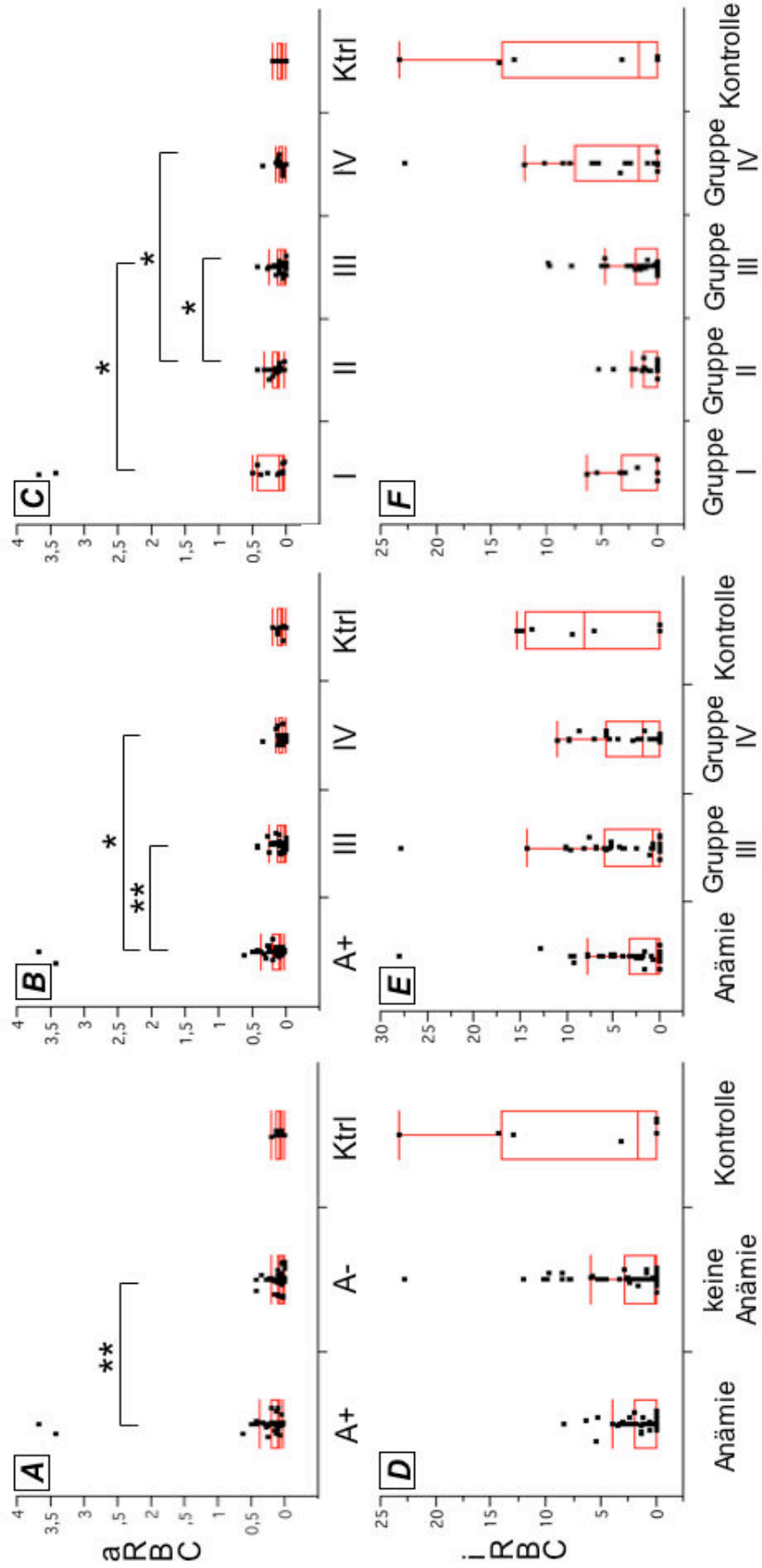


Abbildung 33

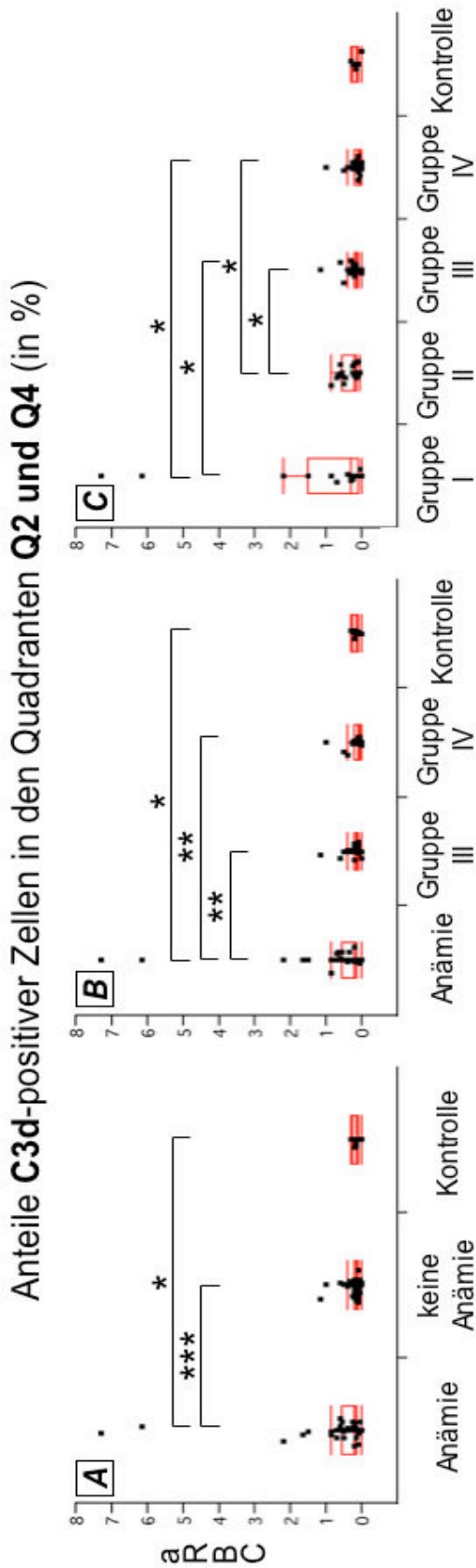


Abbildung 34: Anteile C3d-positiver Zellen in den Quadranten Q2 und Q4 (in%). Auswertung der Summe der Zellen in den Quadranten Q2 und Q4. Dargestellt sind die Ergebnisse für alle Zellen (aRBC) ohne Unterteilung in nicht infizierte und infizierte rote Blutkörperchen (RBC). Im linken Bild A erfolgte die Aufgliederung der Proben in die Gruppe der Anämiepatienten, die Gruppe der Malaria-patienten ohne eine schwere Anämie und die Gruppe der Kontrollen. Im mittleren Bild B ist die Gruppe der Patienten ohne Anämie in die Gruppen III (schwere Malaria ohne schwere Anämie) und IV (asymptomatische Patienten) aufgeteilt, und beide Gruppen werden mit der Gruppe der Anämiepatienten und der Kontrollgruppe verglichen. Im rechten Bild C sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV plus Kontrollgruppe dargestellt, wobei I die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie und II die Gruppe der Kinder mit schwerer Anämie und zusätzlichen Komplikationen darstellt. Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet. Drei Sternchen (***) bedeuten, dass der p-Wert $\leq 0,0005$ liegt. Zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen $0,0005$ und $\leq 0,005$, und ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen $0,005$ und $0,05$.

5.3.1.4 Korrelation von Antikörper- und Komplement-positiven Zellen

Vergleicht man das Vorkommen von IgG-, IgM- und C3d-positiven Zellen untereinander, so finden sich Korrelationen zwischen IgG und C3d für die Gesamtheit der Erythrozyten und für infizierte RBC. Der Korrelationskoeffizient r liegt bei der Analyse für aRBC zwischen 0,35 und 0,608 und für infizierte RBC zwischen 0,35 und 0,609. Daraus kann man schließen, dass mit der Präsenz des Komplementfaktors C3d auf Erythrozyten die Wahrscheinlichkeit steigt, dass auch Immunglobulin G auf diesen Zellen gebunden ist.

5.3.2 Unterschiede der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI)

Bei dieser Auswertung wurde eine mögliche Verschiebung der gesamten Erythrozytenpopulation in der Fluoreszenz 1 analysiert, die auf eine Bindung des tertiären, FITC-gekoppelten Ak zurückzuführen ist.

5.3.2.1 MFI beim Nachweis von membrangebundenem IgG

Zunächst wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der FL1 für die Proben des IgG-Tests ausgewertet. Eine erhöhte MFI kommt durch Bindung des FITC-gekoppelten Antikörpers an membrangebundenes IgG auf RBC zustande. Der Vergleich der MFI der Gesamtheit der RBC (aRBC) zeigte signifikant niedrigere Werte der MFI der Kontrollgruppe im Vergleich zu den beiden Patientengruppen A+ und A- (Abbildung 35A). Teilt man die Patienten ohne schwere Anämie in die Gruppen III und IV auf, so sieht man, dass sich weiterhin die Gruppe III mit signifikant höheren MFI-Werten von der Kontrollgruppe unterscheidet (Abbildung 35B). Bei der weiteren Aufteilung der Gruppe A+ in die Gruppen I und II ergibt sich, dass die klinischen Gruppen I und II sich signifikant von der Kontrollgruppe mit den niedrigsten Werten unterscheiden (Abbildung 35C). Die Gruppe I zeigt dabei niedrigere Werte für die MFI als die Gruppe II. Diese Unterschiede sind jedoch relativ schwach signifikant.

Die Analyse der MFI für die nicht infizierten Zellen (nRBC) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen (Abbildung 35D-F), ebenso wenig wie die Analyse der MFI für die infizierten Zellen (iRBC) (vgl. Abbildung 35G-I).

Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für IgG

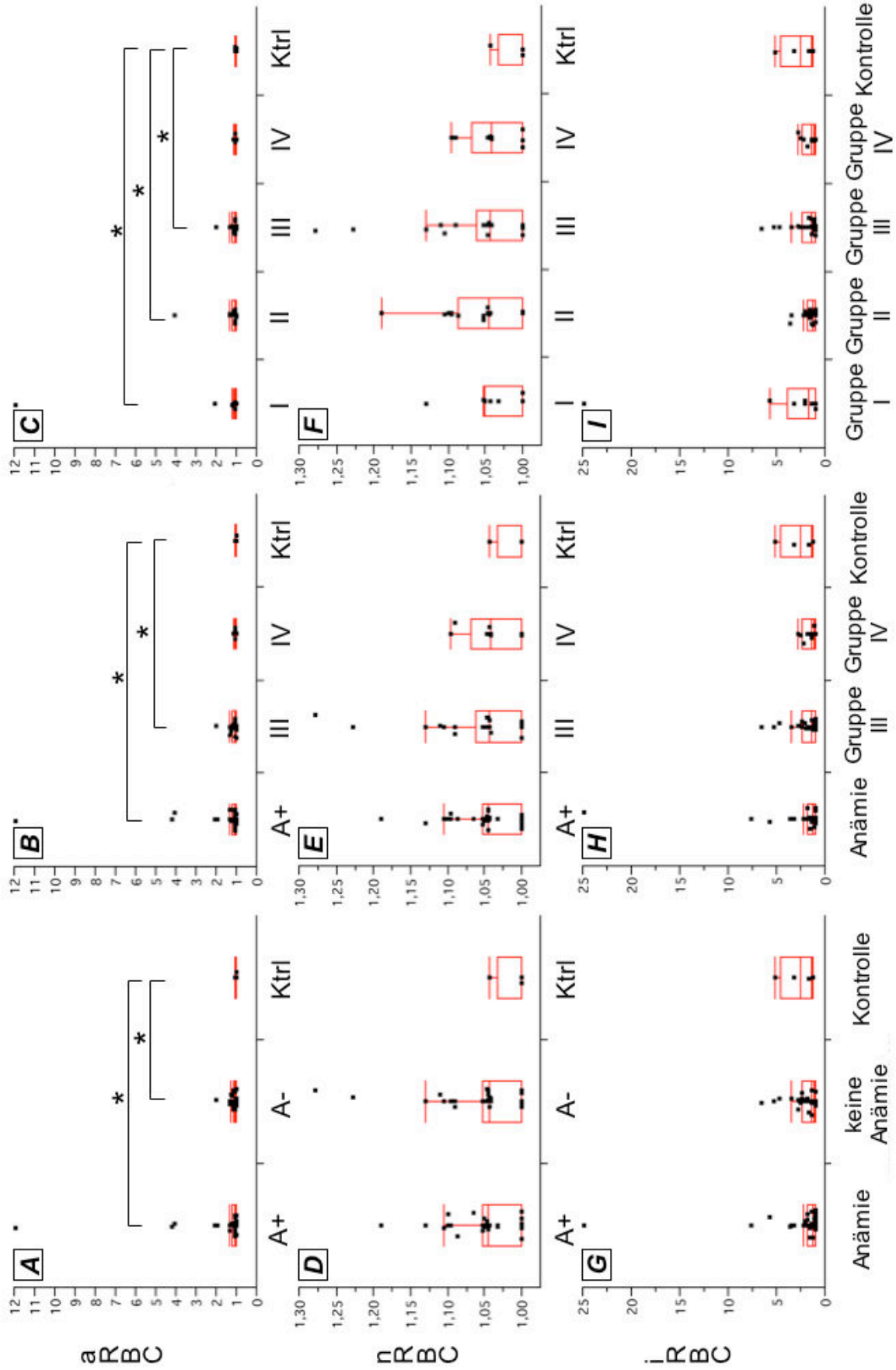


Abbildung 35

Abbildung 35 (vorherige Seite): Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität für gebundenes Immunglobulin G. In der oberen Zeile (Bilder A bis C) sind die Ergebnisse für alle roten Blutkörperchen (aRBC) ohne Unterteilung in nicht infizierte und infizierte Erythrozyten, in der mittleren Zeile (Bilder D bis E) die Ergebnisse der nicht infizierten RBC (nRBC) und in der unteren Zeile (Bilder G bis I) sind die Ergebnisse für die infizierten roten Blutkörperchen (iRBC) abgebildet. In der linken Spalte (Bilder A, D und G) erfolgte die Aufteilung der Proben in die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malariapatienten ohne eine schwere Anämie (A-) und die Gruppe der Kontrollen (Ktrl). In der mittleren Spalte (Bilder B, E und H) ist die Gruppe der Patienten ohne Anämie (A-) in die Gruppen III (schwere Malaria ohne schwere Anämie) und IV (keine klinischen Symptome einer Malaria) aufgegliedert. Beide Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. In der rechten Spalte (Bilder C, F und I) sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV sowie Ktrl dargestellt, wobei I die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie und II die Gruppe der Kinder mit einer schweren Anämie mit zusätzlichen Komplikationen darstellt. Die vorhandenen Signifikanzen sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet, das für Unterschiede mit p-Werten zwischen 0,005 und 0,05 steht.

5.3.2.2 MFI beim Nachweis von membrangebundenem IgM

Die mittlere Fluoreszenzintensität der Proben für den IgM-Nachweis auf Erythrozyten wurde zunächst für alle RBC (aRBC) ohne die Aufgliederung in nicht infizierte und infizierte Zellen analysiert. Es ist erkennbar, dass sich die beiden Patientengruppen A+ und A- von der Kontrollgruppe signifikant unterscheiden (Abbildung 36A). Gliedert man die Gruppe A- in die Gruppen III und IV auf, so findet man, dass die Gruppe III signifikant höhere MFI-Werte aufweist als die Gruppen IV und Ktrl (Abbildung 36B). Teilt man die Gruppe A+ weiter in die einzelnen Gruppen I und II auf, so ist zu erkennen, dass sich die Gruppe der europäischen Kontrollen signifikant von der Gruppe II unterscheidet. Ebenso unterscheiden sich die Gruppen I und IV signifikant in der Höhe des MFI-Wertes voneinander (Abbildung 36C). Die Höhe der MFI (gemessen am Median) sinkt hier in folgender Reihenfolge: II > I = III > IV > Ktrl.

Die Analyse der Verschiebung der MFI für die nicht infizierten Zellen (nRBC) ergab keine Unterschiede (Abbildung 36D-F).

Die MFI der infizierten RBC unterscheiden sich beim Vergleich zwischen der Gruppe A+ und der Kontrollgruppe (Abbildung 36G); bei einer Aufgliederung in die klinischen Gruppen I bis IV sind jedoch keine zusätzlichen Unterschiede erkennbar (Abbildung 36H und I).

Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für IgM

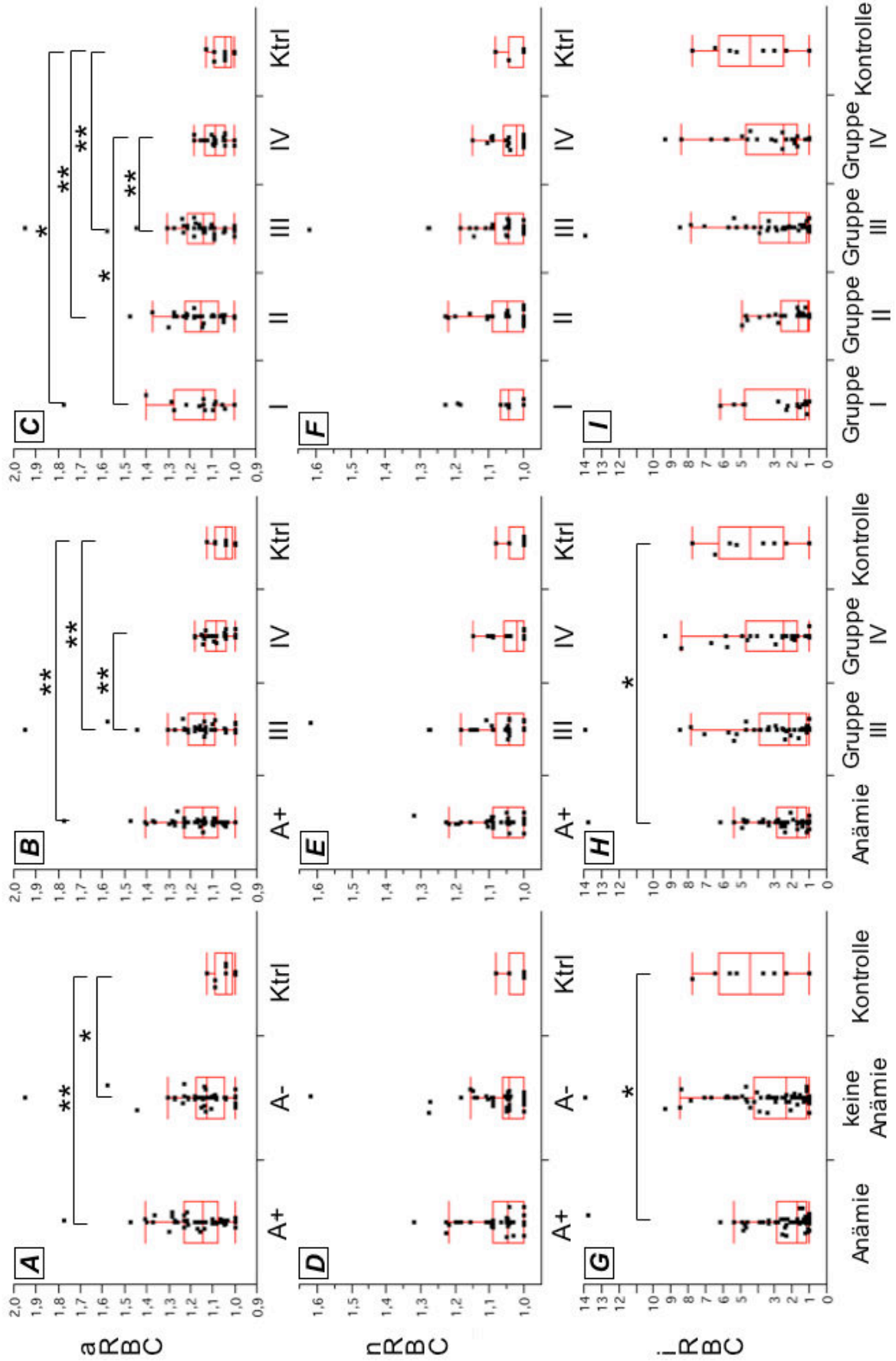


Abbildung 36

Abbildung 36 (vorherige Seite): Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität beim Nachweis einer Bindung von IgM an Erythrozyten. In der oberen Zeile (Fenster A bis C) sind die Ergebnisse für alle roten Blutkörperchen (aRBC) ohne Unterteilung in nicht infizierte und infizierte Erythrozyten dargestellt. In der mittleren Zeile (Fenster D bis F) sind die Ergebnisse der nicht infizierten RBC (nRBC) und in der unteren Zeile (Fenster G bis I) sind die Ergebnisse der infizierten roten Blutkörperchen (iRBC) abgebildet. In der Spalte links (Fenster A, D und G) erfolgte die Aufteilung der Proben in die Gruppe der Anämiepatienten (A+), die Gruppe der Malariapatienten ohne eine schwere Anämie (A-) und die Gruppe der Kontrollen (Ktrl). In der mittleren Spalte (Fenster B, E und H) ist die Gruppe der Patienten ohne Anämie (A-) in die Gruppen III (schwere Malaria ohne schwere Anämie) und IV (ohne klinische Symptome einer Malaria) aufgegliedert. Beide Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. In der rechten Spalte (Fenster C, F und I) sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV sowie Ktrl dargestellt, wobei I die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie und II die Gruppe der Kinder mit einer schweren Anämie mit zusätzlichen Komplikationen ist. Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet: Zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen 0,0005 und $\leq 0,005$; ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen 0,005 und 0,05.

5.3.2.3 MFI beim Nachweis von membrangebundenem C3d

Die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität der FL1 im Test zum Nachweis von C3d an der Erythrozytenoberfläche für alle RBC ergab, dass sich die beiden Patientengruppen A+ und A- signifikant voneinander unterscheiden (Abbildung 37A). Bei der Aufteilung der Gruppe A- in die Gruppen III und IV ist erkennbar, dass sich die Anämiegruppe A+ von der Gruppe IV unterscheidet (Abbildung 37B). Teilt man die Gruppe A+ weiter in die klinischen Gruppen I und II auf, so sieht man, dass darüber hinaus beide Gruppen I und II signifikant erhöhte MFI-Werte im Vergleich zur Gruppe IV aufweisen (Abbildung 37C). Die MFI sinkt dabei, gemessen am Median, in dieser Reihenfolge: I = II > III > IV > Ktrl.

Abbildung 37 (nächste Seite): Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität zum Nachweis von C3d auf Erythrozyten. In der oberen Zeile (Bilder A bis C) sind die Ergebnisse für alle roten Blutkörperchen (aRBC) ohne Unterteilung in nicht infizierte und infizierte Erythrozyten, in der mittleren Zeile (Bilder D bis F) die Ergebnisse der nicht infizierten RBC (nRBC) und in der unteren Zeile (Bilder G bis I) sind die Ergebnisse für die infizierten roten Blutkörperchen (iRBC) abgebildet. In der linken Spalte (Bilder A, D und G) erfolgte die Aufteilung der Proben in die Gruppe der Anämiepatienten (A+), in die Gruppe der Malariapatienten ohne eine schwere Anämie (A-) und in die Gruppe der Kontrollen (Ktrl). In der mittleren Spalte (Bilder B, E und H) ist die Gruppe der Patienten ohne Anämie (A-) in die Gruppen III (schwere Malaria ohne schwere Anämie) und IV (ohne klinische Symptome einer Malaria) aufgegliedert. Beide Gruppen werden mit den Gruppen A+ und Ktrl verglichen. In der Spalte rechts (Bilder C, F und I) sind die Ergebnisse für die klinischen Gruppen I bis IV sowie Ktrl dargestellt, wobei I die Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie und II die Gruppe der Kinder mit einer schweren Anämie mit zusätzlichen Komplikationen darstellt. Vorhandene Signifikanzen sind mit Sternchen gekennzeichnet: Drei Sternchen (***) bedeuten, dass der p-Wert $\leq 0,0005$ ist, zwei Sternchen (**) kennzeichnen Signifikanzen mit einem p-Wert zwischen 0,0005 und $\leq 0,005$, und ein Sternchen (*) steht für signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen 0,005 und 0,05.

Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für C3d

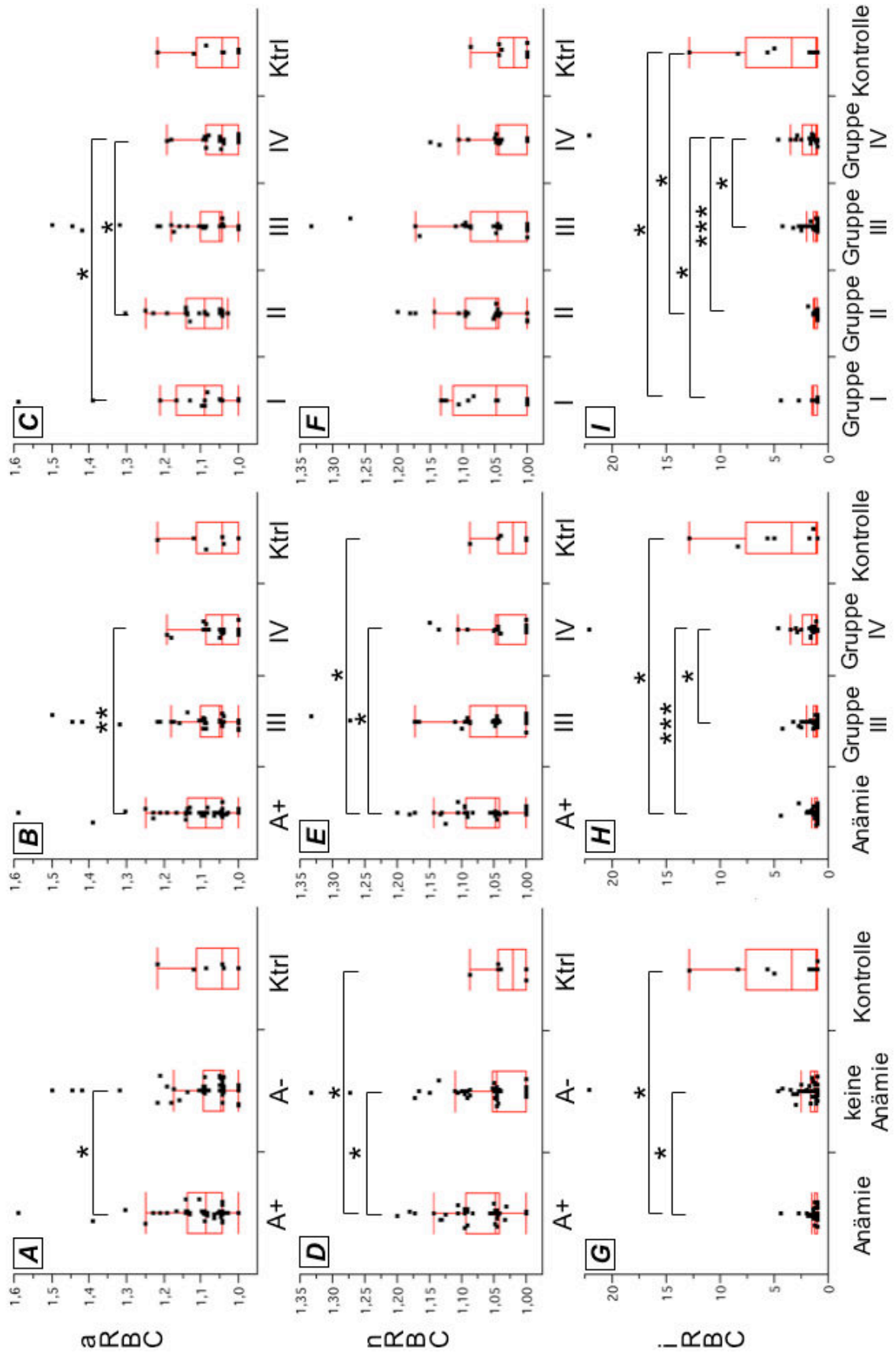


Abbildung 37

Betrachtet man in der weiteren Analyse die nicht infizierten RBC, so wird offenbar, dass sich sowohl die Kontrollgruppe als auch die Gruppe A- von der Gruppe A+ unterscheiden. Dabei weist die Gruppe der Anämiepatienten die höchste und die Gruppe Ktrl die niedrigste MFI auf (Abbildung 37D). Bei der Aufteilung der Gruppe A- in die Gruppen III und IV ist zu erkennen, dass sich die Gruppe IV von der Gruppe A+ signifikant unterscheidet (Abbildung 37E). Am höchsten ist die MFI beim Test auf membrangebundenes C3d in der Gruppe A+, gefolgt von den Gruppen III, IV und der Kontrollgruppe mit der niedrigsten MFI. Bei der Aufgliederung in die klinischen Gruppen I bis IV und Ktrl sind keinerlei signifikante Unterschiede erkennbar (Abbildung 37F).

Die Analyse der infizierten RBC ergab, dass sich sowohl die Kontrollgruppe der Europäer als auch die Gruppe der Patienten ohne eine schwere Anämie (A-) von der Gruppe der Patienten mit einer schweren Anämie (A+) unterscheiden. Dabei hat die Gruppe A+ die niedrigste MFI (Abbildung 37G). Nach der Aufgliederung der Gruppe A- in die klinischen Gruppen III und IV ist zu erkennen, dass die Gruppe IV im Vergleich zu den Gruppen III und A+ signifikant erhöhte MFI-Werte zeigt (Abbildung 37H). Der Vergleich der klinischen Gruppen I bis IV plus Kontrollgruppe zeigt, dass sich die beiden Anämiegruppen I und II sowohl von der Gruppe IV als auch von der Kontrollgruppe signifikant unterscheiden (Abbildung 37I).

5.3.2.4 Korrelationen der mittleren Fluoreszenzintensitäten für IgG, IgM oder C3d

Beim Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten fällt auf, dass es hier lediglich zwei positive Korrelationen gibt. So korrelieren bei den nicht infizierten roten Blutkörperchen (nRBC) die MFI bei IgG und C3d (Korrelationskoeffizient $r = 0,446$, $r^2=0,199$, $p<0,0001$). Bei den infizierten Zellen korrelieren die MFI beim Test auf IgG und IgM ($r = 0,42$, $r^2=0,177$, $p<0,0001$).

5.3.3 Auffällige Patienten

Bei den Analysen zu Oberflächenveränderungen von roten Blutkörperchen lagen die Werte bei einigen Patienten deutlich höher als bei den Übrigen. Zehn Patienten zeigten in den insgesamt vierundzwanzig Analysen zu Veränderungen der Erythrozytenoberfläche in wenigstens vier Analysen erhöhte Werte. Sieben dieser Patienten gehören der Anämiegruppe (A+) an, wobei sich zwei nicht eindeutig den Gruppen I oder II (vgl. Kapitel 5) zuordnen lassen. Drei dieser sieben Patienten lassen sich in die

Gruppe I und zwei in die Gruppe II einsortieren. Die drei übrigen Patienten gehören der Gruppe III an. Alle zehn Kinder leiden an einer schweren Malaria. Betrachtet man die hämatologischen Werte dieser Patienten, so fällt auf, dass nur die Leukozytenwerte von neun der zehn Patienten über $8,5 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ liegen. Weitere gemeinsame Auffälligkeiten im Blutbild sind nicht erkennbar.

Von sieben dieser zehn Kinder ist der Ausgang dieser Malariaerkrankung bekannt. Sechs Kinder überlebten, während eines starb. Das Kind, das diese Malariainfektion nicht überlebte, litt an einer schweren zerebralen Malaria (Blantyre coma score = 1), jedoch nicht an einer schweren Malariaanämie (Hb-Wert = 9,8 g/dL). Es zeigte in drei Tests eine erhöhte IgG-Bindung an die RBC-Membran.

Bemerkenswert ist auch, dass zwei der Patienten, die eine erhöhte Anzahl Hämozoin tragender Leukozyten aufwiesen, ebenfalls in den Analysen zu Membranveränderungen von Erythrozyten auffallen. Diese beiden Kinder sind dort bereits in drei von sechs Analysen zum Vorkommen von PCL aufgefallen. Der dritte Patient, der dort in fünf Analysen erhöhte Werte gezeigt hat, zeigt jedoch in diesen Analysen nur einmal einen höheren Wert als andere Patienten.

5.3.4 Vergleich der unterschiedlichen Auswertungsmethoden (Mittlere Fluoreszenzintensität versus prozentuale Anteile)

Die Analyse der prozentualen Anteile an gefärbten Zellen ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu Oberflächenveränderungen auf RBC aussagekräftiger als die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität, denn eine deutliche Verschiebung der gesamten Zellpopulation ist seltener zu beobachten als einzelne, FITC-positive Zellen.

Man erhält durch unterschiedliche Auswertungsmethoden auch unterschiedliche Resultate. So ist z.B. für die Bindung von IgG an der RBC Membran festzustellen, dass in der Analyse der Anzahl IgG positiver Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen bestehen. Dagegen sind bei Betrachtung der MFI einige Unterschiede erkennbar. Diese Unterschiede sind allerdings nur schwach signifikant. Sie sind auch nur für die Gesamtheit der RBC zu finden; bei der Aufteilung in nicht infizierte und infizierte RBC bestehen auch hier keine signifikant erhöhten oder erniedrigten Werte einzelner Gruppen.

5.4 Einfluss der Malaria auf die Nachweisbarkeit von Membranrezeptoren von Erythrozyten an den Beispielen von Glykophorin A und C

Verschiedene *P. falciparum*-Antigene binden an Oberflächenmoleküle von RBC. So bindet EBA-175 an Glykophorin A (GPA) und EBA-140 an Glykophorin C (GPC). Frau Nancy Gerloff hat in ihrer Diplomarbeit am Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin gezeigt, dass die Bindung eines spezifischen Antikörpers gegen GPA eingeschränkt ist, wenn die verwendeten RBC zuvor mit *P. falciparum*-Antigenen vorbehandelt wurden (75). Bei den Patienten der Anämie studie wurde daher mit Frau Gerloff zusammen auch auf die Nachweisbarkeit von GPA und GPC getestet. Da darauf jedoch nicht das Hauptaugenmerk dieser Arbeit gelegen hat, sind diese Ergebnisse in diesem Zusammenhang lediglich beispielhaft dargestellt worden.

Zum Nachweis von GPA wurde ein FITC-markierter Ak verwendet. Bei einer Reihe von Patienten der Anämie studie war die Bindung des spezifischen Ak gegen GPA im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abbildung 38A) vermindert. Dies zeigt sich an einer Schulter des Peaks im Histogrammfenster der Fluoreszenz 1 (FL1) (Abbildung 38B).

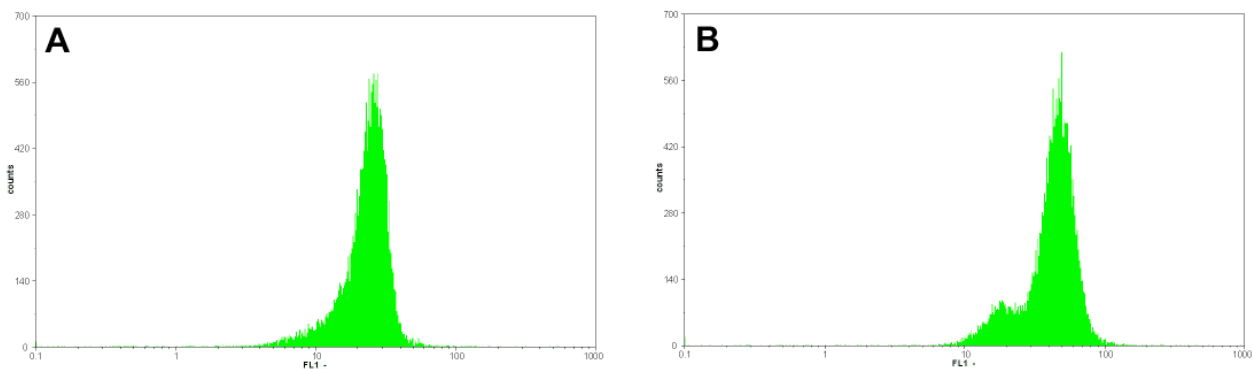


Abbildung 38: Nachweis von Glykophorin A. A) Im linken Bild ist die Färbung von Glykophorin A durch einen FITC-markierten Antikörper (Ak) einer gesunden europäischen Kontrolle abgebildet. Im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle (nicht dargestellt) ist der Peak deutlich nach rechts verschoben. B) Diese Probe stammt von einem Patienten mit schwerer Malaria. Man kann an der Schulter links des Peaks erkennen, dass bei einem Teil der Zellen die Bindung des Ak vermindert war.

Des Weiteren wurde auf Glykophorin C (GPC) getestet. Auch hier ist zu erkennen, dass im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abbildung 39A) bei Malariapatienten (Abbildung 39B) die Bindung des Antikörpers vermindert ist. Während bei der Kontrolle der Peak breit gestreut ist und auch eine Reihe von Zellen eine sehr hohe Fluoreszenz-

Ergebnisse

intensität aufweist, ist beim Malariapatienten der Peak schmaler. Zudem bildet sich an der linken Seite ein Peak mit einer geringeren Fluoreszenzintensität heraus, was eine geringere Bindung des Anti-GPC-Ak bedeutet.

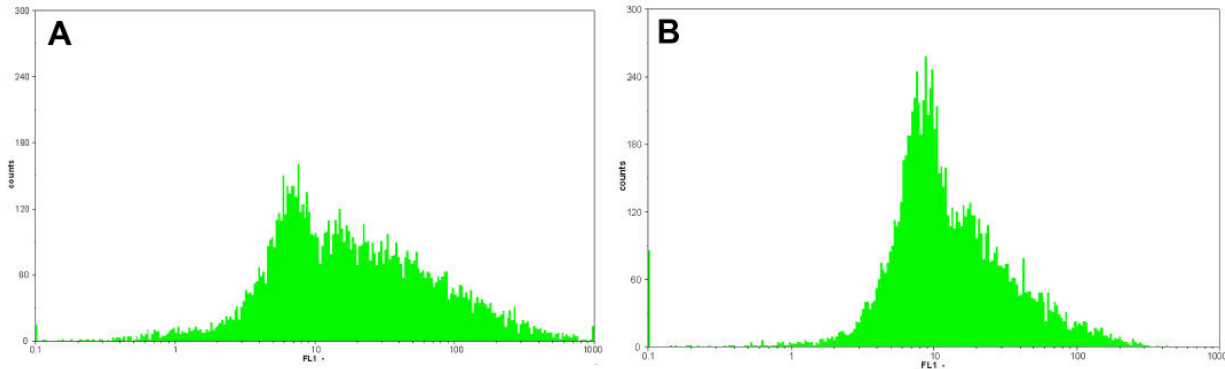


Abbildung 39: Nachweis von Glykophorin C. A) Die gesunde Kontrolle zeigt eine breite Streuung des Peaks. B) Beim Malariapatienten hebt sich an der linken Seite der Verteilung ein Peak mit einer verminderten Fluoreszenzintensität ab, was auf eine verminderte Bindung des spezifischen Antikörpers gegen Glykophorin C schließen lässt.

In Abbildung 38 und Abbildung 39 sind jeweils dieselben Studienteilnehmer dargestellt.

5.5 Interaktion von *P. falciparum* Glykosylphosphatidylinositol (*P.f.*-GPI) mit der Erythrozytenmembran

In unabhängigen Experimenten wurde eine mögliche Interaktion des Malariatoxins *P.f.*-GPI mit nicht infizierten, naiven Erythrozyten, und eine Erkennung durch Serumantikörper von Malariapatienten untersucht.

5.5.1 Interaktion von *P.f.*-GPI-Molekülen mit der Membran von nicht infizierten Erythrozyten und deren Erkennung durch Serumantikörper von Malariapatienten

Nach Exposition der Erythrozyten von gesunden Spendern der Blutgruppe 0/ Rhesus negativ mit chemisch synthetisiertem *P.f.*-GPI wurden die Erythrozyten entweder mit dem Serum eines erwachsenen Patienten mit akuter schwerer Malaria, mit Serum von Kindern mit Malaria aus einem Malariaendemiegebiet, mit einem Immunsersumgemisch von nicht akut erkrankten Spendern aus einem Endemiegebiet oder mit Serum von gesunden europäischen Spendern (Kontrollserum, KS) inkubiert.

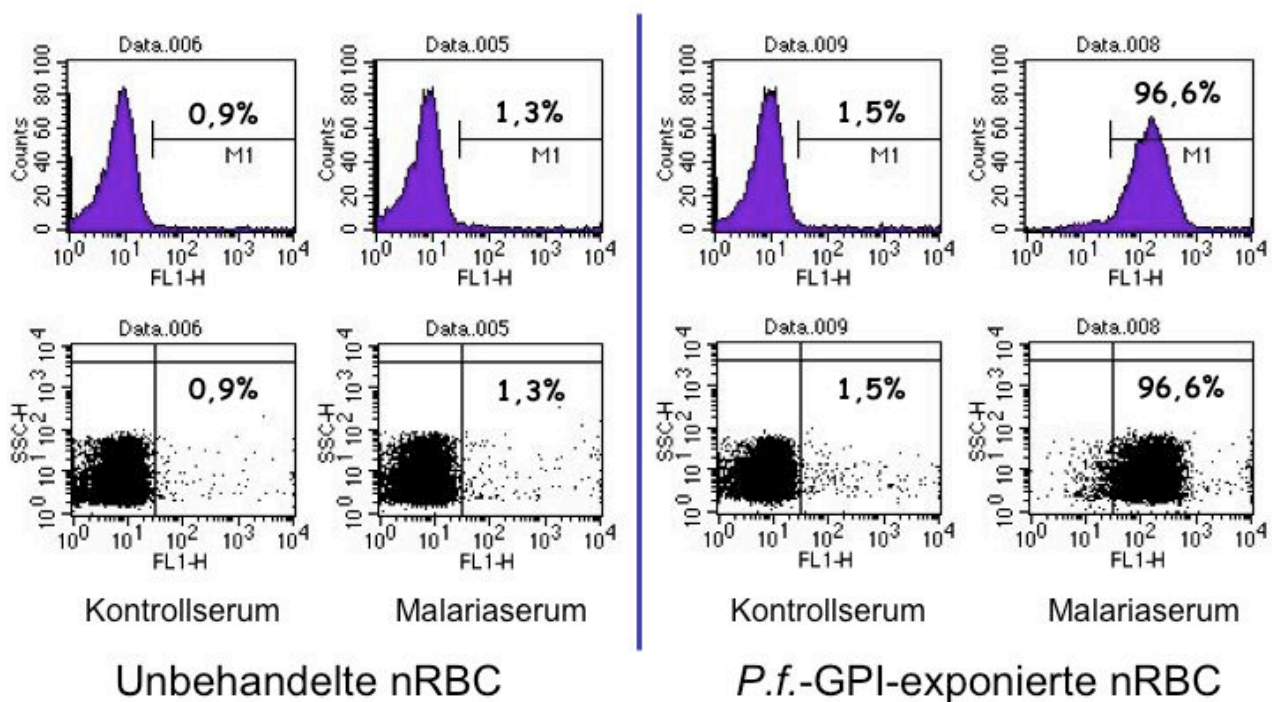


Abbildung 40

Abbildung 40 (vorherige Seite): Erkennung von *P.f.*-GPI durch Antikörper im Serum des Patienten mit akuter schwerer Malaria. In der oberen Reihe sind die Fluoreszenzintensitäten der Fluoreszenz 1 als Histogramm abgebildet, in der unteren Reihe sieht man dieselben Ergebnisse zusammen mit dem Seitwärtsstreulicht als Streudiagramm. Eine erhöhte Fluoreszenzintensität der FL1 kommt durch Bindung des FITC-gekoppelten Antikörpers an Erythrozyten zustande. Die linken 4 Bilder zeigen die Ergebnisse von unbehandelten Zellen. In den vier rechten Bildern sieht man die Ergebnisse von RBC, die mit *P.f.*-GPI vorbehandelt wurden. Die zwei linken von den vier Bildern stellen jeweils die Resultate der Exposition der mit Kontrollserum behandelten Zellen, die zwei rechten die mit Malariaserum behandelten Zellen dar. Eine Erkennung erfolgte nur dann, wenn die Zellen mit *P.f.*-GPI inkubiert wurden und anschließend das Serum eines Malariapatienten zugegeben wurde.

Das Serum des Patienten mit schwerer akuter Malaria reagierte stark mit den *P.f.*-GPI-sensibilisierten nRBC. Diese Erkennung von *P.f.*-GPI durch Antikörper blieb bei Verwendung von KS aus. Die sekundären, FITC-gekoppelten Antikörper banden weder an Zellen, die nicht mit *P.f.*-GPI vorbehandelt wurden, noch in Abwesenheit von Patientenserum (Abbildung 40).

5.5.2 Die Erkennung des *P.f.*-GPI durch IgG- und IgM-Antikörper im Verlauf der Infektion

Bei den vorangegangenen Experimenten wurde in den Tests die Bindung von IgG- und IgM-Antikörpern (Ak) im Patientenserum an RBC untersucht. Um herauszufinden, auf welchen Antikörperisotyp die Immunantwort zurückzuführen ist, wurde im Folgenden auf IgG- und IgM-Ak in separaten Proben geprüft. Dazu wurden die Serumproben des Patienten mit schwerer akuter Malaria, die zu unterschiedlichen Zeiten der Infektion abgenommen wurden, und die Seren von Kindern mit schwerer, komplizierter Malaria verwendet.

Hier stellte sich heraus, dass bei dem Patienten mit schwerer akuter Malaria die Erkennung am Tag 1 primär durch IgM-Antikörper und zu einem geringeren Teil durch Immunglobulin G vermittelt worden ist (Abbildung 41). Über 80% der Zellen zeigten eine Anti-IgM-Antikörperbindung, bei IgG waren es über 19%. Im Verlauf der akuten Infektion nimmt die IgM Erkennung deutlich ab, sie sinkt bis auf 2,31% ab, während die Erkennung durch IgG-Ak über die ersten Tage mit ca. 19% zunächst stabil bleibt und erst später (Tag 23) auf 26% ansteigt.

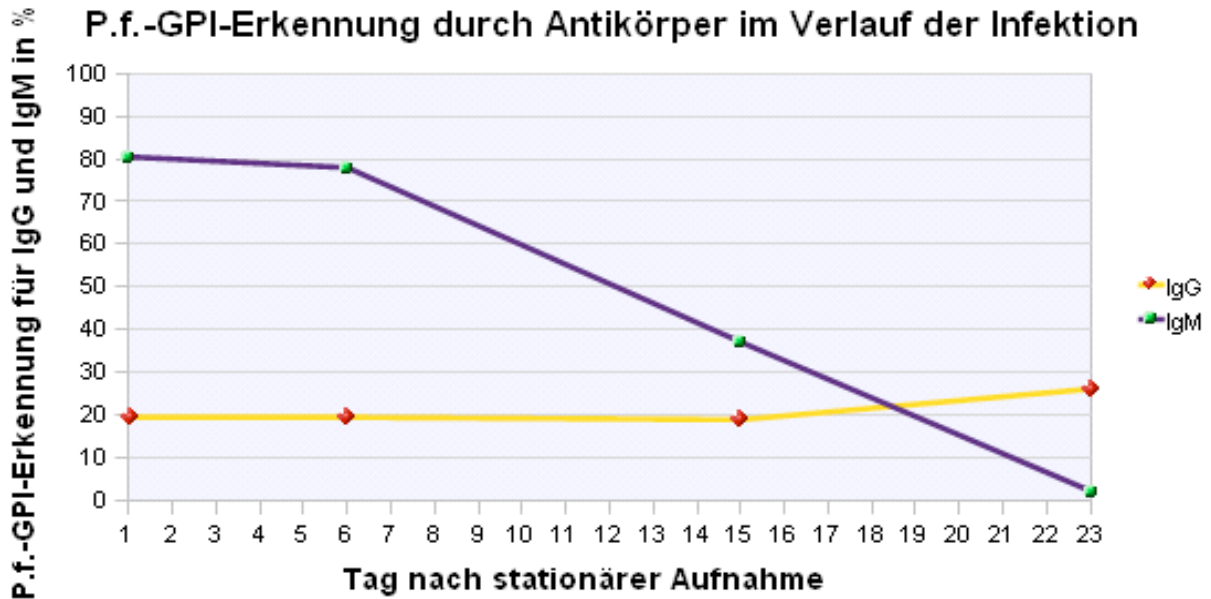


Abbildung 41: Veränderung der Erkennung von *P.f.*-GPI durch IgG- und IgM-Ak im Serum des Patienten mit schwerer akuter Malaria im Verlauf der Krankheit. Die Erkennung von *P.f.*-GPI durch Immunglobulin M (IgM) im Serum des Patienten dominiert in den ersten Tagen, nimmt nach Tag sechs nach Therapiebeginn jedoch deutlich ab und ist am Tag 23 kaum noch nachweisbar. Die Erkennung des *P.f.*-GPI durch Immunglobulin G (IgG) ist zunächst stabil und steigt nach dem Tag 15 an.

Bei der Untersuchung der Seren von Kindern mit schwerer, komplizierter Malaria aus dem Endemiegebiet in Ghana konnte gezeigt werden, dass die Erkennung von *P.f.*-GPI in der Membran von Erythrozyten bei Kindern dagegen vorwiegend durch IgG-Antikörper vermittelt ist; die Erkennung durch IgM-Ak liegt deutlich niedriger. Die IgM Erkennung schwankt zwischen 1,2% und 10%, die IgG Erkennung reicht von 10% bis 23,51% (Abbildung 42).

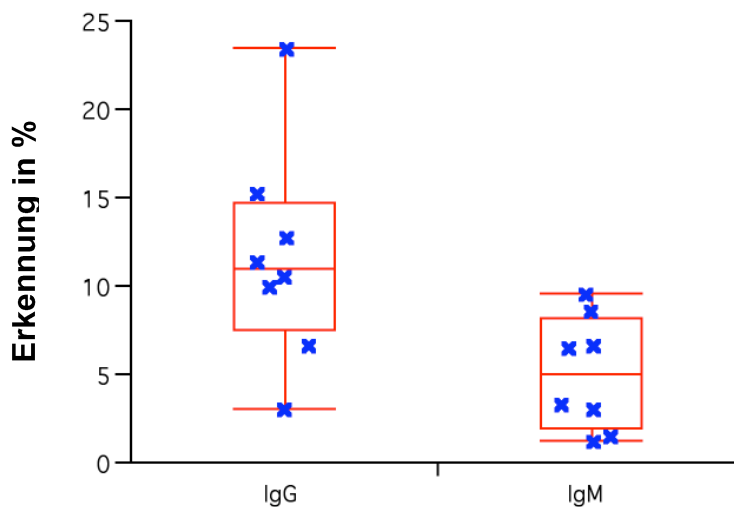


Abbildung 42

Abbildung 42 (vorherige Seite): *P.f.*-GPI Erkennung durch IgG- und IgM-Immunglobuline. Insertertes *P.f.*-GPI in der Erythrozytenmembran wurde mit Antikörpern aus Seren von Kindern mit schwerer Malaria nachgewiesen. Hier überwiegt die Erkennung (angegeben in Prozent) durch Immunglobulin G (IgG) im Vergleich zur Erkennung durch Immunglobulin M (IgM) ($p < 0,005$).

5.5.3 Abhängigkeit der Reaktion vom Lipidanker des *P.f.*-GPI

Im Vergleich zum kompletten *P.f.*-GPI-Molekül fehlt dem nicht lipidierten *P.f.*-GPI der Lipidteil, der für die Verankerung des Moleküls in der Zellmembran verantwortlich ist. Beim Einsatz äquimolarer Mengen von lipidiertem und nicht lipidiertem *P.f.*-GPI banden die Antikörper nur an solchen Zellen, welche mit dem kompletten, lipidierten *P.f.*-GPI vorbehandelt worden sind (Abbildung 43).

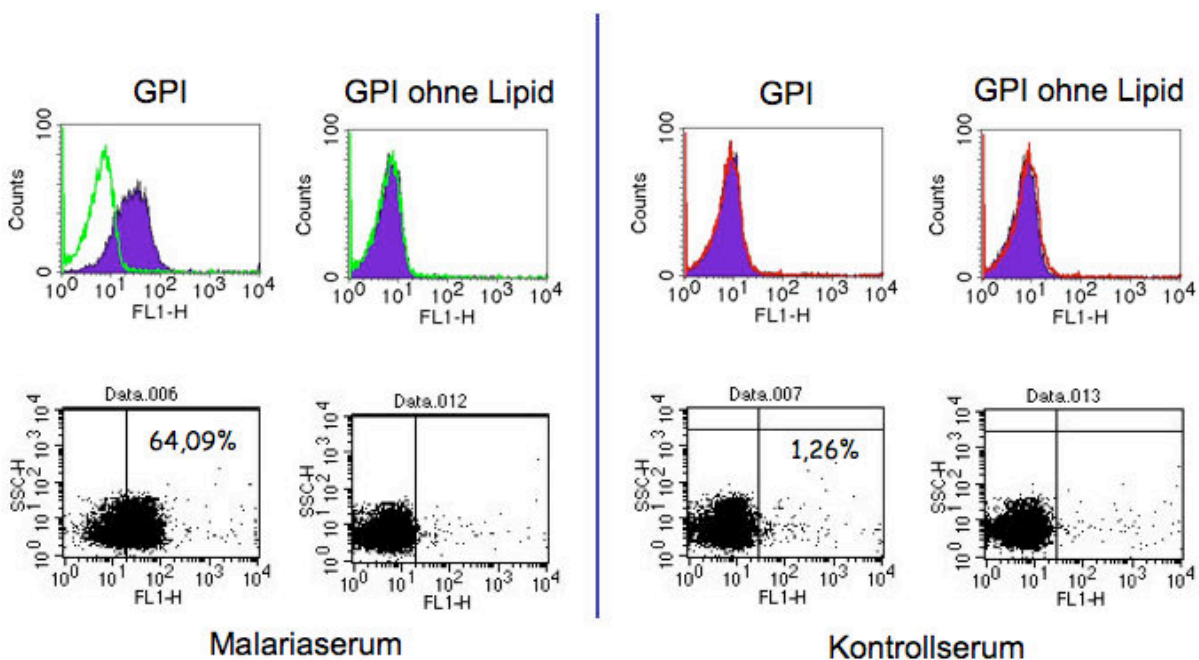


Abbildung 43: Abhängigkeit der *P.f.*-GPI-Erkennung von der Lipiddomäne des Moleküls. In unterschiedlichen Ansätzen wurden Erythrozyten mit lipidiertem und nicht lipidiertem *P.f.*-GPI behandelt und anschließend mit Serum des Patienten mit akuter schwerer Malaria und mit Kontrollserum inkubiert. Die grün gefärbte Überlagerung stellt die Ergebnisse der Kontrolle ohne *P.f.*-GPI aber mit Malarias Serum, sekundären und tertiären Antikörpern dar. Die rote Überlagerung ist ähnlich der grün gefärbten, allerdings wurde hier anstelle des Malarias Serums das Kontrollserum benutzt. Eine Erkennung ist nur mit lipidiertem *P.f.*-GPI und Malarias Serum zu sehen.

5.5.4 Abhängigkeit der *P.f.*-GPI-Erkennung von der Antikörperkonzentration im Patientenserum

Die *P.f.*-GPI vermittelte Erkennung der RBC hängt von der Serumkonzentration ab. Bei der Titration des Serums des Patienten mit akuter schwerer Malaria steigt die Erkennung mit Serumverdünnungen von 1:2 bis 1:100 an (Abbildung 44), während sie bei Verdünnungen über 1:300 sinkt, was auf Prozenen- und dosisabhängige Effekte

Ergebnisse

schließen lässt. Für die Seren weiterer Patienten mit Malaria stellte sich eine Verdünnung von 1:10 als optimal heraus.

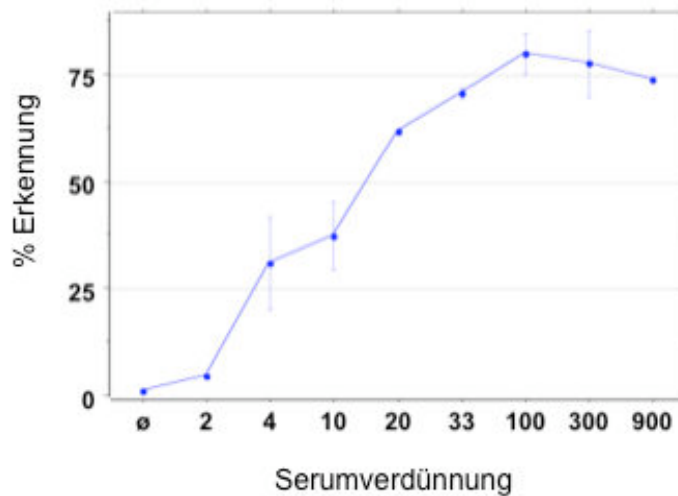


Abbildung 44: Abhängigkeit der *P.f.*-GPI Erkennung von der Verdünnung des Malariaserums. Das Serum des Patienten mit akuter schwerer Malaria wurde in unterschiedlichen Experimenten in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Bis zur Verdünnung 1:100 steigt die Erkennung von *P.f.*-GPI, bei höheren und niedrigeren Verdünnungen ist die Erkennung vermindert.

5.5.5 Dosisabhängigkeit der *P.f.*-GPI Erkennung

Das Ausmaß der Erkennung hängt von der Menge des eingesetzten *P.f.*-GPI und der Anzahl der verwendeten nRBCs ab. Bei steigender Menge *P.f.*-GPI (5, 10 und 20 μM) steigt die Erkennung proportional an (Abbildung 45A), während bei steigender Zahl der verwendeten unbehandelten Erythrozyten (10^7 ; 3×10^7 ; 10^8) die Erkennung proportional sinkt (Abbildung 45B).

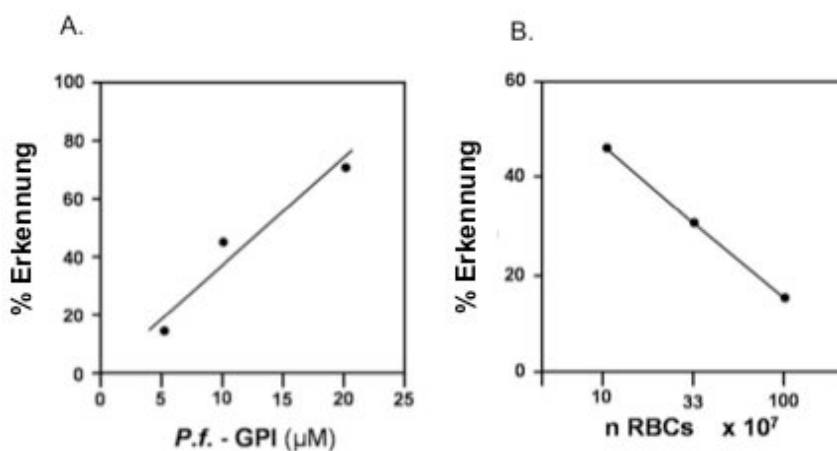


Abbildung 45: Abhängigkeit der *P.f.*-GPI-Erkennung von der Konzentration des eingesetzten *P.f.*-GPI und der Zahl der roten Blutkörperchen. Mit steigender *P.f.*-GPI-Konzentration steigt die Erkennung durch Serumantikörper des Patienten mit schwerer akuter Malaria (A) an, während sie bei steigender Zahl der nRBC sinkt (B).

5.5.6 Einfluss veränderter Versuchsbedingungen auf die *P.f.*-GPI-Erkennung

Eine Präinkubation von *P.f.*-GPI mit Serum des Patienten mit akuter schwerer Malaria vor der Inkubation des Gemischs mit nRBC führte zu einer auf 54% erniedrigten Erkennung im Vergleich zu einer 91%-igen Erkennung ohne Präinkubation.

Ebenso hatte eine Inkubation der nRBCs mit dem *P.f.*-GPI bei 4°C anstelle von 37°C zur Folge, dass die Erkennung sowohl für IgM als auch IgG (IgG: bei 4°C 6,4% versus 19,04% bei 37°C; IgM: bei 4°C 58,87% versus 79,78% bei 37 °C) geringer ausfiel.

5.5.7 Erleichterte Insertion des *P.f.*-GPI durch Zugabe eines Detergens

In mehreren Experimenten wurde das Detergens Triton X-100 als Zusatz in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Dabei zeigte sich, dass mit steigender Triton X-100-Konzentration (von 0,00044% bis 0,004%) bei gleich bleibender Menge des eingesetzten *P.f.*-GPI auch die Erkennungsrate stieg (Abbildung 46). Bei Konzentrationen von 0,04% und höher lysieren die roten Blutkörperchen.

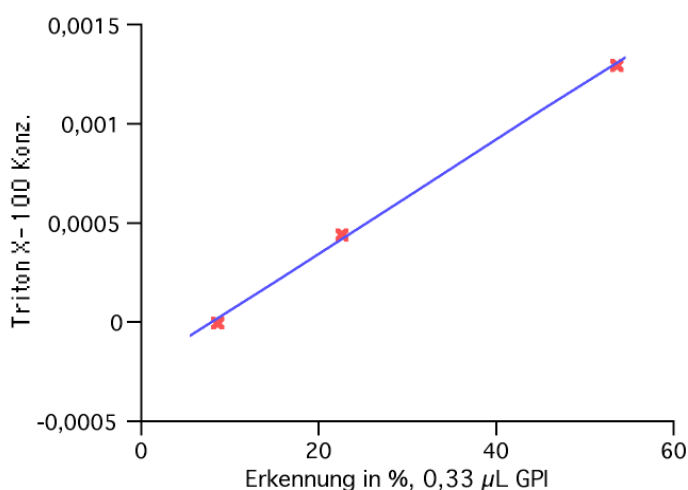


Abbildung 46: Abhängigkeit der Erkennungsrate von der Triton X-100- Konzentration. Die Erkennung von *P.f.*-GPI steigt mit zunehmender Triton X-100-Konzentration (bis 0,0013%) bei gleich bleibender *P.f.*-GPI- und Serumkonzentration.

5.5.8 Mikroarray-Analyse zum Nachweis der Antikörperreaktivität der Serumantikörper mittels synthetischem P.f.-GPI

Die Seren des Patienten mit schwerer akuter Malaria wurden hier untersucht. Die Analyse der Erkennung von *P.f.*-GPI zeigt für IgG ein deutliches Maximum am Tag 6, danach sinkt die Erkennung stark ab. Für IgM ist die Erkennung am Tag 1 am höchsten und sinkt im Laufe der akuten Infektion ab (Abbildung 47). In Bezug auf die Erkennung durch IgM stimmen diese Ergebnisse mit denen des Erythrozytentest überein, in Bezug auf IgG divergieren sie jedoch. Dies kann daran liegen, dass beide Tests auf einer gänzlich unterschiedlichen Methodik beruhen.

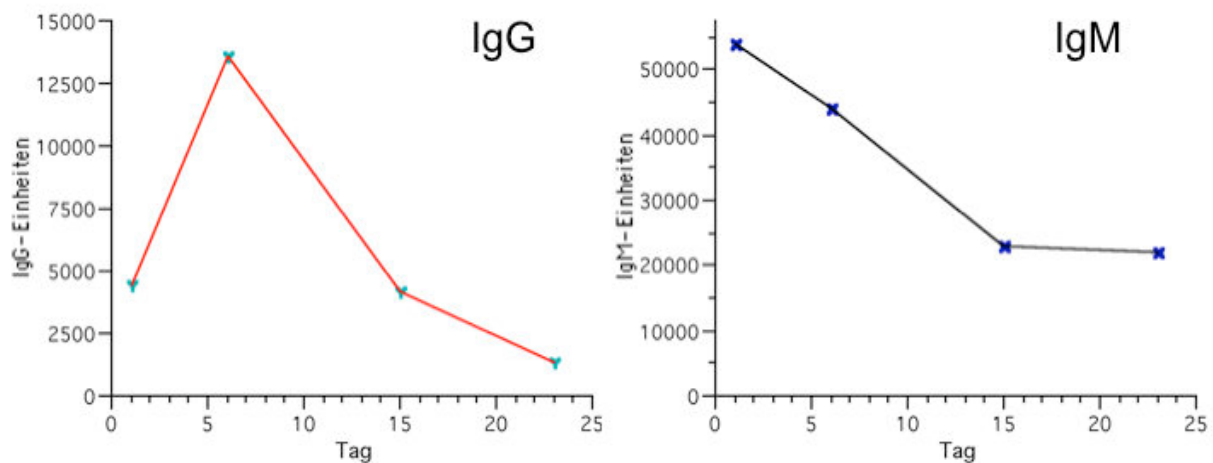


Abbildung 47: Nachweis von *P.f.*-GPI durch Patienten-Antikörper im Mikroarray. Im Mikroarray wurde die Erkennung von *P.f.*-GPI durch Antikörper (Ak) der vier verschiedenen Seren des Patienten mit akuter schwerer Malaria getestet. Für Immunglobulin G (IgG) steigt die Erkennung am Tag 6 deutlich an, danach fällt sie jedoch deutlich ab. Für Immunglobulin M (IgM) ist die Erkennung am Tag 1 am höchsten, in den nächsten Tagen sinkt die Erkennung kontinuierlich (angegeben jeweils in relativen Einheiten).

6 Diskussion

Bei einer Infektion mit *P. falciparum* ist eine schwere Anämie, charakterisiert durch einen Hämoglobinwert von unter 5 g/dL, die häufigste Komplikation. Patienten mit einer schweren Malariaanämie weisen eine ineffektive Erythropoiese auf, die sich in niedrigen Retikulozytenzahlen manifestiert (2, 40), und die auch Wochen nach Behandlung trotz erhöhter Erythropoietin (EPO)-Spiegel bestehen bleibt (36). Die Knochenmarkssuppression äußert sich sowohl in einer ineffektiven Erythropoiese als auch in einer Dyserythropoiese. Diese Faktoren begünstigen die Entstehung einer Anämie, können sie allerdings nicht in vollem Ausmaß erklären.

Die Rate der infizierten Erythrozyten in der Zirkulation (Parasitämie) variiert zwischen unter 1% und 5% und übersteigt nur selten 10%. Der Verlust der RBC kann jedoch auf 25 bis 50% ansteigen, was an einem raschen Abfall des Hämoglobinwerts auf unter 5 g/dL zu sehen ist. Diese Diskrepanz zwischen Parasitämie und Verlust der RBC wird nur zu einem kleinen Teil durch Sequestration infizierter RBC in den Kapillaren erklärt. Es gibt Hinweise, dass auch eine große Anzahl nicht parasitierter RBC zerstört werden.

In der vorliegenden Arbeit sind Veränderungen der Erythrozytenmembran untersucht worden, die eine Rolle an der Lyse von Erythrozyten bzw. bei der Phagozytose der RBC in der Milz spielen können. Dazu gehören die Bindung von Immunglobulinen (IgG und IgM), von Komplementfaktor C3d sowie der Einbau von *P. falciparum*-Glykosphosphatidylinositol (*P.f.*-GPI) in die Erythrozytenmembran. Im Unterschied zu bisherigen Untersuchungen legt die in dieser Arbeit vorgestellte Studie den Fokus auf nicht infizierte Erythrozyten, da diese den Großteil der im Verlauf einer Malariaanämie zerstörten RBC ausmachen. Darüber hinaus wird vermutet, dass das Abbauprodukt Hämozoin im direkten Zusammenhang mit der Malaria assoziierten Anämie steht. Das Vorkommen Hämozoin haltiger Leukozyten bei unterschiedlichen Formen der Malaria wurde hier untersucht.

Die untersuchten Proben stammen von Kindern aus der Ashanti-Region in Ghana, einem holoendemischen Gebiet, und wurden in den Regenzeiten in der Zeit von Oktober bis Dezember 2006 sowie von August 2007 bis Februar 2008 genommen.

6.1 Die Durchflusszytometrie zum Nachweis von Membranveränderungen von RBC bei Malaria

Zum Nachweis von Oberflächenmolekülen auf roten Blutkörperchen wurde eine Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden die gebundenen Oberflächenmoleküle mit polyklonalen Antikörpern markiert und anschließend mit einem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten sekundären Antikörper im Durchflusszytometer detektiert, wie von verschiedenen Gruppen beschrieben (118, 215, 232). Die Fluoreszenz derartig markierter Zellen kann im Durchflusszytometer im Unterschied zum Mikroskop quantitativ ausgewertet werden. Es können deutlich mehr Zellen pro Probe gemessen werden, was zu genaueren Ergebnissen führt. Die verwendeten Antikörper wurden mit roten Blutkörperchen eines Patienten mit autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA) auf dem FACScan® in Hamburg in verschiedenen Verdünnungen ausgetestet. Bei bestimmten Krankheiten wie der AIHA werden die roten Blutkörperchen mit Autoantikörpern bedeckt, was zur Aktivierung der humoralen Immunabwehr und des Komplementsystems über den klassischen Weg und folglich zur Anämie führt. Mit den verwendeten Ak war eine gute Erkennung der zellgebundenen IgG-Moleküle zu sehen. Die hier ermittelten, optimalen Verdünnungen wurden für die vorliegenden Untersuchungen verwendet. Zur Färbung der Plasmodien-Desoxyribonukleinsäure (DNS) wurde der Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) verwendet. Dieser emittiert bei gleicher Anregungswellenlänge Licht in einem höheren Wellenlängenbereich als FITC und wird in einem anderen Kanal (FL2) detektiert. Vorversuche haben gezeigt, dass man mit relativ hohen Konzentrationen EtBr die Parasiten gut färben kann, obwohl EtBr nicht als Vitalfarbstoff gilt. Der Nachteil dieses Farbstoffes ist, dass neben DNS auch Ribonukleinsäure (RNS) gefärbt wird. Retikulozyten sind Vorstufen von Erythrozyten, welche bei Erwachsenen und Kindern zwischen 0,5 und 1,5% der Gesamterthrozyten ausmachen (223). Sie enthalten Reste von RNS und werden ebenfalls mit EtBr gefärbt (103). Zum Zeitpunkt der Studie stand jedoch keine bessere Alternative zur Verfügung.

Für die Detektion von membrangebundenem IgG, IgM und C3d wurden auf dem CyFlow® SL blau, welches im KCCR in Kumasi steht, jeweils dieselben Einstellungen benutzt. Die gewonnenen Daten wurden wie folgt unkompensiert ausgewertet: Im Streudiagramm FL1 (Abszisse) vs. FL2 (Ordinate) lagen im Quadranten rechts oben (Q2) jene Zellen, die eine Doppelfärbung aufwiesen und somit positiv für Ethidiumbromid (EtBr) und FITC sein sollten (Abbildung 20). Bei den Patienten war jedoch der

Prozentsatz der Zellen im Quadranten links oben (Q1, nur EtBr-positiv) sowohl bei der nur mit EtBr gefärbten Kontrolle als auch bei der doppelt gefärbten Kontrolle gleich. Daher kann davon ausgegangen werden, dass alle infizierten Zellen im Quadranten Q1 zu finden sind. Die Fluoreszenz des Quadranten Q2 wurde aus diesem Grunde hier ausschliesslich der Anfärbung durch FITC und nicht der Doppelfärbung durch FITC und EtBr zugeordnet. Diese erhöhte Anzahl FL2-positiver RBC ist wahrscheinlich durch Überlappung der Fluoreszenzspektren zustande gekommen (Abbildung 15). Da die Verstärkungen für die Fluoreszenz (FL) 1 und die FL2 vor Ort sehr niedrig gewählt waren, war eine korrekte Kompensation der beiden Fluoreszenzen schwer möglich. Für die Experimente wäre es besser gewesen, wenn die Verstärkungen für die beiden Fluoreszenzen höher gewählt worden wären. Nachträglich lassen sich die Einstellungen jedoch nicht korrigieren.

Die Region R2, welche die mit EtBr gefärbten, infizierten RBC umfasst, wird auch über die Fluoreszenz FL2 definiert (vgl. Abbildung 25). Es ist aufgrund der fehlenden Kompensation möglich, dass Zellen, die durch oben genannte spektrale Überlappung FL2-positiv sind, zu den infizierten RBC gerechnet wurden, obwohl sie nicht infiziert sind. So kann es bei der Aufteilung in nicht infizierte und infizierte RBC zu Überschneidungen kommen, und die Region R2 kann auch nicht infizierte Zellen umfassen. Hinzu kommt, dass mit R2 auch gefärbte Retikulozyten, die evtl. nicht infiziert sind, erfasst werden. Die Ergebnisse für die infizierten Zellen (EtBr-positiv) sind daher nicht optimal, können jedoch mit den erwähnten Einschränkungen ausgewertet werden. In der Region R1 liegen allerdings ausschließlich nicht infizierte Erythrozyten. Diese Zellen sind zweifelsfrei nicht infiziert und stehen im Fokus der vorliegenden Arbeit.

Für die Analyse der Hämozoin haltigen Leukozyten mit dem CyFlow® SL blau wurden im Unterschied zu den Untersuchungen zu Oberflächenveränderungen auf RBC gänzlich andere Einstellungen verwendet. Eine Kompensation war hier gut möglich.

6.2 Veränderungen an der Erythrozytenmembran

6.2.1 Nachweis von Immunglobulinen und Komplementproteinen

In den holoendemischen Gegenden Westafrikas ist die immunvermittelte Hämolyse als Ursache einer schweren Malaria assoziierten Anämie bei Kindern angenommen worden (163). Es kann als gesichert angesehen werden, dass bei einer Malaria die Erythrozyten, auch nicht infizierte, eine verkürzte Lebensdauer haben und schneller von

der Milz aus der Zirkulation entfernt werden als ohne Infektion. Diese Verkürzung der Lebenszeit dauert noch einige Wochen nach Behandlung an (84, 102, 137, 139, 232, 241). Als Antwort auf eine akute Malaria reagieren die Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES) mit Proliferation und Hyperaktivität, was zur Folge hat, dass nicht infizierte Erythrozyten (nRBC) ebenso wie infizierte Erythrozyten phagozytiert werden (152). Gegen eine intravasale Hämolyse sprechen Ergebnisse von Ekvall *et al.* (63). Sie haben herausgefunden, dass bei Malariapatienten der Plasmahämoglobinwert deutlich unter 1% des Bluthämoglobinwerts liegt. Sie vermuten daher einen extravasalen Mechanismus bei akuter Malariaanämie. In Seren von Malariapatienten sind opsonisierende Antikörper nachgewiesen worden (89), und verschiedene Studien zeigten eine erhöhte Bindung von Immunglobulinen an der RBC-Membran (4, 67, 102, 194, 232). Ebenso konnten Studien von Facer zeigen, dass RBC mit Komplementfragmenten von C3 opsoniert waren (68, 69). Die Opsonisierung ist als Mechanismus zur Elimination von sowohl gealterten als auch infizierten RBC sowie von Merozoiten beschrieben worden (125). Gealterte RBC werden physiologischerweise nach ca. 120 Tagen aus der Zirkulation entfernt. Bande 3 wird dabei degradiert, autologes IgG und Komplementprotein C3 können an dieses Neoantigen binden und es kommt zur Erkennung und Phagozytose durch Makrophagen (16, 25, 114, 115, 142). Bei einer Sichelzellanämie resultiert erhöhter oxidativer Stress in einer schnelleren Degradierung von Bande 3, erhöhter IgG-Bindung und Entfernung der RBC aus der Zirkulation (29, 113). Dieser Mechanismus wird ebenfalls bei einer Infektion mit *P. falciparum* vermutet (91, 193, 240).

Shiono *et al.* haben eine Studie mit Rindern und dem Hämoparasiten *Theileria sergenti* durchgeführt. *Theileria sergenti* ruft in Rindern eine milde Form der Theileriose hervor, welche für große wirtschaftliche Schäden verantwortlich ist. Die infizierten Rinder entwickelten eine Anämie. Die Gruppe konnte zeigen, dass ein Vielfaches an autologem IgG an die RBC im Vergleich zum Zustand vor der Infektion gebunden hatte. Diese Antikörper sind wahrscheinlich gegen Phosphatidylserin (PS) und andere, durch oxidativen Stress hervorgerufene Veränderungen der RBC-Oberfläche gerichtet (208). Es ist bekannt, dass oxidativer Stress zur Veränderung von Erythrozytenoberflächenproteinen und in der Folge zur Bindung von autologem IgG an RBC führen kann. Makrophagen können diese RBC, ebenso wie durch extrazelluläre Exposition von PS markierte RBC, phagozytieren (25, 33).

Studien erzielten jedoch unterschiedliche Ergebnisse über einen Zusammenhang von an RBC gebundenem IgG und Malariaanämie. Eine Methode zum Nachweis inkompletter (nicht agglutinierender) Antikörper auf RBC und von Komplementproteinen, die an diese Antikörper gebunden sind, ist der direkte Coombstest. Hierbei wird ein Antikörper gegen humanes Immunglobulin zu den zu untersuchenden RBC gegeben. Im positiven Fall kommt es zur Vernetzung der Antikörper und in der Folge zur Agglutination der RBC. Patienten mit AIHA zeigen häufig einen positiven direkten Coombstest (74, 97). Mehrere Studien konnten zeigen, dass Patienten mit einer schweren Malaria tropica ebenfalls einen positiven Coombstest aufwiesen (1, 2, 5, 69), und dass sowohl Komplementproteine als auch Immunglobulin G hier involviert sind (3, 6, 69, 81, 153). Auch neuere Studien konnten vermehrt Komplementmoleküle auf RBC bei Malaria nachweisen (13, 172, 176), und ein Zusammenhang mit einer Malaria assoziierten Anämie ist beschrieben worden. Ebenso scheint ein positiver direkter Coombstest mit einer Anämie der Malariapatienten zu korrelieren (69, 81), jedoch konnten weder Abdalla noch Merry *et al.* einen Zusammenhang zwischen RBC assoziiertem IgG und dem Grad der Anämie finden (4, 153). Darüber hinaus korreliert eine Sensibilisierung von RBC mit IgG1-Antikörpern mit der Anämie (67).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Erythrozyten von Malariapatienten mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf das Vorkommen von an der Oberfläche gebundenen Immunglobulinen bzw. Komplementproteinen untersucht. Dabei war es im Unterschied zu den bisherigen Studien möglich, eine Aufgliederung in nicht infizierte und infizierte rote Blutkörperchen vorzunehmen. In der hier vorgestellten Studie konnte keine erhöhte Anzahl an IgG-Molekülen auf Erythrozyten der Patienten nachgewiesen werden. Auch bei Aufteilung in infizierte und nicht infizierte RBC zeigte sich kein Unterschied zwischen verschiedenen Formen der Malaria. In allen klinischen Gruppen ist die Anzahl IgG-positiver Zellen ähnlich. Sie liegt für die nicht infizierten RBC meist unter 0,4%, und für die infizierten Zellen bei den meisten Patienten unter 10%. Möglicherweise konnten gebundene IgG-Antikörper nicht nachgewiesen werden, da eventuell bereits Komplementproteine an diese Immunglobuline gebunden hatten und daher nicht mehr für die anti-IgG-Antikörper zugänglich gewesen sind.

In der vorliegenden Studie gibt es allerdings eine kleine Gruppe von Patienten, die alle an einer schweren Malariaanämie litten und die eine erhöhte Anzahl IgG-positiver RBC aufwiesen. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen einer Studie

von Facer *et al.*, bei der ein durch IgG bedingter, positiver direkter Coombstest nur bei einem kleinen Teil der Patienten festgestellt wurde. Der Großteil der positiven Tests war dort auf eine Sensibilisierung mit dem Komplementprotein C3d zurückzuführen, und ein positiver direkter Coombstest war hier mit Anämie assoziiert (69). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine neuere Studie von Helegbe (98). Hier waren über 85% der positiven Coombstests durch zellgebundenes C3d positiv.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auf den RBC von Kindern mit einer schweren Malariaanämie verglichen mit sowohl asymptomatischen Kontrollen als auch gesunden Europäern vermehrt C3d gebunden ist. Dies trifft im Besonderen auf nicht infizierte RBC zu, auch wenn die Signifikanzen den Wert von 0,005 hier nicht überschreiten. Diese Opsonisierung mit Komplementproteinen auf den RBC kann zur Komplementaktivierung führen, an dessen Ende die Lyse oder Phagozytose der betroffenen Zellen steht. Betrachtet man nur die infizierten RBC so sind keine Unterschiede in der Anzahl C3d-positiver RBC zu sehen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer schweren Malaria das Komplementsystem aktiviert wird und neben infizierten auch nicht infizierte Erythrozyten aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Auf diese Weise kann dieser Mechanismus zur Malariaanämie beitragen.

Weitere Studien haben gezeigt, dass die Oberfläche sowohl infizierter (104) als auch nicht infizierter RBC verändert ist (57, 167, 217). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zirkulierende Erythrozyten *Plasmodium*-Moleküle in die Membran einbauen können und damit ihren Status verändern. Eines dieser Moleküle ist RSP-2, das während der Freisetzung von Merozoiten in die Membran nicht infizierter RBC entlassen wird (57). Nach dem Erstkontakt mit den RBC ist ein Teil der Merozoiten nicht in der Lage, den Invasionsprozess abzuschließen. Als Folge können nicht infizierte Erythrozyten RSP-2 auf der Oberfläche tragen und werden so Ziel von Antikörpern. Dadurch können sie von Makrophagen des RES in der Milz erkannt und zerstört werden. Dieser Mechanismus trägt möglicherweise zur Entwicklung einer Anämie bei der Malaria bei (18, 132). Des Weiteren konnte das Molekül RESA auf nicht infizierten RBC nachgewiesen werden (41, 167). Es wird angenommen, dass der Parasit in diesem Fall in der Milz aus dem Erythrozyten entfernt wurde, ohne diesen zu zerstören (engl. *pitting*). Es konnte gezeigt werden, dass nicht infizierte Zellen mit RESA an der Oberfläche eine deutlich verkürzte Lebensdauer haben.

RBC von Patienten mit einer schweren Malariaanämie zeigen darüber hinaus Veränderungen an bestimmten, regulatorischen Komplementproteinen. Komplementrezeptor 1 (engl. *complement receptor 1*, CR1), CD55 und CD59 schützen RBC vor Komplement vermittelten Schäden und kontrollieren die Komplementaktivierungskaskade (53). Waitumbi und Stoute konnten in verschiedenen Studien zeigen, dass CR1, CD55 und CD59 bei einer schweren Malariaanämie vermindert exprimiert werden, und dass die Immunkomplexpiegel im Blut erhöht sind (49, 218, 232). Die RBC von Patienten mit einer schweren Malariaanämie in diesen Studien hatten eine kürzere Lebensspanne und waren empfänglicher für eine Phagozytose. Dies spricht für eine Beteiligung des Komplementsystems an der Malariaanämie (218, 232, 241).

Die Rolle von Immunglobulin M während einer Malariainfektion ist vielfältig. *P. falciparum* spezifisches IgM konnte im Serum von Malariapatienten und von Einwohnern aus Regionen, in denen Malaria endemisch ist, nachgewiesen werden (150, 222, 230). Rosenberg *et al.* konnten zeigen, dass IgM-Ak-Titer gegen RBC im Serum von Malariapatienten nach der Infektion durch *P. falciparum* ansteigen (194). IgM spielt ebenfalls eine Rolle bei der Rosettenbildung (198). Im Plasma von Malariapatienten konnten IgM-Ak gegen *P.f.*-GPI nachgewiesen werden, und hohe IgM-Antikörper-Titer gegen *P.f.*-GPI sind mit der Schwere der Krankheit assoziiert (42). Eine protektive Rolle für IgM konnte im Mausmodell mit *Plasmodium chabaudi* nachgewiesen werden (46). Facer *et al.* konnten jedoch keine mit IgM sensibilisierten Erythrozyten nachweisen (69).

Die in dieser Arbeit vorgestellte Studie konnte zeigen, dass Erythrozyten von Malariapatienten mit einer schweren Anämie signifikant mehr IgM an der Oberfläche gebunden haben als RBC von Malariapatienten ohne schwere Anämie und von gesunden europäischen Kontrollen. Bei der Aufgliederung in nicht infizierte und infizierte Zellen ist erkennbar, dass die nicht infizierten Erythrozyten der Anämiepatienten signifikant mehr Immunglobulin M gebunden hatten als asymptomatische Patienten und Kontrollen. Der Anteil der Zellen, der positiv für eine IgM-Bindung ist, liegt meist unter 1%. Die Betrachtung der infizierten RBC zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass eine IgM-Bindung bei einem Teil der Zellen zur immun-vermittelten Elimination beitragen kann, besonders bei den Patienten mit einer schweren Malariaanämie. Da gerade bei den nicht infizierten RBC signifikante Unterschiede an gebundenem IgM zu sehen sind, kann man annehmen, dass nicht infizierte RBC bei einer Malariaanämie von einer IgM-vermittelten

Eliminierung betroffen sind. Jedoch ist der Anteil der Zellen, welche IgM-Ak auf der Oberfläche gebunden haben, mit maximal 1,3% relativ gering.

Vergleicht man die mittlere Fluoreszenzintensität bei den Untersuchungen auf IgM, so fällt auf, dass die meisten Unterschiede bei der Gesamtheit der RBC (keine Aufteilung in nicht infizierte und infizierte RBC) auftreten. Hier unterscheidet sich die Kontrollgruppe mit der niedrigsten MFI von den Patientengruppen signifikant. Betrachtet man alle Erythrozyten, so sieht man, dass die MFI der Anämiepatienten signifikant höher liegt als bei den Patienten ohne Anämie und den Kontrollen, was auf eine erhöhte IgM-Bindung der gesamten Zellpopulation der Anämiepatienten zurückzuführen ist.

Bei den Tests auf gebundene Immunglobuline oder Komplementfaktoren fällt auf, dass der Anteil der Zellen, die positiv für eine derartige Bindung sind, meistens unter einem Prozent liegt. Das spricht dafür, dass anderen Mechanismen bei der Entstehung einer Malariaanämie eine größere Bedeutung zukommt als einer immunvermittelten Elimination. Es wäre allerdings denkbar, dass zu dem Zeitpunkt der Blutabnahme der Großteil der RBC bereits eliminiert ist. Um die Beziehung zwischen dem Vorkommen von Immunglobulinen und Komplementproteinen auf nicht infizierte RBC und der Entwicklung einer Malariaanämie zu analysieren sollte eine prospektive Verlaufsstudie durchgeführt werden, so dass verschiedene Zeitpunkte der Entwicklung der Anämie im Vergleich untersucht werden können. Erschwerend für eine solche Studie ist die Tatsache, dass nur ein kleiner Teil der mit *P. falciparum* infizierten Kinder eine schwere Malariaanämie entwickelt. Zudem bringen viele Eltern ihre Kinder erst dann ins Krankenhaus, wenn diese schon schwerkrank und anämisch sind.

Diese Arbeiten haben gezeigt, dass eine Reihe von antigenen Malariadeterminanten eine Antikörperantwort induzieren kann, und dass nicht infizierte Erythrozyten oftmals *Plasmodium*-Proteine an der Oberfläche haben. Seren von Malariapatienten enthalten Antikörper gegen eine Reihe von *Plasmodium*-Proteinen. Wenn diese gegen *Plasmodium*-Proteine gerichtet sind, die an der äußeren RBC-Membran haften, so kann es durch gebundene Antikörper zur Komplementaktivierung und Phagozytose kommen, oder diese RBC werden in der Milz aus dem Blutkreislauf entfernt. Auf diese Weise ist es möglich, dass viele nicht infizierte Zellen zerstört werden und dadurch zur Malaria assoziierten Anämie beitragen.

6.2.2 Veränderte Zugänglichkeit von Glykophorinen bei Malaria

Glykophorin A (GPA) und Glykophorin C (GPC) spielen eine Rolle beim Invasionsvorgang der Merozoiten. GPA fungiert als Rezeptor für das Erythrozyten bindende Antigen (EBA) 175 (EBA-175) (209) und GPC für EBA-140 (224) von Plasmodien. Bei ersten Analysen zum Nachweis von GPA und GPC war zu sehen, dass die Erythrozyten von Malariapatienten eine verminderte Bindung des spezifischen Antikörpers (Ak) gegen GPA bzw. GPC aufweisen.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass bei einer Infektion mit *P. falciparum* Antigene des Parasiten freigesetzt werden, die spezifisch an Oberflächenrezeptoren, wie hier Glykophorin A oder C, binden, so dass die Zugänglichkeit dieser Moleküle für den monoklonalen Ak vermindert ist.

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Malaria tropica die roten Blutkörperchen an der Oberfläche verändert sein können. Moleküle des Parasiten können während der Freisetzung von Merozoiten an der Membran nicht infizierter RBC haften bleiben, hier am Beispiel von GPA und GPC gezeigt. An diese veränderte Oberfläche können Antikörper (z.B. IgG und IgM) und Komplementmoleküle (z.B. C3d) binden und zur Eliminierung führen. In der Studie konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, ob es tatsächlich zu einer Antikörper- oder Komplementbindung an diese veränderten Erythrozyten und in der Folge zum Abbau der betroffenen RBC kommt. Es sind weitere Studien erforderlich, um diesen Aspekt zu klären.

6.2.3 Insertion von P.f.-GPI in die Erythrozytenmembran

Viele humane GPI-verankerte Proteine sind Rezeptoren, wie z.B. Fc γ RIII (CD16) und der Komplementrezeptor CD55, oder Membran assoziierte Enzyme wie z.B. die alkalische Phosphatase. Diese Proteine bewegen sich frei in der Lipiddoppelschicht und können mit anderen Membranmolekülen interagieren. Bei der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie kann ein Mangel bzw. das Fehlen der Komplementrezeptoren CD55 und CD59 durch einen Zell-Zell-Transfer der GPI-verankerten Proteine korrigiert werden (212).

Rifkin und Landsberger haben Untersuchungen zu *Trypanosoma brucei*, einem weiteren humanpathogenen Protozoen, angestellt. Sie fanden heraus, dass es einen interzellulären Transfer von GPI verankerten Oberflächenglykoproteinen (engl. *variant surface glycoprotein*, VSG) zwischen Trypanosomen und Erythrozyten bei *Trypa-*

nosoma brucei, einem Erreger der Trypanosomiasis, gibt (191). Diese Ergebnisse haben sie zu der Hypothese veranlasst, dass VSG sensibilisierte RBC von spezifischen Antikörpern erkannt und durch Komplementaktivierung lysiert werden. Sie haben postuliert, dass dieser Mechanismus zur Anämie bei einer Trypanosomiasis beiträgt.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Versuche mit chemisch synthetisiertem *P.f.*-GPI und naiven Erythrozyten durchgeführt. Es wird angenommen, dass das synthetische *P.f.*-GPI Mizellen formt, welche mit der Zellmembran verschmelzen und so in die Zellmembran inserieren können. Dabei wird der Glykanteil auf der Aussenseite der Zelle präsentiert und kann so von spezifischen Antikörpern erkannt werden (105, 131).

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: (i) Nur RBC, die dem komplett lipidierten GPI exponiert waren, wurden von Antikörpern erkannt und zeigten erhöhte Fluoreszenzsignale im Durchflusszytometer. Dagegen zeigten RBC, die Kontakt zu nicht lipidertem *P.f.*-GPI hatten, keine Antikörperbindung. Dies spricht dafür, dass physiologischerweise der Lipidschwanz des *P.f.*-GPI-Moleküls essentiell für die Insertion in die Zellmembran ist. (ii) Es wurden erhöhte Fluoreszenzsignale bei Verwendung des Serums des Patienten mit akuter Malaria registriert, nicht aber mit dem Serum eines Gesunden, der nicht malariaexponiert war. Die Antikörper gegen *P.f.*-GPI sind folglich spezifisch durch eine Malaria induziert. (iii) Die Zugabe des Detergens Triton X-100 während der Inkubation des *P.f.*-GPI mit RBC bewirkte eine dosisabhängige Verstärkung der Erkennung. Der Befund lässt darauf schließen, dass das Detergens die Insertion des *P.f.*-GPI in die Zellmembran (siehe i), wahrscheinlich durch Mizellenbildung, erleichtert. Die unterschiedlichen Triton X-100-Konzentrationen waren so niedrig gewählt, dass die RBC weder lysierten noch mikroskopisch verändert waren. (iv) Inkubation der RBC mit *P.f.*-GPI bei 4°C resultierte in einer verminderten Erkennung durch Serumantikörper. Als Ursache hierfür kommt eine verminderte Membranfluidität bei 4°C in Betracht. (v) Die Insertion von *P.f.*-GPI in die Membran war in Bezug auf die Menge an *P.f.*-GPI und RBC dosisabhängig, wobei die Korrelation der Erkennung mit *P.f.*-GPI positiv und mit RBC negativ war. (vi) Eine Präinkubation des *P.f.*-GPI mit Patientenserum hatte eine signifikante Verringerung der Erkennung des *P.f.*-GPI zur Folge. Diese Beobachtung deutet auf eine *P.f.*-GPI-Neutralisierung durch anti-*P.f.*-GPI-Antikörper im Serum hin.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass synthetisches *P.f.*-GPI in die Membran nicht infizierter RBC inserieren kann. Das in die Membran eingebettete *P.f.*-GPI wird in der Folge von spezifischen Antikörpern aus dem Serum von Malariapatienten erkannt.

Die Analyse der Antikörperisotypen der hier vorgestellten Ergebnisse ergab, dass bei dem erwachsenen Patienten mit einer schweren akuten Malaria die Aktivität der IgM-Ak in der akuten Phase am höchsten war, wohingegen die Aktivität der IgG-Ak gering war. Diese Situation ähnelt der akuten Phase anderer Infektionen. Die Spezifität der IgG- und IgM-Ak, die mit dem *P.f.*-GPI-Glykanteil reagieren, ist hier ebenfalls mit einem Kohlenhydratmikroarray gezeigt worden (109). Die Ergebnisse aus dem Array-Test beruhen auf einer anderen Methodik als der Test mit sensibilisierten RBC, sodass beide Tests nicht direkt vergleichbar sind. Dennoch kann man die relativen Veränderungen innerhalb eines Tests vergleichen. In beiden Tests wurden ähnliche Verläufe der IgM-Reaktivitäten des Serums nach Beginn der Therapie beobachtet. Die Verläufe der IgG-Reaktivitäten differieren jedoch. Der Mikroarraytest wurde auch mit kürzeren Glykanteilen des *P.f.*-GPI-Moleküls durchgeführt. Die Antikörperbindung war jedoch deutlich geringer als mit dem kompletten Glykanteil. Dies spricht dafür, dass die Antikörper aus Patientenserum gegen den gesamten Glykanteil gerichtet sind.

Der Erythrozytentest hat gezeigt, dass im Verlauf der Infektion bei dem Patienten mit akuter schwerer Malaria die Reaktivität der IgM-Antikörper abnahm, während die IgG-Ak-Reaktivität zunächst auf einem gleich bleibenden Niveau blieb und erst gegen Ende der Infektion anstieg. Studien von Boutlis *et al.* und Naik *et al.* kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie haben das Vorkommen von IgG-Ak im Serum von Malariapatienten während und nach einer Infektion untersucht. In diesen Studien wiesen Erwachsene eine persistierende Antikörperantwort auf (31, 165). Bei Kindern jedoch nimmt die Prävalenz von anti-*P.f.*-GPI-IgG-Ak nach der Infektion schnell ab (30). Zusätzlich konnte ein Unterschied im Vorkommen von IgM-Ak zu unterschiedlichen Zeiten der Malariatransmission festgestellt werden. Zu Beginn und mitten im Übertragungszeitraum ist der IgM-Ak-Spiegel bei gesunden Kindern signifikant höher als gegen Ende (42). Diese Befunde deuten darauf, dass mit abnehmender Malariaexposition die IgM-Antikörper im Serum ebenfalls abnehmen. Zu diesen Ergebnissen passt die Beobachtung, dass bei dem Patienten mit schwerer akuter Malaria nach der Behandlung die IgM-Reaktivitäten abnehmen.

Die Analyse der Reaktivitäten von Antikörpern aus dem Serum von Kindern mit einer schweren Malaria in der vorliegenden Arbeit hat gezeigt, dass bei Kindern die Reaktivität von IgG-Antikörpern in der akuten Phase höher ist als die IgM-Ak-Reaktivität. Boutlis *et al.* und de Souza *et al.* erzielten in ihren Studien vergleichbare Ergebnisse (31, 52). Sie konnten zeigen, dass Kinder unter fünf Jahren keine IgM-Ak gegen *P.f.*-GPI und geringe IgG-Spiegel haben. Mit steigendem Alter nimmt die Prävalenz sowohl von IgG- als auch von IgM-Ak gegen *P.f.*-GPI im Serum zu.

In bisherigen Studien wurden die höchsten Antikörperspiegel gegen *P.f.*-GPI bei Kindern mit schwerer Malaria festgestellt (42, 52). Es konnte demonstriert werden, dass Antikörper gegen das Malariatoxin einen Schutz bieten. Ein synthetischer *P.f.*-GPI-Impfstoffkandidat hat die Bildung von anti-GPI-Antikörpern induziert, welche die proinflammatorische Aktivität des Malariatoxins neutralisiert haben (202).

In der vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass synthetisches *P.f.*-GPI in die Membran von naiven, nicht infizierten Erythrozyten inserieren kann, und dass durch eine Malaria die Bildung spezifischer Antikörper gegen dieses Molekül induziert wird. Diese Antikörperantwort hängt vom Alter der Patienten ab: Je jünger der Patient, desto mehr dominieren IgG-Ak, wohingegen bei erwachsenen Patienten eine IgM-Antwort in der akuten Phase vorherrscht. Es bleibt jedoch offen, welche Rolle die Insertion von *P.f.*-GPI in die Erythrozytenmembran und die anschließende Erkennung durch anti-*P.f.*-GPI-Ak bei der Entstehung einer Malaria assoziierten Anämie spielt. Dieser Aspekt wäre es wert, in Zukunft in weiteren Studien untersucht zu werden.

6.3 Nachweis von Hämозoin im Durchflusszytometer

Häufig wird die periphere Parasitendichte als Maß für die Schwere einer Malaria herangezogen, jedoch korreliert die Parasitämie nicht gut mit der Schwere der Krankheit. Dies kann an der Sequestration von Parasiten im Endothel und der Mikrovaskulatur lebensnotwendiger Organe liegen. Eine große Menge des Parasitenabbauproduktes Hämозoin ist wahrscheinlich die Folge einer hohen Parasitendichte im Blut und könnte einen besseren peripheren Marker für die Parasitenbiomasse im Parasiten darstellen (144).

Im Blut wird freies Hämозoin von Fresszellen (Monozyten, neutrophile Granulozyten) aufgenommen. Weiterhin kann Hämозoin auch zusammen mit infizierten RBC phagozytiert werden (154). Hämозoin haltige Leukozyten sind aufgrund der depolarisierenden Eigenschaften der Hämозoinkristalle auch in einem Durchflusszytometer mit Filtern für depolarisiertes Licht gut nachweisbar.

Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Hämозoin und Dyserythropoiese sowie Malariaanämie herstellen. Erhöhte Vorkommen von Pigment tragenden Monozyten (PCM) bei Kindern sind mit einer schweren Malariaanämie assoziiert worden (19, 38, 117). In keiner dieser Studien sind Pigment haltige Leukozyten (PCL) jedoch mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen worden. In vielen Studien wurden Hämозoin haltige Leukozyten mit Hilfe der Mikroskopie ausgezählt, wobei 100 Neutrophile und 30 Monozyten ausgewertet wurden (11, 19). Die Subjektivität des Auszählenden und die relativ geringe Zahl an PCL können leicht zu Ungenauigkeiten führen. Untersuchungen von Hänscheid und anderen konnten zeigen, dass sich Hämозoin haltige Zellen gut im Durchflusszytometer nachweisen lassen (88, 94-96, 205, 234), und dass mit dieser Methode eine Sensitivität und Spezifität von über 90% erreicht werden kann. Dies macht die Diagnose der Malaria mittels Durchflusszytometrie möglich (93). Die verschiedenen Geräte basieren jedoch auf unterschiedlichen Computerprogrammen. Zudem ist die Anschaffung eines Durchflusszytometers teuer.

Die Leukozyten im peripheren Blut der Patienten des gut definierten Kollektivs wurden in der vorliegenden Studie mit Hilfe eines Durchflusszytometers auf das Vorkommen von Hämозoin untersucht. Es fällt auf, dass in den Anämiegruppen (Gruppen I und II) sowohl die Anzahl als auch der Anteil an PCM und PCN (Pigment tragenden Neutrophile) signifikant erhöht sind im Vergleich zu anderen Patienten und

Kontrollen. Dies ist konsistent mit Ergebnissen der Studien von Awandare und Casals-Pascual, die ihre Ergebnisse jedoch mit anderen Methoden erzielt haben (19, 38).

Es ist bei der Analyse der Ergebnisse zu bedenken, dass durch die Aufnahme von Hämозoin bei den Monozyten die Streulichteigenschaften verändert werden können. Die Folge ist, dass sich ein Teil der Monozyten im Streudiagramm des Vorwärtsstreulichts (x-Achse) gegen das Seitwärtsstreulicht (y-Achse) aufgrund einer gestiegenen Granularität in die Region der Neutrophilen verschieben können. Daher sollte die Monozytenpopulation besser über eine Färbung mit einem anti-CD14-Ak bestimmt werden. Dieses Problem ergab sich allerdings erst nach der Auswertung in einer wissenschaftlichen Diskussion mit T. Hänscheid (Universität Lissabon, Portugal) und konnte bei diesen Analysen nicht mehr berücksichtigt werden.

Im Allgemeinen ist der Anteil an pigmenthaltigen Neutrophilen (PCN) geringer als der Anteil an pigmenthaltigen Monozyten (PCM), was an der kürzeren sogenannten „*clearance rate*“ (engl., Zeit bis zur vollständigen Entfernung dieser Zellen aus der Zirkulation) der Neutrophilen liegen kann. PCN kennzeichnen aufgrund der kurzen „*clearance rate*“ von rund zweiundsiebzig Stunden eine kürzlich stattgefundenene Phagozytose von Hämозoin, wohingegen langlebige PCM mit einer „*clearance rate*“ von ca. neun Tagen den Krankheitsverlauf weiter zurückliegender Tage widerspiegeln (51, 168). Der Anteil an PCM ist signifikant erhöht in Patienten mit schwerer Malaria, jedoch unterscheidet sich dieser nicht zwischen Gesunden, asymptomatischen Patienten und Patienten mit milder Malaria. Der Anteil der PCN hingegen korreliert gut mit der Schwere der Krankheit und scheint demzufolge ein besserer prognostischer Indikator für die Schwere der Malaria zu sein (11, 144).

6.3.1 Entdeckung einer besonderen Leukozytenpopulation

Völlig neu war das Auftreten einer weiteren Population von Leukozyten, die in der Lage ist, Hämозoin zu phagozytieren. Ähnlich wie bei den PCM und PCN, jedoch noch stärker ausgeprägt, sind auch hier die höchsten Anteile Hämозoin haltiger Zellen in den Anämiegruppen I und II zu finden. Diese hier CD16^{dim} genannten Zellen sind schwächer positiv für Fc γ -Rezeptor III (CD16) als die Neutrophilen, lassen sich jedoch aufgrund ihrer Streulichteigenschaften eher den Lymphozyten zuordnen. Es besteht die Vermutung, dass es sich hier um unreife Monozyten oder um dendritische Zellen handelt (199). Dieser Verdacht kam in einer Diskussion mit

Experten der Durchflusszytometrie, H. Shapiro (Center for Microbial Cytometry and Howard M. Shapiro, West Newton, MA, USA) und T. Hänscheid, auf. Dafür spricht, dass junge Monozyten ebenfalls CD16 exprimieren können (199, 221). Eine weitere Vermutung ist, dass diese CD16^{dim} genannten Zellen natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind. Dagegen spricht, dass NK-Zellen nicht phagozytieren können, die CD16^{dim}-Population aber Hämozoin enthält.

Mit den vorliegenden Methoden und den damit gewonnenen Daten konnte diese Population allerdings nicht identifiziert werden. Es sind weitere Studien mit Malariapatienten erforderlich, um die Identität dieser Population aufzudecken und die Bedeutung dieser Zellpopulation bei der Pathophysiologie der Malariaanämie einzuschätzen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Globale Verteilung der <i>P. falciparum</i> -Endemieklassen. _____	6
Abbildung 2: Globale Verteilung der Todesfälle durch Malaria pro 1000 Einwohner. _____	6
Abbildung 3: Lebenszyklus von Plasmodien im Menschen. _____	7
Abbildung 4: Aufbau der Erythrozytenmembran. _____	9
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Milz. _____	16
Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Milz eines Malariapatienten beim „pitting“. _____	17
Abbildung 7: Vermutete Mechanismen der Zerstörung von Erythrozyten bei einer Malaria. _____	19
Abbildung 8: Struktur von Hämozoin. _____	25
Abbildung 9: Schematische Reihenfolge der Blutuntersuchungen. _____	27
Abbildung 10: Struktur des <i>P.f.</i> -GPI. <i>P.f.</i> -GPI mit und ohne Lipidanker. _____	35
Abbildung 11: <i>P.f.</i> -GPI und seine unvollständigen Vorstufen. _____	36
Abbildung 12: Aufbau eines Durchflusszytometers und hydrodynamische Fokussierung. _____	38
Abbildung 13: Seit- und Vorwärtsstreulicht. _____	39
Abbildung 14: Vereinfachtes Schema des Strahlengangs im FACScan®. _____	40
Abbildung 15: Spektrale Überlappung am Beispiel von FITC und R-PE. _____	40
Abbildung 16: Vereinfachtes Schema des Strahlengangs in CyFlow® SL blau. _____	42
Abbildung 17: Beispiele für ein typisches Histogramm und Streudiagramm. _____	44
Abbildung 18: Beispiel einer Patientenprobe zum Nachweis von Hämozoin tragenden Leukozyten. _____	45
Abbildung 19: Darstellung einer ungefärbten Kontrollprobe der Versuche zu Oberflächenveränderungen auf RBC mit der FloMax®-Software. _____	49
Abbildung 20: Darstellung einer Probe der Versuche zu Oberflächenveränderungen auf RBC mit der FloMax®-Software. _____	49
Abbildung 21: Mikroskopischer Nachweis im Blutaussstrich von Hämozoin in Leukozyten nach Giemsa-Färbung. _____	57
Abbildung 22: Beispiel einer Patientenprobe zum Nachweis von Hämozoin tragenden Leukozyten im Durchflusszytometer. _____	58
Abbildung 23: Verteilung der Anzahl der Pigment tragenden Zellen auf die verschiedenen Gruppen. _____	60
Abbildung 24: Verteilung der prozentualen Anteile der Pigment tragenden Leukozyten in den Gruppen. _____	64
Abbildung 25: Beispielhafte Darstellung einer Patientenprobe für den Nachweis von Oberflächenveränderungen auf RBC im Durchflusszytometer. _____	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: Anteile IgG-positiver Zellen im Quadranten Q2 (in %).	71
Abbildung 27: Anteile IgG-positiver Zellen im Quadranten Q4 (in %).	73
Abbildung 28: Anteile IgG-positiver Zellen in den Quadranten Q2 und Q4 (in %).	74
Abbildung 29: Anteile IgM-positiver Zellen im Quadranten Q4 (in %).	77
Abbildung 30: Anteile IgM-positiver Zellen im Quadranten Q2 (in%).	79
Abbildung 31: Anteile IgM-positiver Zellen in den Quadranten Q2 und Q4 (in%).	80
Abbildung 32: Anteile C3d-positiver Zellen im Quadranten Q4 (in%).	82
Abbildung 33: Anteile C3d-positiver Zellen im Quadranten Q2 (in%).	84
Abbildung 34: Anteile C3d-positiver Zellen in den Quadranten Q2 und Q4 (in%).	85
Abbildung 35: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität für gebundenes Immunglobulin G.	87
<hr/>	
Abbildung 36: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität beim Nachweis einer Bindung von IgM an Erythrozyten.	89
Abbildung 37: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität zum Nachweis von C3d auf Erythrozyten.	91
Abbildung 38: Nachweis von Glykophorin A.	94
Abbildung 39: Nachweis von Glykophorin C.	95
Abbildung 40: Erkennung von <i>P.f.</i> -GPI durch Antikörper im Serum des Patienten mit akuter schwerer Malaria.	96
Abbildung 41: Veränderung der Erkennung von <i>P.f.</i> -GPI durch IgG- und IgM-Ak im Serum des Patienten mit schwerer akuter Malaria im Verlauf der Krankheit.	98
Abbildung 42: <i>P.f.</i> -GPI Erkennung durch IgG- und IgM-Immunglobuline.	98
Abbildung 43: Abhängigkeit der <i>P.f.</i> -GPI-Erkennung von der Lipiddomäne des Moleküls.	99
Abbildung 44: Abhängigkeit der <i>P.f.</i> -GPI Erkennung von der Verdünnung des Malariaserums.	100
<hr/>	
Abbildung 45: Abhängigkeit der <i>P.f.</i> -GPI-Erkennung von der Konzentration des eingesetzten <i>P.f.</i> -GPI und der Zahl der roten Blutkörperchen.	100
Abbildung 46: Abhängigkeit der Erkennungsrate von der Triton X-100- Konzentration. Die	101
Abbildung 47: Nachweis von <i>P.f.</i> -GPI durch Patienten-Antikörper im Mikroarray.	102

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mechanismen, die zur Eliminierung nicht parasitierter RBC führen können.	21
Tabelle 2: Komplikationen im Rahmen einer <i>Plasmodium falciparum</i> -Infektion bei Kindern mit der Häufigkeit des Auftretens.	29
Tabelle 3: Tabelle der verwendeten Fluorochrome.	43
Tabelle 4: Multiple Blutbildparameter der Studienkohorte. Angegeben sind jeweils der Median sowie die 10. und 90. Perzentile; n = Anzahl Patienten pro Gruppe	55
Tabelle 5: Signifikante Unterschiede der Blutparameter zwischen klinischen Gruppen.	56
Tabelle 6: Verwendete Gefahrstoffe.	138

9 Abkürzungsverzeichnis

A+	Gruppe der Patienten mit schwerer Anämie
A-	Gruppe der Patienten ohne schwere Anämie
AIHA	autoimmunhämolytische Anämie
Ak	Antikörper
AMA-1	apikales Membranantigen 1 (engl. <i>apical membrane antigen</i>)
BNI	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
BP	Bandpassfilter
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C3d	Komplementprotein C3d
ca.	circa
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> , Systematische Ordnung immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen
CR1	Komplementrezeptor 1 (engl. <i>complement receptor 1</i>)
CSP	engl. <i>circumsporozoite protein</i>
dL	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
D-PBS	Dulbecco's PBS
DS	Dichroitischer Spiegel
EBA	Erythrozyten bindendes Antigen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
EPO	Erythropoietin
<i>et al.</i>	und andere (Latein: <i>et alteri</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FACS	Durchflusszytometer (engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i>)
Fc	engl. <i>fragment crystallizable</i> , nicht antigenbindende Domäne der Ig
Fc γ RIII	Fc γ -Rezeptor III (CD16), bindet die Fc-Domäne von γ -Globulinen (IgG)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
g	Gramm
<i>g</i>	relative Zentrifugalkraft (9,81 m/s ²)
GHS	Global harmonisiertes System (Weltweite Harmonisierung der Gefahrenkommunikation von chemischen Produkten)
GlcN	Glukosamin (engl. <i>glucosamine</i>)
GPA	Glycophorin A
GPC	Glycophorin C
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Hb	Hämoglobinwert (angegeben in g/dL)
HbS	Sichelzellhämoglobin
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFN- γ	Interferon-gamma

Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
k.A.	keine Angabe
KATH	Komfo Anokye Teaching Hospital (Lehrkrankenhaus in Kumasi, Ghana)
iRBC	infizierte rote Blutkörperchen
Kg	Kilogramm
KH	Kohlenhydrat
KNUST	Kwame Nkrumah University of Science and Technology (Universität in Kumasi, Ghana)
KS	Kontrollserum
Ktrl	Kontrollgruppe der Europäer
λ	Wellenlänge
L	Liter
LP	optischer Filter, welcher Licht über einer bestimmten Wellenlänge passieren lässt und unterhalb dieser Wellenlänge reflektiert (engl. <i>longpassfilter</i>)
m	Meter; milli- (10^{-3})
M	Mol
μ	mikro- (10^{-6})
mm	Millimeter
Man	Mannose(-rest)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
MSP	Merozoitenoberflächenprotein (engl. <i>merozoite surface protein</i>)
n	Probenanzahl
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nRBC	nicht infizierte rote Blutkörperchen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Pigment tragende (engl. <i>pigment-carrying-</i>)
PC-CD16 ^{dim}	Pigment tragende Zellen mit schwächer exprimiertem CD16 als die neutrophilen Granulozyten
PCL	Pigment tragende Leukozyten
PCM	Pigment tragende Monozyten
PCN	Pigment tragende neutrophile Granulozyten
<i>P.f.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	engl. <i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
PS	Phosphatidylserin
r	Korrelationskoeffizient
RAMA	engl. <i>rhoptry-associated membrane antigen</i>
RAP	engl. <i>rhoptry associated protein</i>
RBC	Rotes Blutkörperchen (engl. <i>red blood cell</i>)
RES	retikuloendotheliales System
RESA	engl. <i>ring-infected erythrocyte surface antigen</i>
Rh	Rhesusfaktor
Rh ⁻	Rhesusfaktor negativ
RNS	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

R-PE	R-Phycoerythrin
RSP-2	engl. <i>ring surface protein-2</i>
RT	Raumtemperatur (25°C)
SCGF	Stammzellenwachstumsfaktor (engl. <i>stem cell growth factor</i>)
SP	optischer Filter, welcher Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge passieren lässt und über dieser Wellenlänge reflektiert (engl. <i>shortpassfilter</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
SSC-h	horizontales Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter horizontal</i>)
SSC-v	vertikales Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter vertical</i>)
TLR	Toll-like Rezeptor (engl. <i>toll-like receptor</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
vgl.	vergleiche
vs.	versus
VSG	variantes Oberflächenglykoprotein (engl. <i>variant surface glycoprotein</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i>)
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

10 Literaturverzeichnis

1. **Abdalla, S., and D. J. Weatherall.** 1982. The direct antiglobulin test in *P. falciparum* malaria. *Br J Haematol* **51**:415-425.
2. **Abdalla, S., D. J. Weatherall, S. N. Wickramasinghe, and M. Hughes.** 1980. The anaemia of *P. falciparum* malaria. *Br J Haematol* **46**:171-183.
3. **Abdalla, S. H.** 1987. Opsonizing and agglutinating antibodies against *Plasmodium falciparum* schizont-infected erythrocytes in Gambian sera. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **81**:214-218.
4. **Abdalla, S. H.** 1986. Red cell associated IgG in patients suffering from *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol* **62**:13-19.
5. **Abdalla, S. H., F. G. Kasili, and D. J. Weatherall.** 1983. The Coombs direct antiglobulin test in Kenyans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **77**:99-102.
6. **Adner, M. M., L. B. Altstatt, and M. E. Conrad.** 1968. Coombs'-positive hemolytic disease in malaria. *Ann Intern Med* **68**:33-38.
7. **Aidoo, M., D. J. Terlouw, M. S. Kolczak, P. D. McElroy, F. O. ter Kuile, S. Kariuki, B. L. Nahlen, A. A. Lal, and V. Udhayakumar.** 2002. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* **359**:1311-1312.
8. **Allen, S. J., A. O'Donnell, N. D. Alexander, C. S. Mgone, T. E. Peto, J. B. Clegg, M. P. Alpers, and D. J. Weatherall.** 1999. Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by southeast Asian ovalocytosis band 3. *Am J Trop Med Hyg* **60**:1056-1060.
9. **Alles, H. K., K. N. Mendis, and R. Carter.** 1998. Malaria mortality rates in South Asia and in Africa: implications for malaria control. *Parasitol Today* **14**:369-375.
10. **Amino, R., S. Thiberge, S. Shorte, F. Frischknecht, and R. Menard.** 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C R Biol* **329**:858-862.
11. **Amodu, O. K., A. A. Adeyemo, P. E. Olumese, and R. A. Gbadegesin.** 1998. Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**:54-56.
12. **Angus, B. J., K. Chotivanich, R. Udomsangpetch, and N. J. White.** 1997. In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria. *Blood* **90**:2037-2040.
13. **Ansar, W., S. K. Habib, S. Roy, and C. Mandal.** 2009. Unraveling the C-reactive protein complement-cascade in destruction of red blood cells: potential pathological implications in *Plasmodium falciparum* malaria. *Cell Physiol Biochem* **23**:175-190.
14. **Anstey, N. M., D. L. Granger, M. Y. Hassanali, E. D. Mwaikambo, P. E. Duffy, and J. B. Weinberg.** 1999. Nitric oxide, malaria, and anemia: inverse relationship between nitric oxide production and hemoglobin concentration in asymptomatic, malaria-exposed children. *Am J Trop Med Hyg* **61**:249-252.
15. **Anstey, N. M., J. B. Weinberg, M. Y. Hassanali, E. D. Mwaikambo, D. Manyenga, M. A. Misukonis, D. R. Arnelle, D. Hollis, M. I. McDonald, and D. L. Granger.** 1996. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med* **184**:557-567.
16. **Arese, P., F. Turrini, and E. Schwarzer.** 2005. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* **16**:133-146.
17. **Artavanis-Tsakonas, K., J. E. Tongren, and E. M. Riley.** 2003. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* **133**:145-152.

18. **Awah, N. W., M. Troye-Blomberg, K. Berzins, and J. Gysin.** 2009. Mechanisms of malarial anaemia: potential involvement of the *Plasmodium falciparum* low molecular weight rhoptry-associated proteins. *Acta Trop* **112**:295-302.
19. **Awandare, G. A., Y. Ouma, C. Ouma, T. Were, R. Otieno, C. C. Keller, G. C. Davenport, J. B. Hittner, J. Vulule, R. Ferrell, J. M. Ong'echa, and D. J. Perkins.** 2007. Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia. *Infect Immun* **75**:201-210.
20. **Ayi, K., F. Turrini, A. Piga, and P. Arese.** 2004. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* **104**:3364-3371.
21. **Bachmann, A., C. Esser, M. Petter, S. Predehl, V. von Kalckreuth, S. Schmiedel, I. Bruchhaus, and E. Tannich.** 2009. Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family expression in *Plasmodium falciparum* from a splenectomized malaria patient. *PLoS One* **4**:e7459.
22. **Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna, and G. H. Mitchell.** 2000. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today* **16**:427-433.
23. **Barragan, A., P. G. Kreamsner, M. Wahlgren, and J. Carlson.** 2000. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect Immun* **68**:2971-2975.
24. **Baruch, D. I., J. A. Gormely, C. Ma, R. J. Howard, and B. L. Pasloske.** 1996. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3497-3502.
25. **Beppu, M., K. Ando, and K. Kikugawa.** 1996. Poly-N-acetyllactosaminyl saccharide chains of band 3 as determinants for anti-band 3 autoantibody binding to senescent and oxidized erythrocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **42**:1007-1024.
26. **Bernasconi, N. L., N. Onai, and A. Lanzavecchia.** 2003. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* **101**:4500-4504.
27. **Black, C. G., T. Wu, L. Wang, A. R. Hibbs, and R. L. Coppel.** 2001. Merozoite surface protein 8 of *Plasmodium falciparum* contains two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol* **114**:217-226.
28. **Blackman, M. J.** 2004. Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. *Cell Microbiol* **6**:893-903.
29. **Bosman, G. J.** 2004. Erythrocyte aging in sickle cell disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **50**:81-86.
30. **Boutlis, C. S., P. K. Fagan, D. C. Gowda, M. Lagog, C. S. Mgone, M. J. Bockarie, and N. M. Anstey.** 2003. Immunoglobulin G (IgG) responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols are short-lived and predominantly of the IgG3 subclass. *J Infect Dis* **187**:862-865.
31. **Boutlis, C. S., D. C. Gowda, R. S. Naik, G. P. Maguire, C. S. Mgone, M. J. Bockarie, M. Lagog, E. Ibam, K. Lorry, and N. M. Anstey.** 2002. Antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols: inverse association with tolerance of parasitemia in Papua New Guinean children and adults. *Infect Immun* **70**:5052-5057.
32. **Bransky, A., N. Korin, Y. Nemirovski, and U. Dinnar.** 2007. Correlation between erythrocytes deformability and size: a study using a microchannel based cell analyzer. *Microvasc Res* **73**:7-13.
33. **Bratosin, D., J. Mazurier, J. P. Tissier, J. Estaquier, J. J. Huart, J. C. Ameisen, D. Aminoff, and J. Montreuil.** 1998. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* **80**:173-195.
34. **Brooker, S., W. Akhwale, R. Pullan, B. Estambale, S. E. Clarke, R. W. Snow, and P. J. Hotez.** 2007. Epidemiology of *Plasmodium*-helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. *Am J Trop Med Hyg* **77**:88-98.

35. **Bull, P. C., B. S. Lowe, M. Kortok, C. S. Molyneux, C. I. Newbold, and K. Marsh.** 1998. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* **4**:358-360.
36. **Burchard, G. D., P. Radloff, J. Philipps, M. Nkeyi, J. Knobloch, and P. G. Kremsner.** 1995. Increased erythropoietin production in children with severe malarial anemia. *Am J Trop Med Hyg* **53**:547-551.
37. **Cappadoro, M., G. Giribaldi, E. O'Brien, F. Turrini, F. Mannu, D. Ulliers, G. Simula, L. Luzzatto, and P. Arese.** 1998. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* **92**:2527-2534.
38. **Casals-Pascual, C., O. Kai, J. O. Cheung, S. Williams, B. Lowe, M. Nyanoti, T. N. Williams, K. Maitland, M. Molyneux, C. R. Newton, N. Peshu, S. M. Watt, and D. J. Roberts.** 2006. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood* **108**:2569-2577.
39. **Chadburn, A.** 2000. The spleen: anatomy and anatomical function. *Semin Hematol* **37**:13-21.
40. **Chang, K. H., M. Tam, and M. M. Stevenson.** 2004. Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. *Blood* **103**:3727-3735.
41. **Chotivanich, K., R. Udomsangpetch, R. McGready, S. Proux, P. Newton, S. Pukrittayakamee, S. Looareesuwan, and N. J. White.** 2002. Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *J Infect Dis* **185**:1538-1541.
42. **Cissoko, Y., M. Daou, K. E. Lyke, A. Dicko, I. Diarra, A. Kone, A. Guindo, K. Traore, G. Krishnegowda, D. A. Diallo, O. K. Doumbo, C. V. Plowe, D. C. Gowda, and M. B. Sztein.** 2006. Serum antibody levels to glycosylphosphatidylinositols in specimens derived from matched Malian children with severe or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria and healthy controls. *Am J Trop Med Hyg* **75**:199-204.
43. **Clark, I. A., and G. Chaudhri.** 1988. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* **70**:99-103.
44. **Coban, C., K. J. Ishii, T. Kawai, H. Hemmi, S. Sato, S. Uematsu, M. Yamamoto, O. Takeuchi, S. Itagaki, N. Kumar, T. Horii, and S. Akira.** 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* **201**:19-25.
45. **Cohen, S., G. I. Mc, and S. Carrington.** 1961. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* **192**:733-737.
46. **Couper, K. N., R. S. Phillips, F. Brombacher, and J. Alexander.** 2005. Parasite-specific IgM plays a significant role in the protective immune response to asexual erythrocytic stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol* **27**:171-180.
47. **Cox-Singh, J., T. M. Davis, K. S. Lee, S. S. Shamsul, A. Matusop, S. Ratnam, H. A. Rahman, D. J. Conway, and B. Singh.** 2008. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* **46**:165-171.
48. **Cox-Singh, J., and B. Singh.** 2008. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol* **24**:406-410.
49. **Craig, M. L., J. N. Waitumbi, and R. P. Taylor.** 2005. Processing of C3b-opsonized immune complexes bound to non-complement receptor 1 (CR1) sites on red cells: phagocytosis, transfer, and associations with CR1. *J Immunol* **174**:3059-3066.
50. **Davidson, E. A., and D. C. Gowda.** 2001. Glycobiology of *Plasmodium falciparum*. *Biochimie* **83**:601-604.
51. **Day, N. P., T. D. Pham, T. L. Phan, X. S. Dinh, P. L. Pham, V. C. Ly, T. H. Tran, T. H. Nguyen, D. B. Bethell, H. P. Nguyen, and N. J. White.** 1996. Clearance kinetics of parasites and pigment-containing leukocytes in severe malaria. *Blood* **88**:4694-4700.
52. **de Souza, J. B., J. Todd, G. Krishnegowda, D. C. Gowda, D. Kwiatkowski, and E. M. Riley.** 2002. Prevalence and boosting of antibodies to *Plasmodium falciparum*

- glycosylphosphatidylinositols and evaluation of their association with protection from mild and severe clinical malaria. *Infect Immun* **70**:5045-5051.
53. **Devine, D. V.** 1991. The regulation of complement on cell surfaces. *Transfus Med Rev* **5**:123-131.
54. **Dondorp, A. M., B. J. Angus, K. Chotivanich, K. Silamut, R. Ruangveerayuth, M. R. Hardeman, P. A. Kager, J. Vreeken, and N. J. White.** 1999. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* **60**:733-737.
55. **Dondorp, A. M., M. Nyanoti, P. A. Kager, S. Mithwani, J. Vreeken, and K. Marsh.** 2002. The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe falciparum malaria and its restoration by blood transfusion. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **96**:282-286.
56. **Doolan, D. L., C. Dobano, and J. K. Baird.** 2009. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev* **22**:13-36, Table of Contents.
57. **Douki, J. B., Y. Sterkers, C. Lepolard, B. Traore, F. T. Costa, A. Scherf, and J. Gysin.** 2003. Adhesion of normal and *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocytes to endothelial cells and the placenta involves the rhoptry-derived ring surface protein-2. *Blood* **101**:5025-5032.
58. **Dubremetz, J. F., N. Garcia-Reguet, V. Conseil, and M. N. Fourmaux.** 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* **28**:1007-1013.
59. **Dutta, S., J. D. Haynes, J. K. Moch, A. Barbosa, and D. E. Lanar.** 2003. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:12295-12300.
60. **Egan, T. J.** 2008. Haemozoin formation. *Mol Biochem Parasitol* **157**:127-36.
61. **Egan, T. J., W. W. Mavuso, and K. K. Ncokazi.** 2001. The mechanism of beta-hematin formation in acetate solution. Parallels between hemozoin formation and biomineralization processes. *Biochemistry* **40**:204-213.
62. **Ekvall, H.** 2003. Malaria and anemia. *Curr Opin Hematol* **10**:108-114.
63. **Ekvall, H., P. Arese, F. Turrini, K. Ayi, F. Mannu, Z. Premji, and A. Bjorkman.** 2001. Acute haemolysis in childhood falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**:611-617.
64. **Ekvall, H., Z. Premji, and A. Bjorkman.** 1998. Chloroquine treatment for uncomplicated childhood malaria in an area with drug resistance: early treatment failure aggravates anaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**:556-560.
65. **el Hassan, A. M., A. M. Saeed, J. Fandrey, and W. Jelkmann.** 1997. Decreased erythropoietin response in *Plasmodium falciparum* malaria-associated anaemia. *Eur J Haematol* **59**:299-304.
66. **el-Shoura, S. M.** 1993. Falciparum malaria in naturally infected human patients: ultrastructural alterations of non-parasitized red blood cells during anaemia. *Appl Parasitol* **34**:173-179.
67. **Facer, C. A.** 1980. Direct antiglobulin reactions in Gambian children with *P. falciparum* malaria. III. Expression of IgG subclass determinants and genetic markers and association with anaemia. *Clin Exp Immunol* **41**:81-90.
68. **Facer, C. A.** 1980. Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. II. Specificity of erythrocyte-bound IgG. *Clin Exp Immunol* **39**:279-288.
69. **Facer, C. A., R. S. Bray, and J. Brown.** 1979. Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. I. Incidence and class specificity. *Clin Exp Immunol* **35**:119-127.
70. **Florens, L., M. P. Washburn, J. D. Raine, R. M. Anthony, M. Grainger, J. D. Haynes, J. K. Moch, N. Muster, J. B. Sacci, D. L. Tabb, A. A. Witney, D. Wolters, Y. Wu, M. J. Gardner, A. A. Holder, R. E. Sinden, J. R. Yates, and D. J. Carucci.** 2002. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* **419**:520-526.
71. **Frevert, U.** 2004. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol* **20**:417-424.

72. **Frischknecht, F., P. Baldacci, B. Martin, C. Zimmer, S. Thiberge, J. C. Olivo-Marin, S. L. Shorte, and R. Menard.** 2004. Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell Microbiol* **6**:687-694.
73. **Gaur, D., D. C. Mayer, and L. H. Miller.** 2004. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol* **34**:1413-1429.
74. **Gehrs, B. C., and R. C. Friedberg.** 2002. Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol* **69**:258-271.
75. **Gerloff, N.** 2006. Untersuchung zur Malaria-assoziierten Anämie: Charakterisierung von Erythrozyten-bindenden *Plasmodium* Exoantigenen und deren Rezeptoren auf Erythrozyten. Diplomarbeit. Universität Rostock, Rostock.
76. **Gilson, P. R., T. Nebl, D. Vukcevic, R. L. Moritz, T. Sargeant, T. P. Speed, L. Schofield, and B. S. Crabb.** 2006. Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics* **5**:1286-1299.
77. **Ginsburg, H., and M. B. Hoshen.** 2002. Is the development of falciparum malaria in the human host limited by the availability of uninfected erythrocytes? *Malar J* **1**:18.
78. **Giribaldi, G., D. Ulliers, E. Schwarzer, I. Roberts, W. Piacibello, and P. Arese.** 2004. Hemozoin- and 4-hydroxynonenal-mediated inhibition of erythropoiesis. Possible role in malarial dyserythropoiesis and anemia. *Haematologica* **89**:492-493.
79. **Gobbi, F., S. Audagnotto, L. Trentini, I. Nkurunziza, M. Corachan, and G. Di Perri.** 2005. Blackwater fever in children, Burundi. *Emerg Infect Dis* **11**:1118-1120.
80. **Goel, V. K., X. Li, H. Chen, S. C. Liu, A. H. Chishti, and S. S. Oh.** 2003. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5164-5169.
81. **Goka, B. Q., H. Kwarko, J. A. Kurtzhals, B. Gyan, E. Ofori-Adjei, S. A. Ohene, L. Hviid, B. D. Akanmori, and J. Neequaye.** 2001. Complement binding to erythrocytes is associated with macrophage activation and reduced haemoglobin in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**:545-549.
82. **Grau, G. E., T. E. Taylor, M. E. Molyneux, J. J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel, and P. H. Lambert.** 1989. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* **320**:1586-1591.
83. **Greenwood, B. M.** 1987. Asymptomatic malaria infections--do they matter? *Parasitol Today* **3**:206-214.
84. **Greenwood, B. M., D. Stratton, W. A. Williamson, and I. Mohammed.** 1978. A study of the role of immunological factors in the pathogenesis of the anaemia of acute malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**:378-385.
85. **Greve, B., P. G. Kremsner, B. Lell, D. Luckner, and D. Schmid.** 2000. Malarial anaemia in African children associated with high oxygen-radical production. *Lancet* **355**:40-41.
86. **Greve, B., L. G. Lehman, B. Lell, D. Luckner, R. Schmidt-Ott, and P. G. Kremsner.** 1999. High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* **179**:1584-1586.
87. **Griffiths, M. J., F. Ndungu, K. L. Baird, D. P. Muller, K. Marsh, and C. R. Newton.** 2001. Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol* **113**:486-491.
88. **Grobusch, M. P., T. Hanscheid, B. Kramer, J. Neukammer, J. May, J. Seybold, J. F. Kun, and N. Suttorp.** 2003. Sensitivity of hemozoin detection by automated flow cytometry in non- and semi-immune malaria patients. *Cytometry B Clin Cytom* **55**:46-51.
89. **Groux, H., and J. Gysin.** 1990. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res Immunol* **141**:529-542.
90. **Gupta, S., R. W. Snow, C. A. Donnelly, K. Marsh, and C. Newbold.** 1999. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* **5**:340-343.
91. **Guthrie, N., I. E. Crandall, S. Marini, G. F. Fasciglione, and I. W. Sherman.** 1995. Monoclonal antibodies that react with human band 3 residues 542-555 recognize

- different conformations of this protein in uninfected and *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Cell Biochem* **144**:117-123.
92. **Haidaris, C. G., J. D. Haynes, M. S. Meltzer, and A. C. Allison.** 1983. Serum containing tumor necrosis factor is cytotoxic for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* **42**:385-393.
93. **Hanscheid, T., M. Langin, B. Lell, M. Potschke, S. Oyakhrome, P. G. Kremsner, and M. P. Grobusch.** 2008. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. *Malar J* **7**:109.
94. **Hanscheid, T., J. Melo-Cristino, and B. G. Pinto.** 2001. Automated detection of malaria pigment in white blood cells for the diagnosis of malaria in Portugal. *Am J Trop Med Hyg* **64**:290-292.
95. **Hanscheid, T., B. G. Pinto, I. Pereira, J. M. Cristino, and E. Valadas.** 1999. Avoiding misdiagnosis of malaria: a novel automated method allows specific diagnosis, even in the absence of clinical suspicion. *Emerg Infect Dis* **5**:836-838.
96. **Hanscheid, T., E. Valadas, and M. P. Grobusch.** 2000. Automated malaria diagnosis using pigment detection. *Parasitol Today* **16**:549-551.
97. **Hansen, O. P., T. M. Hansen, H. Jans, and E. Hippe.** 1984. Red blood cell membrane-bound IgG: demonstration of antibodies in patients with autoimmune haemolytic anaemia and immune complexes in patients with rheumatic diseases. *Clin Lab Haematol* **6**:341-349.
98. **Helegbe, G. K., B. Q. Goka, J. A. Kurtzhals, M. M. Addae, E. Ollaga, J. K. Tetteh, D. Dodoo, M. F. Ofori, G. Obeng-Adjei, K. Hirayama, G. A. Awandare, and B. D. Akanmori.** 2007. Complement activation in Ghanaian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J* **6**:165.
99. **Hempelmann, E.** 2006. Hemozoin biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. *Parasitol Res.*
100. **Hill, A. V., C. E. Allsopp, D. Kwiatkowski, N. M. Anstey, P. Twumasi, P. A. Rowe, S. Bennett, D. Brewster, A. J. McMichael, and B. M. Greenwood.** 1991. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* **352**:595-600.
101. **Hiller, N. L., S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estrano, and K. Haldar.** 2004. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* **306**:1934-1937.
102. **Ho, M., N. J. White, S. Looareesuwan, Y. Wattanagoon, S. H. Lee, M. J. Walport, D. Bunnag, and T. Harinasuta.** 1990. Splenic Fc receptor function in host defense and anemia in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* **161**:555-561.
103. **Hoffmann, J. J., and J. M. Pennings.** 1999. Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites. *Clin Lab Haematol* **21**:257-260.
104. **Hommel, M., P. H. David, and L. D. Oligino.** 1983. Surface alterations of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. Antigenic variation, antigenic diversity, and the role of the spleen. *J Exp Med* **157**:1137-1148.
105. **Ilangumaran, S., P. J. Robinson, and D. C. Hoessli.** 1996. Transfer of exogenous glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked molecules to plasma membranes. *Trends Cell Biol* **6**:163-167.
106. **Jacobs, P., D. Radzioch, and M. M. Stevenson.** 1996. A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* **64**:535-541.
107. **Jakeman, G. N., A. Saul, W. L. Hogarth, and W. E. Collins.** 1999. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology* **119 (Pt 2)**:127-133.
108. **Jootar, S., W. Chaisiripoomkere, P. Pholvicha, A. Leelasiri, W. Prayoonwiwat, W. Mongkonsvitragoon, and T. Srichaikul.** 1993. Suppression of erythroid progenitor cells during malarial infection in Thai adults caused by serum inhibitor. *Clin Lab Haematol* **15**:87-92.

109. **Kamena, F., M. Tamborrini, X. Liu, Y. U. Kwon, F. Thompson, G. Pluschke, and P. H. Seeberger.** 2008. Synthetic GPI array to study antitoxic malaria response. *Nat Chem Biol* **4**:238-240.
110. **Kariuki, M. M., X. Li, I. Yamodo, A. H. Chishti, and S. S. Oh.** 2005. Two *Plasmodium falciparum* merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. *Biochem Biophys Res Commun* **338**:1690-1695.
111. **Kassim, O. O., K. A. Ako-Anai, S. E. Torimiro, G. P. Hollowell, V. C. Okoye, and S. K. Martin.** 2000. Inhibitory factors in breastmilk, maternal and infant sera against *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* malaria parasite. *J Trop Pediatr* **46**:92-96.
112. **Kauth, C. W., U. Woehlbier, M. Kern, Z. Mekonnen, R. Lutz, N. Mucke, J. Langowski, and H. Bujard.** 2006. Interactions between merozoite surface proteins 1, 6, and 7 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **281**:31517-31527.
113. **Kay, M. M.** 2004. Band 3 and its alterations in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **50**:117-138.
114. **Kay, M. M.** 1975. Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages *in situ*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:3521-3525.
115. **Kay, M. M., N. Flowers, J. Goodman, and G. Bosman.** 1989. Alteration in membrane protein band 3 associated with accelerated erythrocyte aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5834-5838.
116. **Kay, M. M., and J. Goodman.** 2003. Immunoregulation of cellular lifespan: physiologic autoantibodies and their peptide antigens. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **49**:217-243.
117. **Keller, C. C., C. Ouma, Y. Ouma, G. A. Awandare, G. C. Davenport, T. Were, J. B. Hittner, J. M. Vulule, J. M. Ong'echa, and D. J. Perkins.** 2009. Suppression of a Novel Hematopoietic Mediator in Children with Severe Malarial Anemia. *Infect Immun* **77**:3864-3871.
118. **Khattab, A., C. Reinhardt, T. Staalsoe, N. Fievet, P. G. Kremsner, P. Deloron, L. Hviid, and M. Q. Klinkert.** 2004. Analysis of IgG with specificity for variant surface antigens expressed by placental *Plasmodium falciparum* isolates. *Malar J* **3**:21.
119. **Kiefer, C. R., and L. M. Snyder.** 2000. Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* **7**:113-116.
120. **Kooyman, D. L., G. W. Byrne, S. McClellan, D. Nielsen, M. Tone, H. Waldmann, T. M. Coffman, K. R. McCurry, J. L. Platt, and J. S. Logan.** 1995. *In vivo* transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science* **269**:89-92.
121. **Korenromp, E. L., J. R. Armstrong-Schellenberg, B. G. Williams, B. L. Nahlen, and R. W. Snow.** 2004. Impact of malaria control on childhood anaemia in Africa -- a quantitative review. *Trop Med Int Health* **9**:1050-1065.
122. **Koussis, K., C. Withers-Martinez, S. Yeoh, M. Child, F. Hackett, E. Knuepfer, L. Juliano, U. Woehlbier, H. Bujard, and M. J. Blackman.** 2009. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *Embo J* **28**:725-735.
123. **Kowanko, I. C., A. Ferrante, G. Clemente, and L. M. Kumaratilake.** 1996. Tumor necrosis factor primes neutrophils to kill *Staphylococcus aureus* by an oxygen-dependent mechanism and *Plasmodium falciparum* by an oxygen-independent mechanism. *Infect. Immun* **64**:3435-3437.
124. **Krishnegowda, G., A. M. Hajjar, J. Zhu, E. J. Douglass, S. Uematsu, S. Akira, A. S. Woods, and D. C. Gowda.** 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* **280**:8606-8616.
125. **Kumaratilake, L. M., and A. Ferrante.** 2000. Opsonization and phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites measured by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**:9-13.
126. **Kun, J. F., B. Mordmuller, D. J. Perkins, J. May, O. Mercereau-Puijalon, M. Alpers, J. B. Weinberg, and P. G. Kremsner.** 2001. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-

- 954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis* **184**:330-336.
127. Kurtzhals, J. A., M. M. Addae, B. D. Akanmori, S. Dunyo, K. A. Koram, M. A. Appawu, F. K. Nkrumah, and L. Hviid. 1999. Anaemia caused by asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune African schoolchildren. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**:623-627.
128. Kurtzhals, J. A., O. Rodrigues, M. Addae, J. O. Commey, F. K. Nkrumah, and L. Hviid. 1997. Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol* **97**:169-174.
129. Kwiatkowski, D. 1995. Malarial toxins and the regulation of parasite density. *Parasitol Today* **11**:206-212.
130. Kwiatkowski, D., A. V. Hill, I. Sambou, P. Twumasi, J. Castracane, K. R. Manogue, A. Cerami, D. R. Brewster, and B. M. Greenwood. 1990. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* **336**:1201-1204.
131. Lauc, G., and M. Heffer-Lauc. 2006. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta* **1760**:584-602.
132. Layez, C., P. Nogueira, V. Combes, F. T. Costa, I. Juhan-Vague, L. H. da Silva, and J. Gysin. 2005. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood* **106**:3632-3638.
133. Lee, S. H., S. Looareesuwan, Y. Wattanagoon, M. Ho, V. Wuthiekanun, N. Vilaiwanna, D. J. Weatherall, and N. J. White. 1989. Antibody-dependent red cell removal during *P. falciparum* malaria: the clearance of red cells sensitized with an IgG anti-D. *Br J Haematol* **73**:396-402.
134. Lew, V. L., T. Tiffert, and H. Ginsburg. 2003. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* **101**:4189-4194.
135. Li, X., H. Chen, T. H. Oo, T. M. Daly, L. W. Bergman, S. C. Liu, A. H. Chishti, and S. S. Oh. 2004. A co-ligand complex anchors *Plasmodium falciparum* merozoites to the erythrocyte invasion receptor band 3. *J Biol Chem* **279**:5765-5771.
136. Liu, S. C., L. H. Derick, and J. Palek. 1987. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J Cell Biol* **104**:527-536.
137. Looareesuwan, S., T. M. Davis, S. Pukrittayakamee, W. Supanaranond, V. Desakorn, K. Silamut, S. Krishna, S. Boonamrung, and N. J. White. 1991. Erythrocyte survival in severe falciparum malaria. *Acta Trop* **48**:263-270.
138. Looareesuwan, S., M. Ho, Y. Wattanagoon, N. J. White, D. A. Warrell, D. Bunnag, T. Harinasuta, and D. J. Wyler. 1987. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med* **317**:675-679.
139. Looareesuwan, S., A. H. Merry, R. E. Phillips, R. Pleehachinda, Y. Wattanagoon, M. Ho, P. Charoenlarp, D. A. Warrell, and D. J. Weatherall. 1987. Reduced erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients. *Br J Haematol* **67**:473-478.
140. Lucius, R., and B. Loos-Frank. 2008. *Biologie von Parasiten.*, vol. 2. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
141. Lusingu, J. P., A. T. Jensen, L. S. Vestergaard, D. T. Minja, M. B. Dalgaard, S. Gesase, B. P. Mmbando, A. Y. Kitua, M. M. Lemnge, D. Cavanagh, L. Hviid, and T. G. Theander. 2006. Levels of plasma immunoglobulin G with specificity against the cysteine-rich interdomain regions of a semiconserved *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1, VAR4, predict protection against malarial anemia and febrile episodes. *Infect Immun* **74**:2867-2875.
142. Lutz, H. U., S. Fasler, P. Stammer, F. Bussolino, and P. Arese. 1988. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and complement in phagocytosis of oxidatively-stressed and in clearance of senescent red cells. *Blood Cells* **14**:175-203.

143. **Lux, S. E., K. M. John, R. R. Kopito, and H. F. Lodish.** 1989. Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:9089-9093.
144. **Lyke, K. E., D. A. Diallo, A. Dicko, A. Kone, D. Coulibaly, A. Guindo, Y. Cissoko, L. Sangare, S. Coulibaly, B. Dakouo, T. E. Taylor, O. K. Doumbo, and C. V. Plowe.** 2003. Association of intraleukocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* **69**:253-259.
145. **Maier, A. G., J. Baum, B. Smith, D. J. Conway, and A. F. Cowman.** 2009. Polymorphisms in erythrocyte binding antigens 140 and 181 affect function and binding but not receptor specificity in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* **77**:1689-1699.
146. **Maitland, K., T. N. Williams, T. E. Peto, K. P. Day, J. B. Clegg, D. J. Weatherall, and D. K. Bowden.** 1997. Absence of malaria-specific mortality in children in an area of hyperendemic malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**:562-566.
147. **Marti, M., R. T. Good, M. Rug, E. Knuepfer, and A. F. Cowman.** 2004. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* **306**:1930-1933.
148. **Martiney, J. A., B. Sherry, C. N. Metz, M. Espinoza, A. S. Ferrer, T. Calandra, H. E. Broxmeyer, and R. Bucala.** 2000. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun* **68**:2259-2267.
149. **May, J., J. A. Evans, C. Timmann, C. Ehmen, W. Busch, T. Thye, T. Agbenyega, and R. D. Horstmann.** 2007. Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. *Jama* **297**:2220-2226.
150. **Mayxay, M., K. Chotivanich, S. Pukrittayakamee, P. Newton, S. Looareesuwan, and N. J. White.** 2001. Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* **65**:918-923.
151. **Mehlhorn, H., and G. Piekarski.** 1998. *Grundriß der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere.*, vol. 5. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
152. **Menendez, C., A. F. Fleming, and P. L. Alonso.** 2000. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* **16**:469-476.
153. **Merry, A. H., S. Looareesuwan, R. E. Phillips, P. Chanthavanich, W. Supanaranond, D. A. Warrell, and D. J. Weatherall.** 1986. Evidence against immune haemolysis in falciparum malaria in Thailand. *Br J Haematol* **64**:187-194.
154. **Metzger, W. G., B. G. Mordmuller, and P. G. Kremsner.** 1995. Malaria pigment in leucocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**:637-638.
155. **Miller, L. H., D. I. Baruch, K. Marsh, and O. K. Doumbo.** 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**:673-679.
156. **Miller, L. H., S. J. Mason, D. F. Clyde, and M. H. McGinniss.** 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* **295**:302-304.
157. **Modiano, D., G. Luoni, B. S. Sirima, J. Simporé, F. Verra, A. Konate, E. Rastrelli, A. Olivieri, C. Calissano, G. M. Paganotti, L. D'Urbano, I. Sanou, A. Sawadogo, G. Modiano, and M. Coluzzi.** 2001. Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **414**:305-308.
158. **Mohan, K., and M. M. Stevenson.** 1998. Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with malaria correlate with deficient interleukin-12 production. *Br J Haematol* **103**:942-949.
159. **Mohandas, N., and P. G. Gallagher.** 2008. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* **112**:3939-3948.
160. **Mota, M. M., J. C. Hafalla, and A. Rodriguez.** 2002. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med* **8**:1318-1322.
161. **Moulds, J. M., P. A. Zimmerman, O. K. Doumbo, L. Kassambara, I. Sagara, D. A. Diallo, J. P. Atkinson, M. Krych-Goldberg, R. E. Huhart, D. E. Hourcade, D. T.**

- McNamara, D. J. Birmingham, J. A. Rowe, J. J. Moulds, and L. H. Miller.** 2001. Molecular identification of Knops blood group polymorphisms found in long homologous region D of complement receptor 1. *Blood* **97**:2879-2885.
162. **N.N.** 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.
163. **N.N.** 2000. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94 Suppl. 1**:S1-S90.
164. **N.N.** 2008. WHO world malaria report 2008.
165. **Naik, R. S., O. H. Branch, A. S. Woods, M. Vijaykumar, D. J. Perkins, B. L. Nahlen, A. A. Lal, R. J. Cotter, C. E. Costello, C. F. Ockenhouse, E. A. Davidson, and D. C. Gowda.** 2000. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med* **192**:1563-1576.
166. **Nebl, T., M. J. De Veer, and L. Schofield.** 2005. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology* **130 Suppl.**:S45-S62.
167. **Newton, P. N., K. Chotivanich, W. Chierakul, R. Ruangveerayuth, P. Teerapong, K. Silamut, S. Looareesuwan, and N. J. White.** 2001. A comparison of the in vivo kinetics of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen-positive and -negative erythrocytes. *Blood* **98**:450-457.
168. **Nguyen, P. H., N. Day, T. D. Pram, D. J. Ferguson, and N. J. White.** 1995. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**:200-204.
169. **Nuchsongsin, F., K. Chotivanich, P. Charunwatthana, F. Omodeo-Sale, D. Taramelli, N. P. Day, N. J. White, and A. M. Dondorp.** 2007. Effects of malaria heme products on red blood cell deformability. *Am J Trop Med Hyg* **77**:617-22.
170. **Nussenblatt, V., G. Mukasa, A. Metzger, G. Ndeezi, E. Garrett, and R. D. Semba.** 2001. Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:1164-1170.
171. **O'Donnell, R. A., and M. J. Blackman.** 2005. The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion. *Curr Opin Microbiol* **8**:422-427.
172. **Odiambo, C. O., W. Otieno, C. Adhiambo, M. M. Odera, and J. A. Stoute.** 2008. Increased deposition of C3b on red cells with low CR1 and CD55 in a malaria-endemic region of western Kenya: implications for the development of severe anemia. *BMC Med* **6**:23.
173. **Omodeo-Sale, F., A. Motti, N. Basilico, S. Parapini, P. Olliaro, and D. Taramelli.** 2003. Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood* **102**:705-711.
174. **Ophorst, O. J., K. Radosevic, K. Ouwehand, W. van Beem, R. Mintardjo, J. Sijtsma, J. Kaspers, A. Companjen, L. Holterman, J. Goudsmit, and M. J. Havenga.** 2006. Expression and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein: The role of GPI signal sequence. *Vaccine*.
175. **Othoro, C., A. A. Lal, B. Nahlen, D. Koech, A. S. Orago, and V. Udhayakumar.** 1999. A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis* **179**:279-282.
176. **Owuor, B. O., C. O. Odiambo, W. O. Otieno, C. Adhiambo, D. W. Makawiti, and J. A. Stoute.** 2008. Reduced immune complex binding capacity and increased complement susceptibility of red cells from children with severe malaria-associated anemia. *Mol Med* **14**:89-97.
177. **Pagola, S., P. W. Stephens, D. S. Bohle, A. D. Kosar, and S. K. Madsen.** 2000. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature* **404**:307-310.
178. **Parroche, P., F. N. Lauw, N. Goutagny, E. Latz, B. G. Monks, A. Visintin, K. A. Halmen, M. Lamphier, M. Olivier, D. C. Bartholomeu, R. T. Gazzinelli, and D. T.**

- Golenbock.** 2007. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:1919-1924.
179. **Pasvol, G.** 2001. Cell-cell interaction in the pathogenesis of severe falciparum malaria. *Clin Med* **1**:495-500.
180. **Pasvol, G., D. J. Weatherall, and R. J. Wilson.** 1977. Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature* **270**:171-173.
181. **Phillips, R. E., S. Looareesuwan, D. A. Warrell, S. H. Lee, J. Karbwang, M. J. Warrell, N. J. White, C. Swasdichai, and D. J. Weatherall.** 1986. The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *Q J Med* **58**:305-323.
182. **Phillips, R. E., and G. Pasvol.** 1992. Anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *Baillieres Clin Haematol* **5**:315-330.
183. **Pichyangkul, S., P. Saengkrai, and H. K. Webster.** 1994. *Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Am J Trop Med Hyg* **51**:430-435.
184. **Pierce, S. K., and L. H. Miller.** 2009. World Malaria Day 2009: what malaria knows about the immune system that immunologists still do not. *J Immunol* **182**:5171-5177.
185. **Pinder, J. C., R. E. Fowler, A. R. Dluzewski, L. H. Bannister, F. M. Lavin, G. H. Mitchell, R. J. Wilson, and W. B. Gratzer.** 1998. Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *J Cell Sci* **111 (Pt 13)**:1831-1839.
186. **Preiser, P., M. Kaviratne, S. Khan, L. Bannister, and W. Jarra.** 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* **2**:1461-1477.
187. **Premkumar, D. R., Y. Fukuoka, D. Sevillever, E. Brunschwig, T. L. Rosenberry, M. L. Tykocinski, and M. E. Medof.** 2001. Properties of exogenously added GPI-anchored proteins following their incorporation into cells. *J Cell Biochem* **82**:234-245.
188. **Price, R. N., J. A. Simpson, F. Nosten, C. Luxemburger, L. Hkijaroen, F. ter Kuile, T. Chongsuphaisiddhi, and N. J. White.** 2001. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* **65**:614-622.
189. **Proellocks, N. I., S. Kovacevic, D. J. Ferguson, L. M. Kats, B. J. Morahan, C. G. Black, K. L. Waller, and R. L. Coppel.** 2007. *Plasmodium falciparum* Pf34, a novel GPI-anchored rhoptry protein found in detergent-resistant microdomains. *Int J Parasitol* **37**:1233-1241.
190. **Prusty, S. K., and B. S. Das.** 2001. Low incidence of the severe complications of malaria and absence of malaria-specific mortality, in Tensa, Sundergarh district, Orissa state, India, an area hyper-endemic for malaria. *Ann Trop Med Parasitol* **95**:133-140.
191. **Rifkin, M. R., and F. R. Landsberger.** 1990. Trypanosome variant surface glycoprotein transfer to target membranes: a model for the pathogenesis of trypanosomiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:801-805.
192. **Riley, E. M., G. E. Wagner, M. F. Ofori, J. G. Wheeler, B. D. Akanmori, K. Tetteh, D. McGuinness, S. Bennett, F. K. Nkrumah, R. F. Anders, and K. A. Koram.** 2000. Lack of association between maternal antibody and protection of African infants from malaria infection. *Infect Immun* **68**:5856-5863.
193. **Roggwiller, E., M. E. Betoulle, T. Blisnick, and C. Braun Breton.** 1996. A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **82**:13-24.
194. **Rosenberg, E. B., G. T. Strickland, S. L. Yang, and G. E. Whalen.** 1973. IgM antibodies to red cells and autoimmune anemia in patients with malaria. *Am J Trop Med Hyg* **22**:146-152.
195. **Rosenberg, Y. J.** 1978. Autoimmune and polyclonal B cell responses during murine malaria. *Nature* **274**:170-172.

196. **Rowe, J. A., I. G. Handel, M. A. Thera, A. M. Deans, K. E. Lyke, A. Kone, D. A. Diallo, A. Raza, O. Kai, K. Marsh, C. V. Plowe, O. K. Doumbo, and J. M. Moulds.** 2007. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:17471-17476.
197. **Rowe, J. A., J. Obiero, K. Marsh, and A. Raza.** 2002. Short report: Positive correlation between rosetting and parasitemia in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Am J Trop Med Hyg* **66**:458-460.
198. **Rowe, J. A., J. Shafi, O. K. Kai, K. Marsh, and A. Raza.** 2002. Nonimmune IgM, but not IgG binds to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and correlates with rosetting and severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* **66**:692-699.
199. **Sanchez-Torres, C., G. S. Garcia-Romo, M. A. Cornejo-Cortes, A. Rivas-Carvalho, and G. Sanchez-Schmitz.** 2001. CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *Int Immunol* **13**:1571-1581.
200. **Schnitzer, B., T. Sodeman, M. L. Mead, and P. G. Contacos.** 1972. Pitting function of the spleen in malaria: ultrastructural observations. *Science* **177**:175-177.
201. **Schofield, L., and F. Hackett.** 1993. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* **177**:145-153.
202. **Schofield, L., M. C. Hewitt, K. Evans, M. A. Siomos, and P. H. Seeberger.** 2002. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature* **418**:785-789.
203. **Schwarzer, E., F. Turrini, G. Giribaldi, M. Cappadoro, and P. Arese.** 1993. Phagocytosis of *P. falciparum* malarial pigment hemozoin by human monocytes inactivates monocyte protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* **1181**:51-54.
204. **Schwarzer, E., F. Turrini, D. Ulliers, G. Giribaldi, H. Ginsburg, and P. Arese.** 1992. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* **176**:1033-1041.
205. **Scott, C. S., D. van Zyl, E. Ho, D. Meyersfeld, L. Ruivo, B. V. Mendelow, and T. L. Coetzer.** 2003. Automated detection of malaria-associated intraleucocytic haemozoin by Cell-Dyn CD4000 depolarization analysis. *Clin Lab Haematol* **25**:77-86.
206. **Sehgal, V. M., W. A. Siddjiqui, and M. P. Alpers.** 1989. A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **83 Suppl.**:105-106.
207. **Sherman, I. W., S. Eda, and E. Winograd.** 2004. Erythrocyte aging and malaria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **50**:159-169.
208. **Shiono, H., Y. Yagi, A. Kumar, M. Yamanaka, and Y. Chikayama.** 2004. Accelerated binding of autoantibody to red blood cells with increasing anaemia in cattle experimentally infected with *Theileria sergenti*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:39-42.
209. **Sim, B. K., C. E. Chitnis, K. Wasniowska, T. J. Hadley, and L. H. Miller.** 1994. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* **264**:1941-1944.
210. **Singh, B., L. Kim Sung, A. Matusop, A. Radhakrishnan, S. S. Shamsul, J. Cox-Singh, A. Thomas, and D. J. Conway.** 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* **363**:1017-1024.
211. **Slater, A. F., W. J. Swiggard, B. R. Orton, W. D. Flitter, D. E. Goldberg, A. Cerami, and G. B. Henderson.** 1991. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:325-329.
212. **Sloand, E. M., J. P. Maciejewski, D. Dunn, J. Moss, B. Brewer, M. Kirby, and N. S. Young.** 1998. Correction of the PNH defect by GPI-anchored protein transfer. *Blood* **92**:4439-4445.
213. **Snow, R. W., C. A. Guerra, A. M. Noor, H. Y. Myint, and S. I. Hay.** 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **434**:214-217.

214. **Somner, E. A., J. Black, and G. Pasvol.** 2000. Multiple human serum components act as bridging molecules in rosette formation by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood* **95**:674-682.
215. **Staalsoe, T., H. A. Giha, D. Dodoo, T. G. Theander, and L. Hviid.** 1999. Detection of antibodies to variant antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by flow cytometry. *Cytometry* **35**:329-336.
216. **Stephenson, L. S., M. C. Latham, K. M. Kurz, S. N. Kinoti, M. L. Oduori, and D. W. Crompton.** 1985. Relationships of *Schistosoma haematobium*, hookworm and malarial infections and metrifonate treatment to growth of Kenyan school children. *Am J Trop Med Hyg* **34**:1109-1118.
217. **Sterkers, Y., C. Scheidig, M. da Rocha, C. Lepolard, J. Gysin, and A. Scherf.** 2007. Members of the Low-Molecular-Mass Rhoptry Protein Complex of *Plasmodium falciparum* Bind to the Surface of Normal Erythrocytes. *J Infect Dis* **196**:617-621.
218. **Stoute, J. A., A. O. Odindo, B. O. Owuor, E. K. Mibei, M. O. Opollo, and J. N. Waitumbi.** 2003. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *J Infect Dis* **187**:522-525.
219. **Sturm, A., R. Amino, C. van de Sand, T. Regen, S. Retzlaff, A. Rennenberg, A. Krueger, J. M. Pollok, R. Menard, and V. T. Heussler.** 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **313**:1287-1290.
220. **Sturm, A., and V. Heussler.** 2007. Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol* **196**:127-133.
221. **Takeyama, N., T. Yabuki, T. Kumagai, S. Takagi, S. Takamoto, and H. Noguchi.** 2007. Selective expansion of the CD14(+)/CD16(bright) subpopulation of circulating monocytes in patients with hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol* **86**:787-792.
222. **Thelu, J., I. Sheick-Zakiuddin, C. Boudin, F. Peyron, S. Picot, and P. Ambroise-Thomas.** 1991. Development of natural immunity in *Plasmodium falciparum* malaria: study of antibody response by Western immunoblotting. *J Clin Microbiol* **29**:510-518.
223. **Thomas, L.** 1998. Labor und Diagnose - Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik., vol. 5. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main.
224. **Thompson, J. K., T. Triglia, M. B. Reed, and A. F. Cowman.** 2001. A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. *Mol Microbiol* **41**:47-58.
225. **Trape, J. F.** 2001. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* **64**:12-17.
226. **Treeck, M., S. Zacherl, S. Herrmann, A. Cabrera, M. Kono, N. S. Struck, K. Engelberg, S. Haase, F. Frischknecht, K. Miura, T. Spielmann, and T. W. Gilberger.** 2009. Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. *PLoS Pathog* **5**:e1000322.
227. **Urban, B. C., T. T. Hien, N. P. Day, N. H. Phu, R. Roberts, E. Pongponratn, M. Jones, N. T. Mai, D. Bethell, G. D. Turner, D. Ferguson, N. J. White, and D. J. Roberts.** 2005. Fatal *Plasmodium falciparum* malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization. *Infect Immun* **73**:1986-1994.
228. **Van den Ende, J., G. Coppens, T. Verstraeten, T. Van Haegenborgh, K. Depraetere, A. Van Gompel, E. Van den Enden, J. Clerinx, R. Colebunders, W. E. Peetermans, and W. Schroyens.** 1998. Recurrence of blackwater fever: triggering of relapses by different antimalarials. *Trop Med Int Health* **3**:632-639.
229. **Vijaykumar, M., R. S. Naik, and D. C. Gowda.** 2001. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *J Biol Chem* **276**:6909-6912.
230. **Wahlgren, M., H. Perlmann, K. Berzins, A. Bjorkman, A. Larsson, I. Ljungstrom, M. E. Patarroy, and P. Perlmann.** 1986. Characterization of the humoral immune response

- in *Plasmodium falciparum* malaria. III. Factors influencing the coexpression of antibody isotypes (IgM and IgG-1 to 4). Clin Exp Immunol **63**:343-353.
231. **Waitumbi, J. N., B. Donvito, A. Kisserli, J. H. Cohen, and J. A. Stoute.** 2004. Age-related changes in red blood cell complement regulatory proteins and susceptibility to severe malaria. J Infect Dis **190**:1183-1191.
232. **Waitumbi, J. N., M. O. Opollo, R. O. Muga, A. O. Misore, and J. A. Stoute.** 2000. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. Blood **95**:1481-1486.
233. **Wakelin, D.** 1996. Immunity to parasites: how parasitic infections are controlled., vol. 2. Cambridge University Press, New York.
234. **Wever, P. C., Y. M. Henskens, P. A. Kager, J. Dankert, and T. van Gool.** 2002. Detection of imported malaria with the Cell-Dyn 4000 hematology analyzer. J Clin Microbiol **40**:4729-4731.
235. **Wickramasinghe, S. N., and S. H. Abdalla.** 2000. Blood and bone marrow changes in malaria. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol **13**:277-299.
236. **Williams, T. N.** 2009. Human genetic resistance to malaria. Adv Exp Med Biol **634**:243-253.
237. **Williams, T. N.** 2006. Human red blood cell polymorphisms and malaria. Curr Opin Microbiol **9**:388-394.
238. **Williams, T. N., T. W. Mwangi, D. J. Roberts, N. D. Alexander, D. J. Weatherall, S. Wambua, M. Kortok, R. W. Snow, and K. Marsh.** 2005. An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait. PLoS Med **2**:e128.
239. **Williams, T. N., T. W. Mwangi, S. Wambua, N. D. Alexander, M. Kortok, R. W. Snow, and K. Marsh.** 2005. Sickle cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. J Infect Dis **192**:178-186.
240. **Winograd, E., J. R. Greenan, and I. W. Sherman.** 1987. Expression of senescent antigen on erythrocytes infected with a knobby variant of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A **84**:1931-1935.
241. **Woodruff, A. W., V. E. Ansdell, and L. E. Pettitt.** 1979. Cause of anaemia in malaria. Lancet **1**:1055-1057.
242. **Wykes, M. N., Y. H. Zhou, X. Q. Liu, and M. F. Good.** 2005. *Plasmodium yoelii* can ablate vaccine-induced long-term protection in mice. J Immunol **175**:2510-2516.
243. **Zhu, J., G. Krishnegowda, and D. C. Gowda.** 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. J Biol Chem **280**:8617-8627.
244. **Zwaal, R. F., and A. J. Schroit.** 1997. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. Blood **89**:1121-1132.

11 Einstufung und Kennzeichnung von Gefahrstoffen

Die verwendeten Chemikalien wurden nach §6 der Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) sowie nach der europäischen Richtlinie 67/548/EWG, Anhänge II, III, IV, und nach GHS wie folgt eingestuft.

Tabelle 6: Verwendete Gefahrstoffe.

Chemikalie	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Ethidiumbromid	T+	22-26-68	28-36/37-45-63
N,N-Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-60
N,N-Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45
6-Maleimidohexansäure-N-hydrosuccinimidester	Xn	36/37/38-40	26-36/37
β -Mercaptoethanol	T, N	23/24/25-38-41-43-50/53	26-36/37/39-45-60-61
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28-45-60-61
Triton X-100	Xn, N	22-41-51/53	26-39-61

Keiner der verwendeten Stoffe fällt in die Kategorie I oder II der krebserzeugenden, erbgutverändernden und fortpflanzungsgefährdenden Stoffe (KMR-Stoffe).

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. **Norbert W. Brattig** für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg, für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit und seine ständige Bereitschaft zu Diskussionen.

Ich möchte mich bei Prof. **Rolf D. Horstmann** und PD Dr. **Norbert W. Brattig** für die Ermöglichung der Durchführung der Studien in Kumasi, Ghana, sowie die finanzielle Unterstützung bedanken.

Weiterhin möchte ich Prof. **Peter Heisig** für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch herzlich bei Prof. **Peter H. Seeberger** sowie **Xinyu Liu** und **Faustin Kamena** aus Zürich in der Schweiz für die gute Kooperation bedanken. Herr **Xinyu Liu** hat die verschiedenen *P.f.*-GPIs im Labor synthetisiert und mir zur Verfügung gestellt. Herrn **Faustin Kamena** danke ich für die Entwicklung und Durchführung des Mikroarraytests.

Nicht zu vergessen ist der **DAAD**, der mich mit seinem Teilstipendium finanziell unterstützt hat.

Mein Kollege **Frank Geisinger** stand mir immer wieder mit Rat und Tat zur Seite und hat mit seinem Humor den Alltag angenehm aufgelockert. Vielen Dank!

Von Prof. **Thomas Hänscheid** in Lissabon habe ich eine Menge über Durchflusszytometrie und Hämozoin gelernt, wofür ich mich ebenfalls ganz herzlich bedanke.

Ich danke Prof. **Margaret Frempong** und Prof. **Tsiri Agbenyega** von der Kwame Nkrumah University of Science and Technology sowie Dr. **Thomas Kruppa** aus dem KCCR und Dr. **Daniel Ansong** aus dem KATH in Kumasi, Ghana, dafür, dass Sie mir den Weg zur Durchführung der Anämie studie geebnet haben.

Ich danke auch den Mitarbeitern des **KCCR**, denn sie machten meine Aufenthalte in Ghana einzigartig.

Ich danke den **Arbeitsgruppen Gilberger** und **Horstmann** im Haus für die vielen Anregungen und Hilfen, gerade zu Beginn der Arbeit.

Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei **Michaela Petter** und **Nadine Schreiber** für zahllose kritische Diskussionen und tolle Mittagspausen bedanken.

Ich danke **meinen Freunden** für die vielen aufbauenden und motivierenden Gespräche in allen Lebenslagen. Ohne sie hätte diese Arbeit sicher länger gedauert und hätte weniger Spaß gemacht.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Christian** für seine unerschütterliche Zuversicht und Geduld.

Zum Schluss geht mein herzlicher Dank an **meine Eltern**, die mir durch ihre großartige Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

Publikationen

- **Artikel**

Brattig NW, Kowalsky K, Liu X, Burchard GD, Kamena F, Seeberger PH
“*Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol toxin interacts with the membrane of nonparasitized red blood cells: a putative mechanism contributing to malaria anemia” *Microbes Infect.* 2008 Jul;10(8):885-91

- **Vortrag**

„*Plasmodium falciparum* GPI interacts with erythrocyte membranes and is recognised by antibodies of a *P. falciparum*-infected person“ *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg*

- **Poster**

„*Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol (malaria toxin) interacts with erythrocyte membranes eliciting a recognition by antibodies from *P. falciparum*-infected persons“ *Kongress der Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London*

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst worden ist. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und die den benutzen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen. Auch früher habe ich mich um keine Promotion bemüht.

Hamburg, den

Katharina Kowalsky