

**Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen  
Direktor: Professor Dr. J. Knobloch**

**Sektion Humanparasitologie  
Leiter: Professor Dr. P. G. Kremsner**

**Die Entwicklung einer Antikörperantwort auf ein  
Merozoitenoberflächen-Antigen - MSP-1 - von *Plasmodium  
falciparum* während und nach einer Malaria tropica**

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

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

**vorgelegt von  
Carsten Köhler  
aus Haan / Rheinland**

**2004**

**Dekan:** Professor Dr. C. D. Claussen

**1. Berichterstatter:** Professor Dr. P. G. Kremsner

**2. Berichterstatter:** Professor Dr. F. W. Schmahl

***„Es ist Gottes Ehre, eine Sache zu verbergen;  
aber der Könige Ehre ist es, eine Sache zu erforschen.“***

*Sprüche 25,2*

*Meinen lieben Eltern  
Renate & Klaus Köhler  
und meinem Bruder  
Guido*

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1	Epidemiologie und historische Aspekte der Malaria	4
1.2	Definition der Malaria und Klassifizierung der Erreger	7
1.3	Bekämpfungsstrategien der Malaria	8
1.4	Vektoren und Malariatransmission	10
1.5	Malariatransmission in Lambaréné, Gabun	11
1.6	<i>Plasmodium falciparum</i> -Malaria – Ätiologie, Pathogenese und Immunität	13
1.6.1	Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	13
1.6.2	Erythrozytäre Zell-Invasion bei <i>Plasmodium falciparum</i>	14
1.6.3	Pathophysiologisches Krankheitsbild bei Malaria tropica	17
1.7	Allgemeine Immunität bei Malaria	19
1.7.1	Immunstatus und Malaria	19
1.7.2	Humorale Immunität und Malaria	22
1.8	Impfstoffentwicklung bei Malaria tropica	25
1.9	Merozoite-Surface-Protein-1 (MSP-1)	28
1.10	Humorale Immunität und MSP-1	30
1.11	Zielsetzung der Arbeit	33
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>34</b>
2.1	Untersuchungsmaterial	34
2.1.1	Herkunft der Blutplasmaprobe; 1/95C Studie	34
2.1.2	Entnahme der Blutplasmaprobe	37
2.1.3	Aufbereitung der Blutplasmaprobe	38
2.2	Verwendetes Antigen	39
2.3	Antikörpermessung mit der ELISA-Methode	40
2.3.1	Prinzip des ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	40
2.3.2	Durchführung des ELISA	42
2.3.3	Verlaufskurzbeschreibung der Assays	50

---

<b>2.4</b>	<b>Arbeitsmaterialien .....</b>	<b>51</b>
2.4.1	Arbeitsgeräte .....	51
2.4.2	Reagenzgefäße und Dosierhilfen.....	52
2.4.3	Chemikalien .....	53
<b>2.5</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>56</b>
<b>2.6</b>	<b>Vergleichende Parameter .....</b>	<b>57</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>IgG-Antikörperproduktion gegen MSP-1<sub>19</sub>.....</b>	<b>58</b>
3.1.1	Profile.....	58
3.1.2	AU-Werte.....	61
3.1.3	IgG-1 : IgG-3 Ratio.....	63
<b>3.2</b>	<b>MSP-1<sub>19</sub>-spezifische IgG-Antikörperantwort und Incidence density rate .....</b>	<b>65</b>
<b>3.3</b>	<b>MSP-1<sub>19</sub>-spezifische IgG-Antikörperantwort und Zeit bis zur ersten Reinfektion.....</b>	<b>68</b>
<b>3.4</b>	<b>MSP-1<sub>19</sub>-spezifische IgG-Antikörperantwort und Alter.....</b>	<b>69</b>
<b>3.5</b>	<b>MSP-1<sub>19</sub>-spezifische IgG-Antikörperantwort und Geschlecht, AB0-Blutgruppe, Sichelzellen-Trägerschaft, NOS-2- und MBL-Mutation und Parasitämie .....</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>IgG-Antikörperproduktion und MSP-1<sub>19</sub>.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>Zusammenhang der MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-Antikörperantwort mit der Incidence density rate und Zeit bis zur ersten Reinfektion .....</b>	<b>84</b>
<b>4.3</b>	<b>Verlauf der MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-Antikörperantwort mit dem Alter .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4</b>	<b>Zusammenhang der MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-Antikörperantwort mit Geschlecht, AB0- Blutgruppe, Sichelzellen-Trägerschaft, MBL- und NOS-2-Mutation und Parasitämie.....</b>	<b>92</b>
<b>4.5</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>98</b>

<b>6</b>	<b>VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN.....</b>	<b>128</b>
<b>9</b>	<b>VERZEICHNIS DER TABELLEN .....</b>	<b>129</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>130</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>135</b>
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>136</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und historische Aspekte der Malaria

Die Malaria stellt weltweit eines der bedeutendsten und komplexesten Gesundheitsprobleme der Menschheit dar.

War die Malaria früher extrem weit auf der Erde verbreitet, so ist die Krankheit heute hauptsächlich auf die armen tropischen Regionen von Afrika, Asien und Lateinamerika beschränkt. Dennoch leben nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 40% der Weltbevölkerung – das sind über 2,3 Milliarden Menschen - in Malaria-Risikogebieten. Damit ist die Malaria heute eine der größten akut- und präventivmedizinischen Herausforderungen in den tropischen Ländern.

100 Länder und Gebiete gehören heute weltweit zum Malariarisikogebiet, von denen 92 die Übertragung der lebensgefährlich verlaufenden **Malaria tropica** - Erreger: *Plasmodium falciparum* - aufweisen.

Die Inzidenz der Malaria beträgt nach Schätzung der WHO weltweit ca. 300 – 500 Millionen klinische Fälle pro Jahr, von denen mehr als 1 Millionen tödlich verlaufen. Allein über 700.000 Kinder unter 5 Jahren versterben jährlich an der Malaria allein oder in Zusammenhang mit anderen Krankheiten. Dabei haben junge Kinder aus dem tropischen Afrika - besonders in den medizinisch schlecht versorgten Gebieten - den größten Anteil an den Malariakindertoten.

1994 bewohnten nur 7 % der Bevölkerung des afrikanischen Kontinents Malaria-freie Gebiete. 74 % der Bevölkerung lebte in hochendemischen Gebieten, in denen eine das ganze Jahr über andauernde hohe Transmission stattfindet und vor allem *Plasmodium falciparum* übertragen wird. Die WHO schätzt, dass über 90% der weltweit auftretenden totalen Malariainzidenz im tropischen Afrika vorkommt. Davon treten mindestens 140 Millionen klinische Malariafälle bei Kindern unter fünf Jahren auf.

Ungefähr 3000 Menschen versterben täglich an der Malaria. Alle 40 Sekunden verliert ein Kind sein Leben durch Malaria [Butler, 1997; WHO, 2001].

*Plasmodium falciparum* ist der vorherrschende Malariaparasit im tropischen Afrika, dem Amazonasgebiet, Südost-Asien und Ozeanien. Er ist die Hauptursache für die schwer verlaufende Malaria und die damit verbundene Mortalität, die vor allem Kinder, nicht-immune Erwachsene und schwangere Frauen betrifft.

Außerhalb des tropischen Afrikas versterben hauptsächlich nicht-immune Einwanderer in endemischen Gebieten. Während Epidemien sind alle Altersgruppen gleich betroffen. Die anderen drei humanpathogenen Malariaerreger – *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* - tragen zur Malariamortalität praktisch nicht bei.

Schon zu antiker Zeit war der Zusammenhang von Malaria und stehenden Gewässern bekannt, ohne jedoch die Rolle der Mücken als Überträger zu kennen. Die Infektion wurde vielmehr auf die verseuchten „schlechten“ Ausdünstungen der Sümpfe, die ihre Ursache in verwesenden, verfaulenden organischen Materialien hätten, zurückgeführt und in Italienisch „mala aria“ = schlechte Luft genannt. Allerdings vermutete der römische Schriftsteller Marcus Terentius Varro bereits vor über 2 000 Jahren in seinem Werk „De re rustica“, dass kleinste Organismen die Malaria verursachen könnten [Schimitscheck und Werner, 1985].

Auf das 16. Jahrhundert vor Christus datieren die ersten klinischen Beschreibungen, die im Papyrus Ebers aus Ägypten überliefert wurden [Ebbell, 1937].

Hippokrates (460-377 v. Chr.) widmete dem dreitägigen und viertägigen Fieber ausführliche Beschreibungen [Withington, 1909]. Auch Galen (129-199 n. Chr.) und seine Schüler beschäftigten sich eingehend mit dem Krankheitsbild.

1879 wurde von den Italienern Klebs und Tomasi-Crudeli die Behauptung aufgestellt, sie hätten ein stäbchen-förmiges Agens, den *Bacillus malariae*, aus der Luft und dem Schlamm Malaria-verseuchter Sümpfe isoliert [Manson-Bahr, 1963].

Die neuzeitliche Malariaforschung begann mit der mikroskopischen Auffindung der Plasmodien im menschlichen Blut durch Laveran im Jahre 1880. Der französische Kolonialarzt entdeckte mit Hilfe eines einfachen Mikroskops *Plasmodium falciparum*-Stadien im Blut eines algerischen Soldaten. Dabei sah er in Blutaussstrichen ohne Differentialfärbung bewegliche Elemente, die er als Malariaparasiten erkannte und beschrieb [Laveran, 1881; Laveran, 1884]. Laveran erhielt dafür 1907 den Nobelpreis. Neben dem Mikroskop war die später von Giemsa - Tropeninstitut Hamburg -

entwickelte Färbung eine technische Grundvoraussetzung zur Erkennung der Plasmodien-Stadien. Sir Ronald Ross, ein nach Indien abgeordneter englischer Mediziner beschrieb 1898 nach zahlreich durchgeführten Versuchen den vollständigen Entwicklungszyklus der Vogel malaria und bestätigte damit die von dem Engländer Patrick Manson – der vorher den Erreger der Filariose *Wuchereria bancrofti* entdeckt hatte – zuvor aufgestellte Mosquito-Theorie der Malaria. Er konnte zeigen, dass weibliche Anophelen die Überträger der menschlichen Malaria sind [Ross, 1897a; Ross, 1897b]. 1902 erhielt Ross für diese Entdeckung den Nobelpreis [Manson-Bahr, 1963].

Camillo Golgi unterschied die klinischen Stadien der verschiedenen Malariaformen [Golgi, 1885]. Von Angello Celli, Professor für Hygiene an der Universität Rom, stammt die Bezeichnung „Plasmodium“. Giovanni Battista Grassi beobachtete 1898 gemeinsam mit Bignami und Bastinelli den vollständigen Entwicklungszyklus der menschlichen Malaria in der Mücke [Schimitscheck und Werner, 1985]. Während eines längeren Aufenthalts in Ostafrika erkannte Robert Koch erstmals durch Beobachtung der Malaria bei Einheimischen und Europäern die Immunitätsverhältnisse gegenüber der Infektion [Garnham, 1967]. 1943 entdeckte Murdow und Reichenow die exoerythrozytäre Schizogonie in den Endothelzellen des Kanarienvogels. 1948 fanden Shortt und Garnham die entsprechenden Stadien humanpathogener Plasmodien in der Leber des Menschen [Dönges, 1988].

1976 gelang es Trager und Jensen an der Rockefeller Universität in New York erstmals *Plasmodium falciparum* in vitro fortlaufend zu kultivieren [Trager und Jensen, 1976]. Damit war die Voraussetzung zur Malariaforschung geschaffen, zumal sich lediglich nur zwei südamerikanische Affenarten – *Saimiri sciureus* und *Aotus trivirgatus* – als Tiermodelle für die menschliche *Plasmodium falciparum*-Malaria eignen. Dabei müssen sie künstlich durch Injektion von asexuellen Blutstadien infiziert werden, da der natürliche Infektionsweg über Sporozoitenstadien nicht möglich ist [Gysin et al., 1980].

## 1.2 Definition der Malaria und Klassifizierung der Erreger

„Die Malaria ist eine akute, tropentypische durch Protozoen der Gattung Plasmodium hervorgerufene Infektionskrankheit“ [Kretschmer et al., 1996].

Die Gattung Plasmodium gehört zum Unterstamm der **Apicomplexa**. Apicomplexa sind obligate Endoparasiten von Wirbellosen und Wirbeltieren, die meist intrazellulär parasitieren. Charakteristisch ist ihr namensgebender apikaler Organellenkomplex, bestehend u.a. aus Conoid, Rhoptrien und Micronemen. Apicomplexa weisen in ihrem Lebenszyklus einen Generationswechsel von ungeschlechtlicher Schizogonie, geschlechtlicher Gamogonie und ungeschlechtlicher Sporogonie auf. Zu den Apikomplexa gehören neben den Erregern der Malaria u.a. auch die Erreger der Toxoplasmaose, der Cryptosporidiose, der Kokzidiose und der Babesiose.

Die Gattung Plasmodium gehört innerhalb der Apicomplexa zur Klasse der **Haematozoa** – tierische Blutparasiten, die sich durch einen obligaten Wirtswechsel zwischen blutsaugenden Arthropoden und Wirbeltieren auszeichnen. Innerhalb der Haematozoa wird Plasmodium der Ordnung der **Haemosporida** – Sporozoen, die im Blut parasitieren - zugeordnet, die nur eine einzige Familie, die Familie der **Plasmodiidae**, umfaßt.

Innerhalb der Familie der Plasmodiidae bilden blutsaugende Dipteren den sogenannten Endwirt, d.h. der Wirt, in dem die geschlechtliche Vermehrung des Parasiten stattfindet. Als Zwischenwirte werden Reptilien, Vögel und Säugetiere genutzt.

Die Gattung Plasmodium wird in vier Untergattungen mit mehr als 170 Arten unterteilt. Alle Arten sind recht wirtsspezifisch.

Humanpathogen sind lediglich vier Arten, die unterschiedliche Symptome beim infizierten Menschen hervorrufen können:

- *Plasmodium falciparum*, Erreger der **Malaria tropica**
- *Plasmodium malariae*, Erreger der Malaria quartana
- *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*, Erreger der Malaria tertiana.

In seltenen Fällen können auch einige tierpathogene Plasmodienarten im Menschen parasitieren.

Als Endwirt und Überträger dienen für diese vier Arten die blutsaugenden, weiblichen Stechmücken der Gattung Anopheles [Lucius und Loos-Frank, 1997].

Neben der durch die Anopheles übertragenen Malaria besteht auch die Möglichkeit an einer Malaria durch Transfusionen [Schunkert und Handt, 1988; Wernsdorfer, 1988], Transplantationen [Anonymus, 1990], sowie durch diaplazentare Übertragung parasitierter Erythrozyten – sogenannte konnatale Infektion - zu erkranken [MacLeod, 1988].

### **1.3 Bekämpfungsstrategien der Malaria**

Lange Zeit gab es keine effizienten Medikamente gegen die Infektion. Die wahrscheinlich älteste Chemotherapie geht auf den chinesischen Arzt Ge Hong zurück, der 340 nach Christus die Fiebertherapie mit einem aus der Heilpflanze Quinghao (*Artemisia annua*) zubereiteten Tee beschreibt [Anonym, 1992]. Erst im 20. Jahrhundert wurden Extrakte aus *Artemisia annua* zur Malariatherapie wiederentdeckt und stellen heute die am schnellsten wirksamen Schizontizide dar [Looareesuwan, 1985, White, 1994]. Im frühen 17. Jahrhundert war die Einführung der Chinarinde aus Peru und die Extraktion des Chinins aus der Rinde des Baumes *Chinchona officinalis* (Fiebrinde) Meilensteine bei der europäischen Behandlung von Malaria. 1820 konnte von Pelletier und Caventou das Chinin erstmals aufgereinigt werden, so dass eine genaue Dosierung des Alkaloids möglich wurde. 1924 wurde das erste synthetische Malaria-Medikament durch den deutschen Chemiker Schulemann synthetisiert [Lucius und Loos-Frank, 1997].

In Elberfeld synthetisierten Andersag und Mitarbeiter in der Firma Bayer die ersten 4-Aminochinoline, zu denen u.a. Chloroquin und Amodiaquin gehören. Die zunehmende Resistenzen gegen die bis dahin bekannten Wirkstoffe führten zur Entwicklung neuer Wirkstoffe auf der Basis der Chinolin-Moleküle. 1971 wurde das

Mefloquin synthetisiert [Ohnmacht et al., 1971], 1972 das Halofantrin [Colwell et al., 1972]. Die bereits erwähnte Wiederentdeckung der Quinghaosu-Derivate führte zur Synthese von Arteether, Artesunate, Artemisinin und anderen Abkömmlingen [Kyle Webster und Lehnert, 1994].

1956 wurde von der WHO eine großflächige Kampagne mit dem Ziel der Ausrottung der Malaria gestartet. Dabei wurde der Vektor *Anopheles* mit Insektiziden – hauptsächlich DDT – und parallel dazu die Parasiten im Menschen mit chemotherapeutischen Mitteln – hauptsächlich Chloroquin – bekämpft. Die anfangs erfolgreiche Kampagne brachte jedoch nicht den erhofften langfristigen Erfolg [Wernsdorfer, 1980]. Neben Schwierigkeiten bei der praktischen Durchführung kam es zu zunehmenden Resistenzen der Vektoren gegenüber den eingesetzten Insektiziden und der Parasiten gegenüber den Chemotherapeutika [Brown, 1971]. In großen Teilen Nord-Amerikas, Süd-Europas, der ehemaligen Sowjetunion und in einigen Gebieten Asiens und Süd-Amerikas zeigte diese Initiative Erfolg. Hier wurde die Transmission gestoppt und die Malaria eradiziert. In Lateinamerika und den meisten asiatischen Ländern variierten jedoch die Ergebnisse, so dass die Krankheit dort weiter persistierte. In Afrika wurde aufgrund der Vielzahl der afrikanischen Staaten und der damit verbundenen logistischen Probleme der Malariakontrolle nie eine großangelegte Eradikation versucht.

Die Hoffnung auf eine globale Eradikation der Malaria wurde 1969 endgültig fallen gelassen. Es zeigte sich, dass dieses Ziel mit der Verwendung einer einzigen Bekämpfungsstrategie nicht möglich ist. Heute ist Konsens, dass zur Erlangung einer möglichst hohen Effektivität die Kontrollprogramme an die lokalen Gegebenheiten angepaßt, die gesamte Gemeinschaft vor Ort mit einbezogen und der Gesundheitsdienst in die Entwicklung mit hineingenommen werden muss. [Malarianetwork, 1999]

Die Malariasituation wird heute zudem weltweit dadurch kompliziert, dass neben dem Auftreten von Insektizidresistenzen der Überträger eine Erschwerung der antiplasmodialen Chemotherapie durch zunehmende Prävalenzen resistenter *Plasmodium falciparum*-Stämme auftritt. Dadurch erfolgt die Reduzierung der Wirksamkeit fast aller bekannter Malariamedikamente [White, 1992]. Es ist davon

auszugehen, dass dieses Phänomen trotz einer erfolgreichen Weiterentwicklung von Chemotherapeutika durch Kombinationstherapien in den letzten Jahren [Kremsner et al., 1994; Kremsner et al., 1995] weiterhin bestehen bleibt. Dabei selektioniert der Medikamentendruck die resistenten Stämme und führt damit zu einer Verbreitung ihrer genetisch verankerten Resistenz [Wernsdorfer und Payne, 1991]. Zudem tritt eine Erschwerung der Kontrolle der Malaria in diesen Regionen durch inadäquate Gesundheitsstrukturen und arme sozioökonomische Bedingungen auf. Insgesamt ist die Ausbreitung resistenter Populationen eines Parasiten jedoch nicht nur ein Ergebnis des Medikamentendrucks, sondern auch der Wirt-Parasiten-Interaktion und des Vektorverhaltens. Zusätzlich kann sie durch spezifische ökologische Faktoren beeinflusst werden [Wernsdorfer, 1991].

Eine frühe Diagnose und eine daraufhin unmittelbar erfolgende adäquate Behandlung besitzen somit oberste Priorität bei der Verhinderung der Mortalität [WHO, 1997; Malarianetwork, 1999].

Der seit Anfang der 70er Jahre in dem Versuch einer Impfstoff-Entwicklung gelegte Schwerpunkt im Kampf gegen die Malaria gewinnt daher heute immer größere Bedeutung [Cox, 1974, Gabaldon, 1969, Wernsdorfer, 1981, WHO 1969]. Die dabei von der WHO unterstützte Strategie besteht in der Identifizierung und Isolierung von Parasitenantigenen, die eine Immunantwort hervorrufen können, sowie deren Testung auf mögliche Ausbildung einer induzierten protektiven Immunität.

#### **1.4 Vektoren und Malariatransmission**

Die Überträger der Malariaerreger, die Mücken der Gattung **Anopheles**, gehören zur Familie der Culicidae, die weltweit 3 450 Stechmückenarten beinhaltet. Von den drei Unterfamilien sind nur die der Anophelinae und der Culicinae haematophag.

Innerhalb der 422 Arten der Gattung Anopheles fungieren lediglich 70 als Vektoren, von denen wiederum nur ungefähr 40 wirklich wichtige Überträger – bedingt u.a. durch deren Anthropophagie, Populationsgröße, Überlebensrate – sind [Lucius und Loos-

Frank, 1997]. Die verschiedenen Vektoren unterscheiden sich teilweise erheblich bezüglich ihres Ernährungs- und Fortpflanzungsverhaltens, ihres Biotops und ihrer Vulnerabilität gegenüber Insektiziden. *Anopheles gambiae*, neben *Anopheles funestus* und *Anopheles arabiensis* prädominant im tropischen Afrika, stellt dabei den effektivsten Malariavektor dar [White, 1996].

Die Endemizität der Infektion wird durch Ermittlung der Parasitenträgerraten bei Kindern von zwei bis neun Jahren in vier Ausprägungen unterteilt. Definiert sind Hypo-, Meso-, Hyper- und Holoendemizität durch eine 0-10%ige, 10-50%ige, 50-75%ige und >75%ige Parasitenträgerrate [Wernsdorfer und McGregor, 1988]. In hypo- und mesoendemischen Gebieten wird in der Regel eine saisonal stark differierende Malariatransmission gemessen - „**instabile** Malaria“, in hyper- und holoendemischen Gebieten dagegen kommt eine meist zu allen Jahreszeiten gleich starke Transmission vor - „**stabile** Malaria“.

## 1.5 Malariatransmission in Lambaréné, Gabun

Gabun liegt geographisch im westlichen Teil Zentralafrikas zwischen dem 2. südlichen und dem 2. nördlichen Breitengrad. Die nördliche Grenze bildet Äquatorial Guinea und Kamerun. Südlich und östlich grenzt Gabun an die Republik Kongo. Im Westen wird Gabun vom Golf von Guinea begrenzt – siehe Anhang, Abbildung **10-1**. Auf 268 000 km<sup>2</sup> leben ca. 1 Millionen Menschen. Offizielle Landessprache ist Französisch [Weltalmanach, 1997].

Das 1913 von seinem Namensgeber erbaute Albert-Schweitzer-Hospital, in dessen Umgebung die in dieser Studie verwendeten Blutproben gesammelt wurden, ist ca. 2 km vom Stadtzentrum Lambaréné entfernt. Lambaréné, ein regionales Zentrum mit ca. 15.000 Einwohnern, liegt ca. 50 km südlich des Äquators am Fluß Ogooué in der Provinz Moyen-Ogooué – ungefähr 180 km südöstlich der Hauptstadt Libreville.

Das Albert-Schweitzer-Hospital selbst hat ca. 300 Betten und beherbergt ca. 120 gabunesische Angestellte mit ihren Familien. Insgesamt bildet das Hospitalgelände, das auch das Forschungslabor beherbergt, einen eigenen dorfähnlichen Charakter [Wildling et al., 1995].

Die Durchschnittstemperatur liegt in Lambaréné gleichbleibend bei ca. 27 °C. Das tropische Klima beinhaltet zudem hohe Luftfeuchtigkeit mit Werten im Bereich von 80-90%. Die Niederschlagsmenge zwischen 1 600 und 3 000 mm/Jahr verteilt sich auf zwei Regenzeiten von Januar bis Mai und Oktober bis Dezember. Trockenzeit ist von Juni bis September mit einem durchschnittlichen Niederschlag von 35 mm/Monat. Tropischer Regenwald bedeckt ca. 75% des Landes. Dabei ist die ursprüngliche Vegetation neben partial vorkommenden Feuchtsavannengebieten teilweise durch landwirtschaftliche Nutzflächen ersetzt worden [Wildling et al., 1995].

Epidemiologische Daten zur Malariatransmission wurden in Lambaréné und Umgebung im Jahr 1992 erhoben. Die an drei Orten in der Bevölkerung erhobenen Daten weisen das untersuchte Gebiet als ein hyperendemisches Malariagebiet aus. Alle Orte zeigten ein stark vermehrtes Vorkommen von *Plasmodium falciparum* gegenüber *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* auf. Ca. 90% der Malariafälle wurde durch *Plasmodium falciparum* verursacht. Nur bei 5% der Fälle waren *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* Ursache einer Malaria. Als Hauptvektoren wurden *Anopheles gambiae* und *Anopheles moucheti* identifiziert. Die Prävalenz der Malaria zeigte nur unwesentliche Veränderungen im Verlauf des Jahres – sogenannte „**stabile Malaria**“, wobei die höchsten Transmissionsraten in der kurzen Regenzeit von Oktober bis Dezember lagen [Wildling et al., 1995; Sylla et al., 2000]. Dabei kann die in dieser Region bestehende hohe Kindersterblichkeit neben Pneumonien und Durchfallerkrankungen hauptsächlich auf die Malaria zurückgeführt werden. Untersuchungen konnten zeigen, dass die Anfälligkeit der Kinder für *Plasmodium falciparum*-Infektionen sowie die Unterschiede in der Infektionsrate und dem Schweregrad der Infektion nicht durch die Höhe der Exposition zu infizierten *Anophelen* erklärt werden kann [Sylla et al., 2001].

## 1.6 *Plasmodium falciparum*-Malaria – Ätiologie, Pathogenese und Immunität

### 1.6.1 Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* verläuft in zwei Phasen: einer geschlechtlichen in der weiblichen Anopheles-Mücke – **Sporogonie** - und einer ungeschlechtlichen in Leber und Blut des Menschen – **Schizogonie**.

Das für den Menschen infektiöse Stadium im Lebenszyklus der Plasmodien, die sogenannten Sporozoiten, werden mit dem Stich der weiblichen Anopheles-Mücke während deren Blutmahlzeit mit dem Speichel in subkutane Kapillaren des Menschen injiziert. In der Regel werden nur etwa 8-15, manchmal aber auch 100 Sporozoiten injiziert [Rosenburg und Wirtz, 1990]. Die Sporozoiten sind nach 30 Minuten aus der Blutbahn verschwunden, dringen in die Leberparenchymzellen ein und vermehren sich dort innerhalb einer parasitophoren Vakuole asexuell, indem sie durch Teilung zu Leberschizonten heranreifen - **präerythrozytäre Schizogonie**. Nach sechs oder mehr Tagen kommt es zur symptomlosen Ruptur der die Gewebsschizonten beinhaltenden Hepatozyten. Dabei werden sogenannte Merozoiten – bei *Plasmodium falciparum* bis zu 40.000 [Mehlhorn und Piekarski, 1998] - in die Blutbahn ausgeschwemmt, die dann aktiv innerhalb von Sekunden in Erythrozyten eindringen. In den befallenen Erythrozyten – Mehrfachbefall ist häufig - bilden sich intraerythrozytäre asexuelle mononukleäre Erregerformen, sogenannte Trophozoiten, die oft als „Ringform“ bezeichnet werden. Darauf kommt es erneut zu Wachstum und zur Vermehrung durch Teilung, der sogenannten **erythrozytären Schizogonie**: nach einer Phase des Wachstums bilden die Trophozoiten Mehrkernstadien, die als multinukleäre erythrozytäre Schizonten bezeichnet werden und 16 (8-24) Merozoiten beinhalten [Pschyrembel, 1998]. Sind diese ausgereift, rupturieren die Schizonten befallenden Erythrozyten. Die dabei freiwerdenden Merozoiten befallen sofort wieder neue Erythrozyten, in denen sich derselbe Zyklus wiederholt. Die Zeitspanne des erythrozytären Zyklus ist erregerspezifisch und beträgt bei *Plasmodium falciparum* etwa 48 Stunden.

Nach mehreren Zyklen der erythrozytären Schizogonie können sich in der sogenannten **Gametogonie** durch bisher unbekannte Mechanismen aus einige Merozoiten intraerythrozytär geschlechtlich differenzierte Formen - sogenannte Mikro- und Makrogametozyten – entwickeln, die uninukleär bleiben. Bei *Plasmodium falciparum* beträgt die Dauer ungefähr 10 Tage. Dieser Entwicklungsschritt ist unter ungünstigen Bedingungen für den Parasiten - wie zum Beispiel bei einer antiparasitären Chemotherapie - verstärkt zu beobachten. Die Geschlechtsstadien können nun von der weiblichen Anopheles-Mücke bei einer Blutmahlzeit am infizierten Menschen aus dessen Blutbahn aufgenommen werden. Induziert durch die physiologischen Verhältnisse im Darm der Mücke, erfolgt die Ausreifung der Gametozyten – **Gamogonie** - und die dann folgende Verschmelzung der Gameten zur Zygote. Es beginnt die geschlechtliche Vermehrung, bei der sich die Zygote zum Ookineten entwickelt, der sich in der Darmwand der Mücke als Oozyste meiotisch teilt und bis zu 10 000 haploide Sporozoiten bildet – **Sporogonie**. In einer infizierten Anopheles können dabei mehr als 100 Oozysten auftreten [Lucius und Loos-Frank, 1997]. Die Dauer der Sporogonie beträgt je nach Temperatur und Feuchtigkeit der Umgebung ein bis vier Wochen, wobei höhere Temperaturen die Entwicklung beschleunigen. Die Sporozoiten wandern durch die Hämolymphe in die Speicheldrüsen der Mücke ein und können so bei einer erneuten Blutmahlzeit der Mücke über den Speichel einen weiteren Menschen infizieren. Der beschriebene Infektionszyklus beginnt von neuem – siehe Anhang, Abbildung **10-2**.

### **1.6.2 Erythrozytäre Zell-Invasion bei *Plasmodium falciparum***

Innerhalb der vielen Stadien die der Malariaparasit während seines komplexen Lebenszyklus annimmt, müssen drei Stadien Wirtszellen invadieren: der Ookinet, der Sporozoit und der Merozoit.

Jedes der drei invasiven Stadien des Parasiten weist eine ihm eigene Zielzell-Spezifität auf - wahrscheinlich bestimmt durch spezifische Rezeptor-Ligand Interaktionen.

Dabei erscheint die Invasion als ein aktiver Prozess, bei dem der Parasit ein Aktin-basiertes Motilitäts-System benutzt um in die Zielzellen einzudringen [Vanderberg et al., 1990; Ward et al., 1994]. Auch wenn sich die drei invasiven Stadien des Parasiten gegenseitig morphologisch und biochemisch unterscheiden, weisen sie konservierte apikale Strukturen auf: Micronemen und Rhoptrien. Diese scheinen zusammen mit weiteren parasitären Organellen, wie den Dichten Granula, für die Wirtszellinvasion erforderlich zu sein. Eine vollständige funktionelle Aufklärung steht allerdings noch aus [Torii und Aikawa, 1998].

Die **erythrozytäre Invasion** des Parasiten verläuft in mehreren Phasen: initiale Erkennung und Adhäsion, Reorientierung und Invasion.

Nach Freisetzung der 1,5  $\mu\text{m}$  langen und 1  $\mu\text{m}$  breiten Merozoiten [Torii und Aikawa, 1998] durch eine 2,5  $\mu\text{m}$  große Öffnung aus den Schizonten [Winograd et al., 1999], verbringen diese nur wenige Sekunden als extrazelluläre Stadien im Serum. Die Merozoiten befinden sich gleich in engem Kontakt zu ihren Zielzellen, den Erythrozyten. Zufällige Berührungen des Merozoiten und der Erythrozyten führen zu einer **initialen Erkennung und Adhäsion** an irgendeinem Punkt der Wirtszelloberfläche durch den Parasiten. Dabei wird die initiale Erkennung womöglich durch Ladungsunterschiede auf der Oberfläche zwischen Merozoiten und Erythrozyten ausgelöst [Fujioka und Aikawa, 1999].

Während der darauf folgenden **Reorientierungsphase** scheint die Interaktion zwischen der Erythrozytenmembran und der Merozoitenoberfläche von sehr geringer Affinität zu sein, da die Adhäsion reversibel ist. Der Vorgang der Reorientierung besteht solange aus einem sich wiederholenden Ablauf von Adhäsion, Dissoziation und Re-Adhäsion, bis die Orientierung des Merozoiten zur Erythrozytenmembran in der Weise erfolgt ist, dass eine Anheftung des apikalen Endes des Merozoiten an der Erythrozytenoberfläche vorliegt [Bradley et al., 1990; Ward et al., 1994]. Auch wenn die Funktion der Oberflächenhülle mit ihren Oberflächenproteinen immer noch nicht vollständig verstanden wird, scheint sie eine wichtige Rolle in der Rezeptor-Ligand-Interaktion der initialen Erkennung und Adhäsion zu spielen. Bisher konnten sechs Merozoiten-

Oberflächenproteine, sogenannte Merozoite-Surface-Proteins (MSPs) charakterisiert werden [Holder, 1994; Marshall et al., 1997; McColl et al., 1994; Oeuvray et al., 1994; Trucco et al., 2001; Wu et al., 1999]. Ein möglicher spezifischer Kandidat in der Rezeptor-Ligand-Interaktion für die initialen Adhäsion und Reorientierungsphase ist dabei **MSP-1** [Holder et al., 1985; Miller et al., 1993].

Im Anschluss an die Reorientierungsphase erfolgt mit dem angehefteten apikalen Ende voraus die aktiv orientierte **Invasion**. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass sich ein ringförmiger Kontaktpunkt zwischen dem Erythrozyten und dem Merozoiten bildet, der während der Invasion erhalten bleibt. Beim Eindringen des Merozoiten in den Erythrozyten delt dieser die Erythrozytenmembran zuerst ein und liegt schließlich im Inneren in einer dicht abschließenden Vakuole, deren Membran somit die Erythrozytenmembran darstellt. Da ein reifer Erythrozyt keine Möglichkeit zur Endozytose besitzt [Zweig und Singer, 1979] muss dieser Invasionsprozess vom Parasit gesteuert werden. Die Organellen des vorderen Zellpols werden während des Penetrationsvorgangs entleert, Proteine aus den Rhoptrien in die Vakuolenmembran eingebaut und erythrozytäre Proteine aus der Vakuolenmembran ausgebaut [Sinnis und Sim, 1997]. Am Ende dieses Invasionsprozesses schließt sich der Erythrozyt hinter dem Eindringling. Während dieses Vorgangs wird die ungefähr 20 µm dicke Oberflächenhülle des Merozoiten fast vollständig abgelegt und verbleibt außerhalb des Erythrozyten [Mehlhorn und Piekarski, 1998; Torii und Aikawa, 1998; Warrell, 1990]. Für die Adhäsion und die Penetration selbst werden Proteine und Proteasen von innen über Vesikel bzw. von den Rhoptrien nach außen auf die Parasitenoberfläche transportiert. Diese Systeme sind sehr spezifisch. Möglicherweise liegt auch hierin begründet, dass die einzelnen Plasmodium-Arten bevorzugt unterschiedlich alte Erythrozyten befallen [Mehlhorn und Piekarski, 1998]. Insgesamt haben mikroskopische Beobachtungen und biochemische Studien gezeigt, dass die Mikronemen Proteine beinhalten, die für die Invasion der Erythrozyten erforderlich sind - u.a. Erythrocyte-binding-antigen (EBA-175) [Adams et al., 1992; Sim et al., 1994; Sim, 1995], Duffy-bindende Proteine bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium knowlesi* [Sinnis und Sim, 1997]. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Inhalt der Rhoptrien - u.a. High-molecular-weight-proteins (Rhop-H), Low-molecular-weight-proteins (Rhop-L) [Sam-Yellowe, 1996], Apical-membrane-antigen-1 (AMA-1)

[Triglia et al., 2000] - und der Dichten Granula - u.a. Ring-infected-erythrocyte-surface-antigen (RESA) [Aikawa und Atkinson, 1990] - während der Invasion ausgeschüttet werden.

Während Merozoiten von *Plasmodium vivax* und *Plasmodium knowlesi* für die Invasion durch ihre selektiv an Duffy-positive Blutzellen bindenden Rezeptoren auf ein Glykoprotein der Duffy-Blutgruppe angewiesen sind [Adams et al., 1990; Galinski et al., 1992], benötigen die Merozoiten von *Plasmodium falciparum* wahrscheinlich als Rezeptoren die sialinsäurehaltigen Glykophorine A und B auf der Erythrozytenoberfläche [Hadley et al., 1986; Lingelbach, 1994]. Erythrozyten, die genetisch glykophorindefizient sind, werden sehr selten befallen. Ebenso kann eine enzymatische Behandlung der Zielerthrozyten, die das Glykoprotein abbauen, die parasitäre Invasion hemmen [Bradley et al., 1990]. Es bleibt aber davon auszugehen, dass verschiedene Wirtszelloberflächen-Determinanten beim Adhäsionsprozess von Bedeutung sind.

### **1.6.3 Pathophysiologisches Krankheitsbild bei Malaria tropica**

Die klinischen Symptome der Malaria werden durch die Vermehrung der asexuellen Stadien in den Erythrozyten, durch deren Zerstörung und durch Freigabe von pyrogenen Stoffen hervorgerufen. Leberformen und Gametozyten spielen für die Krankheitserscheinung keine Rolle.

Die Inkubationszeit der Malaria tropica, d.h. die Zeit zwischen der Inokulation der Sporozoiten und dem Auftreten der ersten klinischen Krankheitszeichen, beträgt durchschnittlich 12 (8-15) Tage, eventuell auch länger. Dabei ist die Abhängigkeit von Immunstatus, Chemoprophylaxe und subtherapeutisch dosierter Chemotherapie zu beachten. Besonders unter dem Einfluß einer Chemoprophylaxe kann die Inkubationszeit verlängert sein und Wochen bis Monate betragen [Kretschmer et al., 1996; Lang, 2000].

Der Beginn der *Malaria tropica* ist uncharakteristisch variabel und besteht oft aus Abgeschlagenheit, Kopf- und Gliederschmerzen sowie allgemeinem Unwohlsein. Auch die eigentlichen Malariasymptome, wie Schüttelfrost und Fieber, sind so unspezifisch, dass klinisch zwar der Verdacht, nicht jedoch die sichere Diagnose einer Malaria gestellt werden kann [Philipps et al., 1996]. Dennoch ist Fieber das auffälligste und wichtigste Zeichen der Malaria. Dabei reicht das Erscheinungsbild des Fieberverlaufs von subfebrilen Temperaturen bis zu langandauernden hochfieberhaften Verläufen. Das Fieber wird neben starken Kopf-, Glieder- und Bauchschmerzen auch häufig von weiteren Symptomen wie Durchfall, Übelkeit und Erbrechen begleitet. Die hieraus resultierende Dehydratation führt gelegentlich zu orthostatischen Blutdruckabfällen.

Bei der körperlichen Untersuchung besteht oft eine Spleno-, seltener eine Hepatomegalie, manchmal ein Ikterus. Hohes Fieber ist meist von Tachykardie und Tachypnoe begleitet.

An Laborparametern imponieren häufig eine normochrome normozytäre Anämie, eine Leukopenie sowie eine Thrombozytopenie. Als Zeichen der Hämolyse sind oft die Laktatdehydrogenase, das freie Hämoglobin und das indirekte Bilirubin erhöht und das Haptoglobin erniedrigt [Graninger et al., 1992]. Zudem sind häufig das C-reaktive Protein und Laktat erhöht und der Blutzucker im Serum erniedrigt. Desweiteren können eine metabolische Azidose, sowie ein akutes Lungen- und Nierenversagen auftreten [English und Marsh, 1997]. Marsh et al. haben die Komplikationen der Malaria bei afrikanischen Kindern untersucht [Marsh et al., 1995] und fanden heraus, dass insbesondere tiefes Koma bei zerebraler Malaria, respiratorische Insuffizienz sowie Hypoglykämie mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind.

Nicht selten werden generalisierte epileptische Anfälle bei an Malaria erkrankten Kinder beobachtet.

Die sichere Diagnose kann allerdings erst durch den Nachweis der Parasiten im Blutaussstrich, dem sogenannten „Dicken Tropfen“ [Kremsner et al., 1988], gestellt werden.

Bei *Plasmodium falciparum*-Malaria kommt es im Gegensatz zu den anderen Malariaformen oft zu sehr hoher Parasitämie, so dass in extremen Fällen bis zu 50% der Erythrozyten infiziert sind. Daher können sich bei der nicht rechtzeitig therapierten

Malaria tropica durch die rasch zunehmenden Parasitendichte die oben beschriebenen zahlreichen Organkomplikationen ausbilden. Neben der Immunantwort wird vor allen Dingen die Pathogenität der Parasiten für die Schwere der Malaria verantwortlich gemacht. Als Parasiteneigenschaften, die wesentlich zur Pathogenität beitragen, werden dabei die Zytoadhärenzphänomene wie Sequestration und Rosettenbildung angesehen [Scholander et al., 1996; Wahlgren et al., 1994].

Schon zu Beginn der 60er Jahre konnte gezeigt werden, dass zur Kontrolle der Blutparasitämie und möglicher klinischer Symptome Antikörper gegen die asexuellen Blutstadien-Antigen von *Plasmodium falciparum* von Bedeutung sind: eine Injektion von Antikörpern immuner Erwachsener in nicht immune Kinder vermochte diese vor Malaria zu schützen [Cohen et al., 1961]. Damit konnte die bedeutende Rolle der humoralen Antwort bei der Entwicklung von Immunität gegen Malaria nachgewiesen und die prinzipielle Möglichkeit einer Malaria-Vakzine demonstriert werden.

## 1.7 Allgemeine Immunität bei Malaria

### 1.7.1 Immunstatus und Malaria

Die klinische Ausprägung der Malaria kann in Abhängigkeit vom Immunstatus des Wirtes gegenüber der Plasmodienart sehr unterschiedlich ausfallen. Den höchsten Immunitätsgrad besitzen junge Erwachsene, die in einem hyper- bis holoendemischen Gebiet mit stabiler Malaria aufgewachsen sind. Allerdings wird auch bei ihnen keine vollständige sterile Immunität erreicht, sondern nur eine Teilimmunität, die im deutschsprachigen Raum auch als **Semi-Immunität** bezeichnet wird [Kretschmer et al., 1996]. Davon abhängig, reicht die klinische Ausprägung der Malaria von asymptomatisch, d.h. langfristige konstante Beschwerdefreiheit bei gleichzeitig mikroskopischem Parasitennachweis, über mild bis hin zu schwerer und komplizierter, fast ausschließlich durch *Plasmodium falciparum* verursachter, Malaria.

Dabei definiert die WHO den Begriff der „**Severe or complicated malaria**“ nach den folgenden Kriterien: neben dem Nachweis von asexuellen Parasiten von *Plasmodium falciparum* im Blutaussstrich, muss desweiteren mindestens eines der nachfolgenden Symptome auftreten: schwere Anämie (Hb <5 g/dl), auf keine andere Ursache zurückzuführende Bewusstseinsstrübung bis zum Koma (zerebrale Malaria), schwere Hypoglykämie (<40 mg/dl), akutes Nierenversagen (Kreatinin >3 mg/dl), Hyperparasitämie (>250.000 / $\mu$ l Blut), metabolische Azidose (pH <7,2), sowie akutes Lungenödem, disseminierte intravasale Gerinnung, Schock, schweres Erbrechen, Dehydratation und Hypovolämie, Hämoglobinurie und Ikterus [WHO,1990].

Die klinische Ausprägung der Malaria unterliegt hauptsächlich dem Einfluss von Parasiten-Virulenz-Faktoren einerseits und Wirtsimmunitätsfaktoren andererseits. Komplizierte Verlaufsformen der Malaria und Todesfälle sind fast ausschließlich auf *Plasmodium falciparum*-Infektion bei nicht-immunen Patienten zurückzuführen. Dabei sind die schwere Anämie und die zerebrale Malaria besonders gefürchtet. Die zerebrale Malaria reicht von zunehmender Benommenheit bis zum tiefen Koma und hat selbst bei adäquater Therapie eine Letalität von deutlich über 10% [WHO, 1990].

Als **Nicht-immune** werden Kleinkinder in hyper- oder holoendemischen Gebieten zwischen sechs Monaten und 6 Jahren, Schwangere, sowie Personen aus hypo- und nicht-endemischen Gebieten – u.a. Einwanderer, Tropenreisende, Wanderarbeiter – bezeichnet. Bis zum Alter von sechs Monaten sind Neugeborene und Säuglinge von teilimmunen Müttern womöglich durch mütterliche Antikörper relativ geschützt [Haworth, 1988]. Klinisch relevant ist allein die gegen die Krankheit verursachenden ungeschlechtlichen Blutstadien gerichtete Immunität.

Im Kindesalter von etwa fünf Jahren kann sich in Gebieten mit intensiver Transmission und häufiger Malaria bereits eine sogenannte **Anti-Krankheitsimmunität** ausbilden [Brinkmann und Brinkmann, 1991]. Trotz hoher Parasitämie manifestiert sich zwar ein Krankheitsverlauf mit oft stark beeinträchtigtem Allgemeinbefinden und hohem Fieber, jedoch bleiben Organkomplikationen aus. Letal endende Krankheitsverläufe bilden in diesem Alter die Ausnahme. Auch die Schulkinder in Endemiegebieten weisen diese Anti-Krankheitsimmunität auf.

**Semi-Immunität** bildet sich bei Bewohnern Malaria-endemischer Gebiete mit hoher Transmission durch wiederholte Infektionen bei langjähriger Exposition. Sie schränkt

die Parasitenreplikation ein und vermag sowohl vor ausgeprägten Malariasymptomen als auch vor lebensbedrohlichen Komplikationen zu schützen [Brown et al., 1986]. Erwachsene in Endemiegebieten stellen somit oft symptomlose Träger von Plasmodien dar. Dabei ist die sich im Laufe von Jahren entwickelnde Semi-Immunität spezie-, stadien- und wahrscheinlich sogar isolat- und parasitenstammspezifisch [Kretschmer et al., 1996].

Bei Verlassen des Endemiegebietes verliert sich diese Semi-Immunität nach Monaten bis Jahren, und der zuvor Semi-immune kann bei Rückkehr an einer schweren Verlaufsform der Malaria erkranken. Während einer Schwangerschaft kann aufgrund einer schwangerschaftsbedingten Immunsuppression die Semi-Immunität beeinträchtigt sein. Es kann zur Sequestration der Parasiten in der Plazenta, sowie zu negativen Auswirkungen auf das Geburtsgewicht und den mütterlichen Gesundheitszustand kommen [Bray und Sinden, 1979; Looareesuwan et al., 1985].

Veränderungen des Immunsystems durch eine HIV-1-Infektion führen möglicherweise zu häufigeren Malariaattacken [Whitworth, 2000].

Die Mechanismen, die zu einer verminderten Malaria-Anfälligkeit beitragen, sind vielfältig. Neben genetischen Adaptationen der Wirtspopulation unter dem Selektionsdruck der Parasiteninfektion – u.a. Hämoglobinopathien (Sichelzellanämie,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thalassämie), Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel, eine Mutation im Promotor der Stickstoffmonoxid-Synthase-2 (NOS2<sup>Lambaréné</sup>) [Kun et al., 1998a] - kommt es zu einer Ausbildung von humoraler und zellvermittelter Immunität.

Dabei dient die durch Malaria beim Wirt ausgelöste Immunantwort zwar der Kontrolle der Vermehrung und letztlich der Elimination der Parasiten, trägt wahrscheinlich aber auch maßgeblich zur Pathologie der Erkrankung bei [Clark et al., 1997].

Bei Nichtimmunen wirken während einer Auseinandersetzung mit einer *Plasmodium falciparum*-Infektion lediglich die unspezifischen Abwehrmechanismen: das Komplementsystem, natürliche Killerzellen, C-reaktives Protein der Akutphasenantwort, sowie geringgradig Zytokine wie Interleukin-2 und Gamma-Interferon. Vor allem wirken aktivierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten - auch über antikörperunabhängige Mechanismen. Besonders bei nichtimmunen jungen

Kindern, in denen sich noch keine effektiv erworbenen Immunantworten entwickelt haben, wird auch das Mannose-bindende Lektin (MBL) als Schutzfaktor diskutiert [Luty et al, 1998]. Von der Wirksamkeit all dieser Faktoren hängt es ab, ob ein Nichtimmuner die ersten Tage der klinisch manifesten Infektion überlebt [Kwiatkowski, 1992]. Dabei ist die unspezifische Immunabwehr einerseits antiparasitär wirksam, kann aber andererseits bei überschießender Aktivierung in vulnerablen Organen wie Gehirn und Niere zu Organkomplikationen führen.

Semi-Immune haben dagegen antiparasitäre Immunmechanismen ausgebildet, die gegen alle Parasitenstadien wirken und die Parasitenreplikation einschränken.

Bei der **humoralen**, d.h. durch Antikörper vermittelten, **Immunität** wird eine spezifische Antikörperbildung im Verlauf einer Plasmodieninfektion durch verschiedene Plasmodienantigene – Antigene die auf der Oberfläche freilebender Parasitenstadien (Sporozoit, Merozoit) und auf infizierten Erythrozyten lokalisiert sind sowie an Molekülen, die an der Invasion der Wirtszellen beteiligt sind - provoziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Übertragung von Immunglobulinen von Semi-Immunen auf Nicht-Immune Malariakranke zu einer deutlichen Reduzierung der Parasitämie führt, wobei eine endgültige Parasitenelimination allerdings nicht erreicht wird [Sabchareon et al., 1991].

### 1.7.2 Humorale Immunität und Malaria

Das menschliche Immunsystem produziert nach Kontakt des Organismus mit einem Antigen sogenannte Immunglobulin-Proteine, die von B-Lymphozyten des Immunsystems gebildet und als sogenannte Antikörper in Serum, Gewebsflüssigkeit und Körpersekreten oder als Antigenrezeptoren auf der Zellmembran von B-Lymphozyten vorkommen. Während ein Teil des Antikörpers – der sogenannte Fab-Teil - an das Antigen bindet, reagiert der andere Teil des Antikörpers – der sogenannte Fc-Teil - mit den anderen Zellen des Immunsystems. So besitzen

Neutrophile, Makrophagen und andere mononukleäre Phagozyten Fc-Rezeptoren an ihrer Oberfläche.

Die Antikörper – deren Grundstruktur aus zwei identisch schweren, sogenannten „H(heavy)-Ketten“, und zwei identisch leichten, sogenannten „L(light)- Ketten“, gebildet wird – siehe Anhang, Abbildung **10-3**, werden aufgrund der unterschiedlichen Struktur ihrer schweren Kette in fünf Klassen eingeteilt: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM.

IgA wird dabei nochmals in zwei, IgG in vier Subklassen unterteilt.

IgM wird von B-Zellen des Immunsystems im nicht aktivierten Zustand zusammen mit IgD transmembranär als Antigen-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert. Kommt es zum primären Kontakt mit einem Antigen, so wird IgM als erste Antikörperklasse ausgeschüttet, wobei diese aber nicht die Plazentaschranke überwinden kann.

Eine starke IgM-Produktion der Plasmazelle – aktivierte B-Zelle - kennzeichnet somit den primäre Kontakt mit einem Antigen. Durch u.a. T-Zell-vermittelte Signale kommt es nachfolgend zum sogenannten „Isotypen-switch“, indem die B-Zelle unter Beibehaltung der Spezifität durch Transkription einer anderen schweren Kette die produzierte Immunglobulinklasse ändert.

So erreicht IgG nach sekundärer Stimulation besonders hohe Titer. Dabei tritt IgG beim Menschen durch die Plazenta und vermitteln damit dem Neugeborenen ein hohes Ausmaß passiver Immunität. Auch die intestinale Resorption von IgG aus der Muttermilch kann diesen Effekt verstärken.

Das IgG im Fetus und im Neugeborenen stammt ausschließlich von der Mutter. Es verschwindet, wenn der Säugling im Alter von 9 Monaten beginnt eigenes IgG zu synthetisieren. Mit 12 Monaten erreicht der Säugling eine sechzigprozentige IgG-Produktion des Erwachsenen-Serumspiegels.

IgG ist das Hauptimmunglobulin im normalen menschlichen Serum des Erwachsenen und macht dabei 70-75% des gesamten Immunglobulinpools aus.

Sowohl IgG als auch IgM vermögen das Komplementsystem - eine komplexe Gruppe von Entzündungsreaktionen vermittelnder Serumproteine - zu aktivieren. IgG zeigt dabei eine wesentlich höhere Affinität zum Antigen als IgM.

Diese Aktivierung der Kaskade der Komplementenzyme ist einer der wichtigsten Effektormechanismen von IgG-1- und IgG-3- Molekülen, die die höchste Affinität für Fc-Rezeptoren innerhalb der IgG-Subklassen besitzen. IgG-2 scheint weniger effektiv

bei der Aktivierung von Komplement zu sein, während IgG-4, IgA, IgD und IgE in dieser Hinsicht wirkungslos sind. IgG-Moleküle interagieren mit einer großen Zahl von zellulären Fc-Rezeptoren. Damit fördern sie die Phagozytose - Neutrophile, Makrophagen, Monozyten -, die antikörperabhängige Zytotoxizität - NK-Zellen, Monozyten - und die Plazentagängigkeit - plazentaler Synzytiotrophoblast.

IgG diffundiert rascher als andere Immunglobuline in die extravaskulären Kompartimente des Körpers. Dabei neutralisiert IgG dort hauptsächlich bakterielle Toxine und erleichtert durch Anheftung an Mikroorganismen deren Phagozytose [Kretschmer et al., 1996; Roitt, 1993; Roitt et al., 1995].

**Abbildung 1-1: Klassifikation und Eigenschaften der IgG-Isotypen (nach Ferrante und Rzepczyk 1997)**

Eigenschaften	<b>IgG1</b>	IgG2	<b>IgG3</b>	IgG4
schwere Kette	$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\gamma_3$	$\gamma_4$
Molekulargewicht (kDa)	<b>146</b>	146	<b>170</b>	146
Disulfidbrückenanzahl zwischen den Ketten	<b>2</b>	4	<b>13</b>	2
Halbwertszeit (Tage)	<b>23</b>	23	<b>8</b>	23
Komplement-Fixierung	<b>stark</b>	schwach	<b>stark</b>	null
Bindung an den Fc-Rezeptor	<b>stark</b>	schwach	<b>stark</b>	schwach
Plazenta-Transport	<b>ja</b>	nein	<b>ja</b>	ja
mittlere Konzentration im Serum (mg/ml)	<b>9</b>	3	<b>1</b>	0,5

Antikörper gegen Polysaccharide – z.B. bakterielle Zellwandbestandteile – sind vor allem vom Typ IgG-2, während IgG-1 und IgG-3 hauptsächlich gegen Proteine gebildet werden. Bei chronischen Infektionen - wie der Onchozerkose - dominiert dagegen IgG-4 [Dafa`alla, 1992].

Die Länge der Kontaktzeit der B-Zellen des Immunsystems mit dem Antigen bestimmt, ob IgG-1 oder IgG-3 der vorherrschend produzierte Antikörper ist. Kurz nach Beginn der Infektion werden noch beide Isotypen gleichermaßen exprimiert, bevor es im

weiteren Verlauf zu einem Wechsel von IgG-3 zu IgG-1 kommt. Unterbleibt jedoch ein Wechsel zu IgG-1, so muss es zur Aufrechterhaltung der IgG-3-Produktion - bedingt durch die wesentlich kürzere Halbwertszeit von IgG-3 gegenüber IgG-1 - siehe Abbildung 1-1 - immer wieder zu einem Parasitenkontakt kommen [Ferrante und Rzepczyk, 1997].

Schützende Immunität bei Malaria scheint überwiegend mit Gamma-Immunglobulinen assoziiert zu sein. Dabei bieten die zytophilen Subklassen IgG-1 und IgG-3 u.a. möglicherweise Schutz vor schwerer Malaria [Bouharoun-Tayoun und Druilhe, 1992; Ferrante und Rzepczyk, 1997; Taylor et al., 1998; Wahlgren et al., 1983]. Untersuchungen am Schizonten-Antigen ergaben, dass IgG-1 und IgG-3 - als die zytophilen Isotypen - mit Protektion, und die nicht-zytophilen Isotypen IgG-2 und IgG-4 mit schwerer Malaria korrelieren [Aribot, 1996; Bouharoun-Tayoun und Druilhe, 1992].

## **1.8 Impfstoffentwicklung bei Malaria tropica**

Während der letzten zwei Jahrzehnte sind große Forschungsanstrengungen zur Identifizierung von Malaria-Antigenen, die in den Schutz vor einer Malaria-Erkrankung involviert sind, unternommen worden. Dabei wurde eine Aufklärung der Mechanismen angestrebt, mit denen das Immunsystem die Parasiten zu neutralisieren versucht. Eine große Anzahl von Antigenen konnte dabei identifiziert werden:

1. Oberflächenantigene bei Sporozoiten (z.B. CSP – Circumsporozoite protein)
2. Oberflächenantigene bei Merozoiten (z.B. Merozoite-Surface-Proteine (MSPs) )
3. Lösliche Antigene, die beim Rupturieren von befallenen Wirtszellen oder abgetöteten Parasiten freigesetzt werden

4. Oberflächenantigene, die in der Membran von befallenen Wirtszellen von Seiten des Parasiten eingelagert werden (z.B. *Plasmodium falciparum*-Erythrozyte-Membran-Protein-1 (PfEMP-1)).

Heute werden 4 Hauptstrategien bei der Entwicklung eines Malaria-Impfstoffs verfolgt:

1. Blockierung des Eindringens und der Entwicklung der Sporozoiten in den Hepatozyten - Anti-Infektions-Impfstoff -
2. Verhinderung der Invasion von Erythrozyten durch Merozoiten und Hemmung der Entwicklung von Schizonten - Anti-Krankheits-Impfstoff -
3. Blockierung der ungünstig Pathologie-induzierenden Effekte von Zytokinen, Parasiten-Sequestration und -Adhäsion - Krankheit-modifizierender-Impfstoff -
4. Entwicklung eines „altruistischen“ Impfstoffs, der eine menschliche Mosquito-Transmission durch eine Immunisierung gegen die sexuellen Stadien oder Gameten blockiert - Transmission-Blockierungs-Impfstoff .

Die Induktion passiver Immunität durch Gammaglobulinfraktionen sowie die Fähigkeit polyklonaler und monoklonaler Antikörper, die Vermehrung der Blutstadien des Parasiten *in vitro* zu inhibieren, stützen die Auffassung, dass zumindest unter experimentellen Bedingungen eine durch eine humorale Immunantwort vermittelte Immunität erzielt werden kann. Wesentliche Voraussetzung für eine kausal begründete Identifizierung von Antigenen, die die Bildung protektiver oder inhibierender Antikörper induzieren könnten, sind Kenntnisse über die Lokalisation und mögliche Funktionen dieser Antigene. Eine Erkennung dieser Antigene sollte es dem Antikörper ermöglichen, entweder freie Parasiten oder infizierte Wirtszellen zu opsonieren oder spezifische, für den Parasiten essentielle Funktionen des Antigens zu inhibieren. Ein großes Interesse besteht daher an Antigenen, die auf der Oberfläche freilebender Parasitenstadien – Sporozoiten, Merozoiten – und auf infizierten Erythrozyten – z.B. PfEMP-1 [Köhler, 2000] - lokalisiert sind, sowie an Molekülen, die an der Invasion der Wirtszelle beteiligt sind.

In den asexuellen erythrozytären Parasitenstadien ist die Zahl der Parasitenproteine, die vom Wirt unter natürlichen Infektionsbedingungen als immunogen erkannt werden,

wesentlich höher als in Sporozoiten oder Gamonten. Die Höhe der Antikörpertiter gegen Gesamtextrakte dieser Stadien korreliert jedoch nicht mit einer Immunität, und viele Antigene erythrozytärer Stadien werden auch von nichtimmunen Individuen erkannt. Daher bestehen Bemühungen aus der Vielzahl der Antigene solche zu identifizieren, die die Bildung von möglicherweise für eine Immunität relevanten Antikörpern induzieren.

Dabei wird der anzustrebende effektive wirksame Impfstoff in einem Sub-Unit-Impfstoff gesehen, der aus einem Cocktail der oben genannten Partialimpfstoffe besteht und somit alle Arme der Immunantwort gegen die verschiedenen Stadien des Lebenszyklus zu einem Zeitpunkt stimulieren würde [Bathurst et al., 1993].

Als ein gut geeigneter Sub-Unit-Impfstoff-Kandidat erscheint das Merozoite Surface Protein-1, ein Oberflächenprotein der Merozoiten von *Plasmodium falciparum* (PfMSP-1) [Cooper 1993; Diggs et al., 1993]: dessen 19 kDa C-terminales Prozessierungs-Produkt – MSP-1<sub>19</sub> - ist Ziel von das Parasitenwachstum inhibierenden monoklonalen Antikörpern [Chappel und Holder, 1993], die die Prozessierung des Vorläufermoleküls inhibieren - ein Prozess der für die Merozoiteninvasion erforderlich zu sein scheint [Blackman et al., 1994]. Epidemiologische Studien in Malaria-endemischen Gebieten konnten zeigen, dass dort *Plasmodium falciparum*-MSP-1<sub>19</sub> seropositive Kinder signifikant höhere Schutzraten vor Malaria aufweisen als seronegative Kinder [Branch et al., 1998; Egan et al., 1996]. Desweiteren induziert die äquivalente Region von MSP-1 des Nagetier-Malaria-Parasiten *Plasmodium yoelii* hohe protektive Immunität-Niveaus in Mäusen [Daly und Long, 1993; Ling et al., 1994]. Dabei indiziert die Dynamik dieser Immunantwort einen durch Antikörper vermittelten Schutz.

## 1.9 Merozoite-Surface-Protein-1 (MSP-1)

Merozoite-Surface-Protein-1 (MSP-1), auch Merozoite-Surface-Antigen-1 (MSA-1) genannt, gehört zu einer Gruppe von Proteinkomplexen, die auf der Oberfläche von Merozoiten lokalisiert sind. Bisher wurden vier *Plasmodium falciparum* Merozoiten-Oberflächenproteine (MSPs), die möglicherweise alle über Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anteile in der Membran des Merozoiten verankert sind [Gerold et al., 1996], identifiziert und als MSP-1, -2, -4 und -5 benannt [Holder, 1994; Marshall et al., 1997; Wu et al., 1999]. Ein fünftes und sechstes identifiziertes Protein, MSP-3 und MSP-6<sub>36</sub>, sind lösliche Proteine und werden in Teilen auf der Merozoitenoberfläche gebunden [McColl et al., 1994; Oeuvray et al., 1994; Trucco et al., 2001].

**MSP-1** ist ein ~ 200 kDa großes Glykoprotein, das in Größe und Aminosäuresequenz in verschiedenen Parasitenlinien differiert. Das Oberflächenprotein ist hoch-polymorph. Es besitzt Proteinsegmente, die zwischen den verschiedenen Stämmen von *Plasmodium falciparum* unterschiedlich stark variieren. Analysen der MSP-1 Sequenzen in einer großen Anzahl von *Plasmodium falciparum*-Isolaten hat gezeigt, dass MSP-1 17 Domänen aufweist. Einige sind hoch konserviert (Domänen 1,3,5,12,17), andere dimorph – MAD20- und K1/Wellcome-Typ - (Domänen 6 bis 11 und 13 bis 16) und wieder andere variieren in breiter Form zwischen den verschiedenen Klonen (Domänen 2 und 4) [Holder et al., 1999; Tanabe et al., 1987; Wahlgren und Perlmann, 1999].

MSP-1 wird während der Schizogonie synthetisiert und auf der Oberfläche des sich intrazellulär entwickelnden Merozoiten exprimiert. Kurz vor oder während der Freisetzung der Merozoiten aus dem Schizonten wird dieses Protein erstmalig proteolytisch gespalten, so dass ein Komplex aus vier Polypeptidfragmenten mit einem Molekulargewicht von ~83 (MSP-1<sub>83</sub>), 30 (MSP-1<sub>30</sub>), 38 (MSP-1<sub>38</sub>) und 42 kDa (MSP-1<sub>42</sub>) entsteht. Dabei enthalten diese vier Fragmente folgende Domänen: MSP-1<sub>83</sub> die Domänen 1 bis 7, MSP-1<sub>30</sub> die Domänen 8 und 9, MSP-1<sub>38</sub> die Domänen 10 bis 14 und MSP-1<sub>42</sub> die Domänen 15 bis 17. Außerdem beinhaltet dieser neu gebildete Komplex zwei weitere Proteine mit 22 kDa und 36 kDa, die von zwei anderen Genen abstammen [Stafford et al., 1994; Trucco et al., 2001]. Der gesamte Komplex wird

durch nicht-kovalente Verbindungen zwischen den einzelnen Untergruppen zusammengehalten und mit der Merozoitenoberfläche durch das 42 kDa Fragment verbunden, das über eine hydrophobe, C-terminal lokalisierte GPI-Ankersequenz in der Membran des Merozoiten verankert ist [Holder und Freeman, 1984; Holder et al., 1987; Lyon et al., 1986; McBride und Heidrich, 1987].

Während oder kurz vor der Erythrozyteninvasion wird das 42 kDa Fragment von MSP-1 (MSP-1<sub>42</sub>) in einem zweiten Prozess gespalten. Als Resultat verlässt der gesamte Komplex mit dem vom N-terminalen Teil des MSP-1<sub>42</sub> stammenden 33 kDa Fragment (MSP-1<sub>33</sub>) die Merozoitenoberfläche. Auf dieser verbleibt nur ein schmales GPI-verankertes und hoch konserviertes C-terminales Fragment (**MSP-1<sub>19</sub>**), das aus unter 100 Aminosäuren besteht – die cysteinreiche Domäne 17. MSP-1<sub>19</sub> wird somit auf der Merozoitenoberfläche mit in den neu invadierten Erythrozyten genommen [Holder et al., 1999].

MSP-1<sub>19</sub> enthält zwei den epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF – epidermal growth factor) ähnliche Domänen [Blackman et al., 1990; Blackman et al., 1991; Blackman und Holder, 1992] und ist innerhalb und zwischen den Plasmodien-Spezies hoch konserviert [Cooper, 1993]. Basierend auf bisher durchgeführte molekular-epidemiologische Studien konnten 4 Allele der 19 kDa-Domäne identifiziert werden: K1/Wellcome-Typ [Holder et al., 1985], PNG-MAD20-Typ [Tanabe et al., 1987], Uganda-PA-Typ [Chang et al., 1988] und Indo-Typ [Kang und Long, 1995]. 1998 wurden drei weitere Allele in Parasitenisolaten aus West-Kenia beschrieben [Qari et al., 1998]. Intragene Rekombination zwischen den dimorphen MSP-1-Formen wird dabei als Variabilitätsmechanismus vorgeschlagen [Conway et al., 1991; Hughes, 1992; Kaneko et al., 1997; Qari et al., 1998].

MSP-1<sub>19</sub> stellt damit ein bedeutendes Ziel zur Impfstoffentwicklung dar.

### 1.10 Humorale Immunität und MSP-1

Gegen Antigene der Merozoitenoberfläche gerichtete Antikörper können mit diesen während deren erythrozytärem Zyklus auf verschiedenen Wegen interferieren. Die Antikörper haben die Möglichkeit durch die geöffnete Erythrozytenmembran während der Merozoitenentlassung aus dem Schizonten in diesen einzuwandern um dort die Merozoiten zu agglutinieren und dadurch deren Ausbreitung zu unterbinden [Lyon et al., 1989]. Nach Austritt der Merozoiten aus den Schizonten können gegen spezielle Isotypen gerichtete Antikörper die Parasitenelimination durch Komplement-abhängige Lyse oder durch zelluläre Effektormechanismen, wie der Phagozytose oder der Zelltötung durch monozytäre Mediatoren, bewirken [Bouharoun-Tayoun et al., 1995]. Antikörper, die direkt gegen die Merozoitenoberfläche gerichtet sind, können ebenso die Invasion der Merozoiten in die Erythrozyten inhibieren, indem sie die Bindung der Merozoiten an die Erythrozytenoberfläche und damit den essentiellen ersten Schritt im Invasionsprozess blockieren. Antikörper gegen die Antigene der Merozoitenorganellen werden für die Blockierung der Merozoiteninvasion durch Eingreifen in spätere Schritte im Invasionsprozess verantwortlich gemacht.

MSP-1 wurde erstmals in *Plasmodium yoelii* identifiziert. Dabei induzierte es bei Mäusen Schutz gegen Malaria, wenn diese mit dem nativen Antigen immunisiert wurden [Holder und Freeman, 1981]. MSP-1 konnte nachfolgend in weiteren Plasmodium-Spezies identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass dieses Antigen ein Ziel für Antikörper-vermittelte Neutralisation der Parasiten in *Plasmodium chabaudi* [Boyle et al., 1982; Lew et al., 1989] und *Plasmodium knowlesi* [Epstein et al., 1981] war. In einer großen Anzahl von Studien wurde MSP-1 von *Plasmodium falciparum* mit protektiver Immunität in Zusammenhang gebracht. In diesen Untersuchungen waren seroepidemiologische Studien über natürlich-erworbene Immunität, Impfstoff-Studien in nicht-humanen Primaten und in vitro-Studien mit *Plasmodium falciparum*-Kulturen eingeschlossen [Holder, 1988; Holder 1996].

Dabei musste zur Befähigung des Merozoiten zur Invadierung des Erythrozyten vorher die Spaltung von MSP-1<sub>42</sub> in ein 33 kDa und ein 19 kDa membranverankertes Fragment erfolgen [Holder et al., 1992].

Der hohe Grad von Polymorphismen, den das Antigen zeigt, wird in Übereinstimmung mit dem durch die protektive Immunantwort hervorgerufenen Selektionsdruck gesehen [Diggs et al., 1993]. Die humane Antikörperantwort auf MSP-1 scheint hauptsächlich gegen nicht-konservierte Regionen des Antigens gerichtet zu sein [Früh et al., 1991; Müller et al., 1989]. Dabei wurde bisher die Antikörperreaktion mit dem C-terminalen EGF-ähnlichen Regionen von MSP-1<sub>19</sub> wahrscheinlich dahingehend unterschätzt, als dass die korrekte Tertiär-Struktur des Antigens essentiell für dessen Antikörpererkennung zu sein scheint [Egan et al., 1995; Egan et al. 1999]. Auch wenn keine ersichtliche Korrelation zwischen den totalen Antikörpern gegen MSP-1 und klinischer Immunität besteht [Wahlgren et al., 1986], so konnten ein hoher Antikörpertiter gegen MSP-1<sub>19</sub> dennoch mit einem Schutz vor klinischer Malaria und schwerer Parasitämie assoziiert werden [Al-Yaman et al., 1996; Egan et al., 1996; Riley et al., 1992]. Zudem zeigten Kleinkinder mit hohen Antikörpertitern gegen MSP-1<sub>19</sub> ein verringertes Risiko in der Ausbildung einer Malaria während ihres ersten Lebensjahres [Hogh et al., 1995].

Die Immunisierung von Aotus-Affen mit gereinigtem MSP-1-Antigen induzierte einen kompletten Schutz gegen den homologen *Plasmodium falciparum*-Stamm [Siddiqui et al., 1987]. Serum von diesen Affen wiederum inhibierte das in vitro Wachstum desselben Parasitenstammes [Hui und Siddiqui, 1987]. Allerdings zeigte sich in nachfolgenden Impfversuchen in Affen mit rekombinanten MSP-1 Proteinen oder synthetischen Peptiden eine nur inkonsequente Induzierung von Schutz vor Malaria tropica [Chang et al., 1996; Cheng et al., 1991; Etlinger et al., 1991; Holder et al., 1988; Kumar et al., 1993; Kumar et al., 1995]. Während in einigen Studien eine Korrelation zwischen einem Schutz vor Malaria und der in vitro-Aktivität von Antikörpern in der Parasitenwachstum-Inhibierung gezeigt werden konnte [Chang et al., 1996], wurde solch eine Korrelation in anderen Studien nicht gefunden [Kumar et al., 1993; Kumar et al., 1995].

Mit Experimenten in *Plasmodium falciparum* in vitro-Kulturen konnte demonstriert werden, dass PfMSP-1 ein Ziel für Invasions-inhibierende Antikörper darstellt. In den

meisten Studien mit monoklonalen Maus-Antikörpern – unter Einschluss der mit den polymorphen Tripeptid-Wiederholungen im N-Terminus des Antigens reagierenden Antikörpern [Locher et al., 1996] und den die Epitope im C-Terminus erkennenden Antikörpern [Blackman et al., 1990; Cooper et al., 1992; Pirson und Perkins, 1985] - wurden zur Inhibition allerdings relativ hohe Antikörper-Konzentrationen benötigt (200-500 mg/ml für eine 50%ige Inhibition). Eine 10- bis 100-fach effizientere Wachstumshemmung von *Plasmodium falciparum* konnte in vitro mit humanen mono- oder oligoklonalen Antikörpern gegen PfMSP-1 gezeigt werden. Allerdings wurde die Lokalisation von den im Antigen erkannten Epitopen nicht bestimmt [Brown et al., 1986; Schmidt-Ulrich et al., 1986]. Die hauptsächlichen Zielepitope für die inhibierenden Antikörper wurden im MSP-1<sub>19</sub> Fragment gefunden. Sie zeigen dabei eine Abhängigkeit von der nativen Konformation der EGF-ähnlichen Domänen [Blackman et al., 1990; Chang et al., 1992; Hui et al., 1991; Locher und Tam, 1993]. In diesem Zusammenhang scheinen ebenfalls Epitope im MSP-1<sub>42</sub> -Fragment am Ort der proteolytischen Prozessierung während der zweiten Spaltung von MSP-1 von Bedeutung zu sein, da dort eine gute Korrelation zwischen der Fähigkeit der Antikörper mit dieser Prozessierung zu interferieren und ihrer Merozoiten Invasions-Inhibierungs-Aktivität festgestellt werden konnte [Blackman et al., 1994]. Allerdings inhibierten einige Antikörper, die Epitope nahe am Spaltungsort erkennen, nicht die Spaltung und hatten auch keinen Effekt auf die Merozoiten-Invasion. Dafür interagierten diese aber mit der Bindung von inhibierenden Antikörpern [Blackman et al., 1994]. In ähnlicher Weise konnte gezeigt werden, dass natürlich erworbene humane Antikörper, die die erste EGF-ähnliche Domäne von MSP-1 erkennen, keine Inhibition des Parasitenwachstum in vitro zeigten, dafür aber die Bindung von einem inhibitorischen monoklonalen Antikörper blockierten [Chappel et al., 1994; Guevara Patino et al., 1997]. Inhibitorische und blockierende Antikörper und deren Epitope innerhalb des PfMSP-1<sub>19</sub> konnten kürzlich nachgewiesen werden [Holder et al., 1999; Uthapibull et al., 2001]. Conway und Mitarbeiter konnten 2000 zudem mit einer prospektiven longitudinalen Kohorten-Studie zeigen, dass auch gegen die häufigsten vorkommenden Allel-Typen der Domäne 2 des MSP-1 gerichtete IgG-Antikörper mit Schutz vor Malaria tropica assoziiert sind [Conway et al., 2000].

## 1.11 Zielsetzung der Arbeit

Seit mehr als 5 Jahren werden verschiedene Einflussfaktoren wie Immunität, Parasitengenetik, Vektorverhalten und sozioökonomische Faktoren auf den Ausgang einer *Plasmodium falciparum*-Infektion in Lambaréné untersucht [Kun et al., 1998a; Kun et al., 1998b; Luckner et al., 1998; Luty et al., 1999; Luty et al., 2000; Lell et al., 1999; Sylla et al., 2000; Sylla et al., 2001].

Ziel dieser Arbeit war festzustellen, ob Kinder aus diesem Gebiet mit stabiler *Plasmodium falciparum*-Transmission eine spezifisch humorale Immunreaktion auf den konservierten C-terminalen Teil des Merozoiten-Oberflächenantigens MSP-1 – MSP-1<sub>19</sub> - aufweisen. Dabei sollte untersucht werden, ob sich diese humorale Immunreaktion zwischen Kindern, die schwer an der Malaria tropica erkranken, und solchen, die nur mild erkranken, unterscheidet.

Dazu wurden die Antikörperspiegel von IgG-gesamt und der zwei zytophilen IgG-Subklassen – IgG-1 und IgG-3 – von jeweils 100 Kindern mit schwerer und milder Malaria tropica mittels ELISA-Technik bestimmt.

Die Ergebnisse sollten dann mit den zuvor in derselben Patientengruppe erhobenen Daten wie Alter, Geschlecht, Reinfektionsrate (IDR), AB0-Blutgruppe, Sichelzellgen-Trägerschaft, MBL- und NOS-2-Mutation und Parasitämie verglichen und auf Korrelationen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsmaterial

#### 2.1.1 Herkunft der Blutplasmaproben; 1/95C Studie

##### 2.1.1.1 Aufbau der 1/95C Studie; Studiengruppen und Aufnahmekriterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Blutplasmaproben wurden am Albert Schweitzer Hospital in Lambaréné, Gabun, innerhalb der sogenannten 1/95C Studie gesammelt.

Erkrankte Kinder, die die pädiatrische Ambulanz des Hospitals aufsuchten und bei denen der klinische Verdacht einer Malaria bestand, wurden zur weiteren Malariadiagnostik in das Forschungslabor überwiesen. Bestätigte sich dort der Verdacht einer Malaria und erfüllte das jeweilige Kind die Einschlusskriterien der 1/95C Studie, erfolgte eine Aufklärung dieses Kindes und seiner Eltern über die Studienbedingungen und -ziele. Nach Einwilligung der Eltern fand die Aufnahme des Kindes in die Studie statt.

Das Ethik-Komitee der Internationalen Stiftung des Albert-Schweitzer-Hospitals begutachtete die Studie und erteilte eine Zulassung.

Ziel dieser 1/95C Studie war ein Vergleich von unkomplizierter und schwerer *Plasmodium falciparum*-Malaria bei Kindern in einem für Malaria hyperendemischen Gebiet - siehe Kapitel 1.5.

Die Auswahl der Patienten wurde so vorgenommen, dass bei der Auswertung der Patientendaten eine paarweise Analyse möglich war, d.h. eine sog. „**matched pair case control study**“.

Zwischen Januar 1995 und Dezember 1996 erfolgte die Aufnahme von insgesamt 200 Kinder mit akuter *Plasmodium falciparum*-Malaria in die Studie. Davon bildeten einhundert Kinder mit schwerer Malaria die sogenannte S-Gruppe. Weitere 100 Kinder mit unkomplizierter, milder Malaria, bildeten als Kontrollgruppe die sogenannte M-Gruppe. Die Auswahl der Kinder dieser M-Gruppe erfolgte so, dass die aufgenommenen Kinder jeweils den einzelnen Patienten der S-Gruppe nach Alter

( $44 \pm 23$  Monaten als Durchschnitt), Geschlecht (61 weiblich, 39 männlich) und Herkunft entsprachen.

**Einschlusskriterien** waren eine *Plasmodium falciparum*-Malaria mit einer Parasitämie von mindestens 1000 Parasiten/ $\mu$ l, ein Alter von mehr als 6 Monaten, keine homozygote Trägerschaft des Sichelzellgens (HbSS), einen Wohnort nicht weiter als 30 Kilometer vom Hospital entfernt und eine Einwilligung der Eltern nach Aufklärung.

**Schwere *Plasmodium falciparum*-Malaria** wurde dabei wie folgt definiert:

- Hyperparasitämie (>250 000 ungeschlechtliche *Plasmodium falciparum* Parasiten /  $\mu$ l, entspricht > 10% infizierte Erythrozyten)
- und/oder
- schwere Anämie (Hämoglobin < 50 g / l)

und andere Zeichen schwerer Malaria, wie

- zerebrale Malaria (in dem für Kinder modifizierten Blantyre Komacore weniger als 4 von 5 möglichen Punkten – siehe Anhang, Abbildung **10-5**)
- Hypoglykämie (< 40 mg / dl)

[Warrell et al., 1990]

Für jedes S-Kind erfolgte als Kontrolle frühestmöglich die Aufnahme eines M-Kindes gleichen Geschlechts mit einem Altersunterschied von nicht mehr als sechs Monaten, das an *Plasmodium falciparum*-Malaria litt.

Einschlusskriterium für **unkomplizierte** (milde) *Plasmodium falciparum*-**Malaria** war:

- Parasitämie ( 1 000 – 50 000 /  $\mu$ l ) bei Aufnahme
- fehlender Nachweis von Schizonten im Dicken Tropfen
- Hämoglobinkonzentration > 80 g / l
- Thrombozytenkonzentration > 50 000 /  $\mu$ l
- Leukozytenkonzentration < 12 000 /  $\mu$ l
- Blutglukosekonzentration > 50 mg / dl

- Laktatkonzentration < 3 mM
- zirkulierende Leukozyten mit Malaria-Pigment < 50 /  $\mu$ l

**Ausschlusskriterien** für M- Kinder waren:

- Anzeichen einer schweren Malaria oder einer anderen akuten Infektion
- eine frühere Hospitalisation (um eine eventuell frühere schwere Malaria auszuschließen)
- Einnahme von Anti-Malaria-Mitteln innerhalb von 7 Tagen vor Aufnahme
- chronische Krankheit
- Unterernährung

[Kun et al., 1998a]

Es erfolgte eine Numerierung der Patienten der S-Gruppe entsprechend der zeitlichen Reihenfolge ihrer Aufnahme von 1 bis 100: 1S, 2S,... 100S.

Die Patienten der M-Gruppe wurden als Kontrollpatienten denen der S-Gruppe zugeordnet und tragen deren Nummern: 1M, 2M,... 100M.

Bei der paarweisen Analyse der Daten bilden ein Patient mit schwerer *Plasmodium falciparum*-Malaria und sein Kontrollpatient mit unkomplizierter *Plasmodium falciparum*-Malaria ein Paar.

### **2.1.1.2 Behandlung der Patienten**

Kinder mit schwerer Malaria wurden mindestens vier Tage stationär aufgenommen und mit einer Kombinationstherapie von Chinin und Clindamycin intravenös behandelt [Kremsner et al., 1995].

Kinder mit unkomplizierter (milder) Malaria bekamen ambulant eine einmalige orale Dosis von Sulfadoxin und Pyrimethamin [Schmidt-Ott et al., 1997] und wurden danach zweimal täglich zur Kontrolle bis zum negativen Parasitennachweis einbestellt.

Zusätzliche Anwendung supportiver Therapien – z.B. physikalische fiebersenkende Maßnahmen (Ventilation, Wadenwickel), Gabe von Antipyretika, Antibiotika, Antiemetika – erfolgte bei Bedarf.

### **2.1.1.3 Nachuntersuchungen - Longitudinalstudie**

Nach der Behandlung wurden die Patienten für mehrere Jahre alle 2 Wochen zur Nachuntersuchung einbestellt oder zu Hause aufgesucht. Dabei erfolgte jedesmal die Anfertigung eines Dicken Tropfens [Kremsner et al., 1988] und die rektale Bestimmung der Körpertemperatur. Alle auftretenden Erkrankungen wurden dokumentiert und gegebenenfalls ambulant oder stationär behandelt.

Somit konnten die Reinfektionsrate, die Zeit bis zur ersten *Plasmodium falciparum*-Reinfektion, immunologische Daten, etc. genau erhoben werden.

Die Entnahmen venöser Blutproben für diese Arbeit fanden am Tag der Aufnahme in die Studie vor Beginn der Chemotherapie und zweimal während der nachuntersuchenden longitudinalen follow-up-Studie statt.

### **2.1.2 Entnahme der Blutplasmaproben**

Für immunologische Untersuchungen erfolgte eine Abfüllung venösen Blutes in sterile, EDTA enthaltende Röhrchen. Nach Zentrifugation des Vollbluts (für die Separation von mononukleären Zellen) wurde das Blutplasma entnommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für spätere Antikörpertests tiefgefroren.

Plasmaprobeentnahmen fanden nach diesem Verfahren zu folgenden Zeitpunkten statt :

Tag 0 (akute Phase) :                   Plasmaproben von jeweils 100 Patienten in beiden  
  Gruppen (S- und M- Gruppe) – 61 weibliche und 39  
  männliche - während der akuten *Plasmodium falciparum*-

Malaria, d.h. bei Aufnahme in die Studie vor  
Verabreichung des ersten Chemotherapeutikums

Tag 28 (Rekonvaleszenz) : Plasmaproben ein Monat nach Behandlung von den nun rekonvaleszenten Patienten aus der S- und M-Gruppe; zwischen Tag 0 und Tag 28 wurden einige Patienten reinfiziert

Tag 180 („gesunder“/infektionsfreier Zustand) :

Plasmaproben der S- und M- Gruppe frühestens sechs Monate nach Aufnahme (Tag 0), wenn das Kind frei von jeglichen klinischen Infektionen war und mindestens drei aufeinanderfolgende *Plasmodium falciparum* negative Dicke Tropfen in der zweiwöchentlichen Nachfolgeuntersuchung vor der Blutentnahme aufgewiesen hatte

Da nicht alle Kinder über den Zeitraum von 6 Monaten nachverfolgt werden konnten, liegen Plasmaproben nur wie folgt vor:

Tag 28 : Plasmaproben von 81 M- und 73 S-Kinder

Tag 180 : Plasmaproben von 66 M- und 65 S-Kinder

### 2.1.3 Aufbereitung der Blutplasmaproben

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Plasmaproben wurden in PBS 1:20 verdünnt, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für die folgenden ELISA-Untersuchungen wieder eingefroren.

Nach dem erneuten Auftauen - direkt vor der Plasmaverwendung im ELISA - erfolgte eine weitere Verdünnung in PBS (0,5%) –Tween20-1% BSA. Aufgrund der Ergebnisse der TEST-ELISA wurden folgende Gesamtverdünnungen verwendet:

- für IgG-gesamt-ELISA: 1 : 800
- für IgG-Subklassen-ELISA: 1 : 50

Die Plasmaverdünnung fand in 1,2ml-Probenröhrchen statt und wurde mit einer Multi-Kanal-Pipette direkt auf die ELISA-Platten übertragen.

## **2.2 Verwendetes Antigen**

Das in dieser Arbeit verwendete Antigen ist der 19 kDa C-Terminus des K1/Wellcome-Typs des Merozoiten-Oberflächenantigens Merozoite-Surface-Protein-1 (MSP-1<sub>19</sub>) [Miller et al., 1993], exprimiert in *Escherichia coli* als ein Fusionsprotein mit dem 26,7 kDa C-Terminus der Glutathion-S-Transferase (GST) von *Schistosoma japonicum* [Burghaus und Holder, 1994; Smith und Johnson, 1988].

Als Kontrolle wurde unfusioniertes GST verwendet.

Die Antigensynthesierungen erfolgte durch das Labor von Prof. Tony Holder am National Institute for Medical Research, London.

437 µg des verwendeten MSP-1<sub>19</sub> -Antigen wurden in 1 ml sterilem PBS gelöst und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Von dem zur Kontrolle verwendeten GST-Antigen wurden 1 mg in sterilem PBS in Lösung gebracht und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Für die ELISA-Untersuchungen erfolgte die Verwendung der auf Raumtemperatur gebrachten Peptide.

## 2.3 Antikörpermessung mit der ELISA-Methode

Zur Messung der MSP-1 spezifischen IgG-gesamt- und IgG-Subklassen-Antikörper-Antwort wurden Standard ELISA Methoden verwendet.

Die Durchführung der Antikörpermessung fand wie im Folgenden dargestellt statt.

### 2.3.1 Prinzip des ELISA (Enzyme Linked Immunsorbent Assay)

Der Enzym-gekoppelte Immunsorbent-Assay (ELISA) gehört zu den Immunassays. Ein Immunassay ist eine Technik, bei der mittels einer immunologischen Reaktion die Anwesenheit einer Substanz gemessen wird [Kemeny, 1994] - im Fall dieser Arbeit, die in vitro Reaktion zwischen Antikörper und Antigen .

Beim ELISA handelt es sich um eine Kombination eines **Immunassays** (Antigen-Antikörper-Reaktion) mit einer **spezifischen Enzymreaktion**.

Einer der Reaktionspartner wird entweder radioaktiv markiert (Radioimmunassay, RIA), oder aber er wird mit einem Enzym konjugiert (z.B. Peroxidase), das anschließend mit einem zugesetzten Substrat eine Farbreaktion eingeht (Enzymimmunassay, EIA bzw. ELISA). Die Intensität dieser Farbreaktion ist proportional zur Menge des gebundenen Enzym-markierten Reaktionspartners und wird photometrisch bestimmt.

1971 wurden erstmals Enzyme als Marker in Immunoassays eingesetzt - Engvall und Perlmann beschrieben erstmalig den ELISA [Engvall und Perlmann, 1972].

Es gibt verschiedene ELISA-Varianten. Dabei wird zwischen kompetitivem und nicht-kompetitivem ELISA unterschieden. Bei einem kompetitiven Test konkurrieren z.B. markierte Antikörper und nicht-markierte Antikörper (Probe) um den Platz am Antigen. Je mehr nicht-markierte Antikörper in der Probe vorhanden ist, desto weniger markierte Antikörper bindet am Antigen, d.h. desto geringer ist die gemessene Intensität der anschließenden Farbreaktion. Die Auswahl hängt von der Art der Proben, der Verfügbarkeit der Reagenzien und der geforderten Präzision und Sensitivität ab [Stoll, 1997].

In dieser Arbeit wurde ein sogenannter Nicht-Kompetitiver Test mit Antigen-beschichteten Platten angewandt. Bei den **nicht-kompetitiven Festphasen-Tests** wird der Antikörper oder das Antigen in der Probe an die beschichtete feste Phase (Polysteroloberflächen oder anderer Protein-bindender Materialien) gebunden und danach mit einem zweiten markierten Antikörper oder Antigen nachgewiesen. Die Menge der gebundenen Radio- oder Enzymaktivität steigt dabei im Verhältnis zur Konzentration der Probe an [Kemeny, 1994].

In den vorliegenden Versuchen wurden Mikrotiterplatten aus Polystyrol mit Antigen beschichtet.

Eine Mikrotiterplatte ist eine Anordnung von 96 kleinen Reaktionsgefäßen (sogenannten Kavitäten - 250 µl) in einer Kunststoffplatte. Die gleichzeitige Untersuchung einer Serie von Proben bei geringem Materialverbrauch und automatischer Plattenauswertung (ELISA-Reader) ist somit möglich. Die Verwendung von speziellen Polystyrol-Mikrotiterplatten soll eine geringere Background-Absorption und eine größere Proteinbindungskapazität des Kunststoffs bewirken.

Nach der Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen Antigen wurden die den primären Antikörper enthaltenden Serum-Proben hinzugefügt. Die primären Antikörper binden an die Determinanten des immobilisierten Antigens. Nach Auswaschen der nicht gebundenen Anteile können die fixierten Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe eines zweiten – enzymmarkierten - Antikörpers (Detektorantikörper/ sogenannten „Konjugat“) – der spezifisch gegen den ersten gebundenen Antikörper gerichtet ist – nachgewiesen werden. Bei Antikörper-Subklassen-ELISA wird der Detektorantikörper nicht direkt markiert, sondern es wird ein zweiter enzymmarkierten Antiglobulin-Antikörper verwendet, der gegen den ersten Detektorantikörper gerichtet ist.

Nach einem weiteren Waschschrift wird das Substrat des Enzyms hinzugefügt und die Enzymaktivität als Extinktionsänderung pro Zeiteinheit photometrisch gemessen – entsprechend der Antikörpermenge in der Probe.

Ein Problem des Festphasen-ELISA stellt die unspezifische Bindung einzelner oder mehrerer Testkomponenten an nicht abgesättigte Stellen der Mikrotiterplatte dar.

Der dadurch verursachte Hintergrund kann aber in den meisten Fällen durch die Blockierung der Platte nach Adsorption des Beschichtungsreagens mit zusätzlichen, gut haftenden Proteinen (z.B. Rinderserumalbumin (BSA)) erreicht werden. Eine zusätzliche Verminderung der unspezifischen Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen läßt sich durch Zusatz von Detergenzien (z.B. Tween 20) zu den verwendeten Puffern erreichen.

### **2.3.2 Durchführung des ELISA**

Die Konzentrationen von Antigen, Serum, Konjugat, Detergenzien, die Verwendung von Mikrotiterplatten vom geeigneten Hersteller und die Inkubationszeiten und Inkubationsbedingungen wurden durch vielzählige **Test-Assays** zu Beginn der Versuchsreihe optimiert.

Unspezifische Bindungen der Plasmaproben oder des verwendeten Konjugates, die die Ergebnisse eventuell verfälscht hätten, konnten durch mitgeführte Kontrollen (siehe Abbildung **2.1**: C-Kavitäten unter **D**) ausgeschlossen werden.

Um Fehlmessungen auszuschließen und um die Reproduzierbarkeit des Testverfahrens zu überprüfen, wurde bei jedem Testvorgang, d.h. auf jeder Mikrotiterplatte, ein vierfach bestimmter positiver und negativer Standard in gleichbleibender Verdünnung mitgeführt (siehe Abbildung **2.1**: + / - Kavitäten unter **D**).

Alle Versuchsschritte fanden, wenn nicht anders aufgeführt, bei Raumtemperatur statt.

Als Trägersubstanz wurden Flachboden-Mikrotiterplatten (NUNC-Immuno<sup>TM</sup> Platten, MaxiSorp<sup>TM</sup> F96) mit jeweils 96 (8x12) Vertiefungen („Kavitäten“) gewählt.

#### **A: Beschichtung (coating) der Mikrotiterplatten mit Antigen**

Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen Antigen in einer Konzentration von 0,125 µg / ml – verdünnt in PBS-Pufferlösung – mit 50 µl / Kavität.

Bindung des Antigens an die Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C im Kühlschrank (sog. Kältebindung – Mikrotiterplatten mit Kunststoffolie abgedeckt).

Zur Bestimmung des Plattenleerwerts wurden vier Kavitäten (sog. C- Kavitäten, siehe Abbildung 2.1 unter **D**) nicht mit dem Antigen beschichtet. Damit war eine Kontrolle der Spezifität des jeweiligen ELISA gegeben.

Nach Übernacht-Inkubation erfolgte die Entfernung des nicht gebundenen Antigens durch Ausschütteln.

### **B: Blockierung zur Vermeidung unspezifischer Bindungen**

Sechsstündige Absättigung der freien Bindungsstellen aller Kavitäten mit PBS-2% BSA bei den IgG-gesamt-ELISA und mit PBS-4% BSA bei den IgG-Subklassen-ELISA (200 µl / Loch) im Wasserbad (25°C – Mikrotiterplatten mit Kunststoffolie abgedeckt). Dadurch Verhinderung unspezifischer Anlagerungen von Blutplasmae Proteinen an die noch frei gebliebenen (d.h. nicht vom Antigen beschichteten und damit nur aus freiliegendem Polystyrol bestehenden) Kavitätenwände der Mikrotiterplatte.

### **C: Waschen**

Entfernung des nicht gebundenen Blockierreagenzes durch viermaliges Waschen der Platten mit einer 12-strahligen Dünn Handi Wash 110 mit PBS- 0,5% Tween20- Waschpuffer (Vertiefungen leergesaugt – mit ca. 200 µl PBS-0,5% Tween20 aufgefüllt – mind. 1 Minute stehengelassen – Vertiefungen leergesaugt – das ganze weitere 3x wiederholt).

### D: Auftragen und Inkubation der Plasmaproben (primärer Antikörper)

Einpipettierung von jeweils 50 µl des in PBS-0,5% Tween20-1% BSA verdünnten Plasmas (siehe 2.1.3.) in die Mikrotiterplatten.

Das fest eingehaltene Pipettierschema umfasste auf jeder Mikrotiterplatte die Doppelbestimmung jeder Patientenprobe in zwei vertikal aufeinanderfolgenden Kavitäten und jeweils die Vierfachbestimmung eines positiven und negativen Kontrollpools sowie des Leerwerts (Blank).

Zur Bestimmung der Leerwerte (Blanks) wurde in die vier Kavitäten nur PBS-0,5% Tween20 pipettiert – d.h. bis zum Ende des ELISA-Tests erfolgte in diese Leerwert-Kavitäten die Zugabe aller Substanzen mit Ausnahme des primären Antikörpers.

Auf einer Platte befanden sich dabei immer sowohl S- als auch M-Proben.

ELISA-Platten- Aufteilung:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	s1	s5	s9	s13	s17	s21	s25	s29	s33	s37
B	+	+	s1	s5	s9	s13	s17	s21	s25	s29	s33	s37
C	-	-	s2	s6	s10	s14	s18	s22	s26	s30	s34	s38
D	-	-	s2	s6	s10	s14	s18	s22	s26	s30	s34	s38
E	B	B	s3	s7	s11	s15	s19	s23	s27	s31	s35	s39
F	B	B	s3	s7	s11	s15	s19	s23	s27	s31	s35	s39
G	C	C	s4	s8	s12	s16	s20	s24	s28	s32	s36	s40
H	C	C	s4	s8	s12	s16	s20	s24	s28	s32	s36	s40

+ = positiver Pool, - = negativer Pool, B = blank, C= Spezifitätskontrolle, s1 – s40 = Plasmaproben (sample)

**Abbildung 2.1: ELISA-Platten – Belegung der Kavitäten**

Die Bildung von Immunkomplexen mit dem fixierten Antigen erfolgte durch Inkubation der Mikrotiterplatten mit den Blutplasmaproben über Nacht bei 4°C im Kühlschrank (Mikrotiterplatten mit Kunststoffolie zugedeckt).

Erneuter Waschvorgang (siehe C) vor dem nächsten Arbeitsschritt.

### **E: Auftragen und Inkubation der monoklonalen Antikörper zur Bestimmung der IgG-Subklassen**

**(nur bei den IgG-Subklassen-Assays)**

1 : 2000 Verdünnung der monoklonale Maus-Antikörper gegen IgG1 und IgG3 (Caltag Laboratories, Kanada) in PBS und Zugabe von jeweils 50 µl / Kavität.

Inkubation der abgedeckten Platten mit den monoklonalen Antikörpern über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Die Bestimmung der beiden IgG-Subklassen (IgG1 + IgG3)-Antikörperantworten für die jeweilige Patientenprobe erfolgte immer gleichzeitig innerhalb eines ELISA-Ansatzes.

Erneuter Waschvorgang (siehe C) vor dem nächsten Arbeitsschritt.

### **F: Auftragen und Inkubation des Peroxidase-Konjugats (sekundärer Antikörper)**

Verdünnung der Peroxidase-konjugierten Antikörper in PBS.

Beschichtung aller Kavitäten der Mikrotiterplatte mit je 50 µl des verdünnten sekundären Antikörpers, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation der Mikrotiterplatten bei 25°C im Wasserbad.

Es wurden folgende Konjugate (Sigma Chemical Company) in folgenden Verdünnungen verwendet:

IgG-gesamt-ELISA :            Horseradish Peroxidase Conjugated Goat Anti-Human  
  IgG (Fc specific)  
  Verdünnung: 1 : 50 000

IgG-Subklassen-ELISA :       Horseradish Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG  
  (Fc specific)  
  Verdünnung: 1 : 5 000

Erneuter Waschvorgang (siehe C) vor dem nächsten Arbeitsschritt.

## G: Enzymatische Farbreaktion

Verwendung des TMB Microwell Peroxidase Substrat System (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, USA) für die enzymatische Farbreaktion.

1 : 1 Mischung der beiden Komponenten TMB Substrat und Solution B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Einpipettierung von 100 µl / Kavität in die ELISA-Platten.

Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Während dieser Zeit erfolgte im Rahmen der enzymatischen Reaktion die Katalyse folgender Reaktion:



Dabei stand als H<sub>2</sub>-Donor der Peroxidase-Reaktion 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB Substrat) zur Verfügung.

Das farblose Tetramethylbenzidin (**I**) wird dabei über die Enzymreaktion in das blaugefärbte Tetramethylbenzidin-Radikalkation (**II**) umgesetzt.

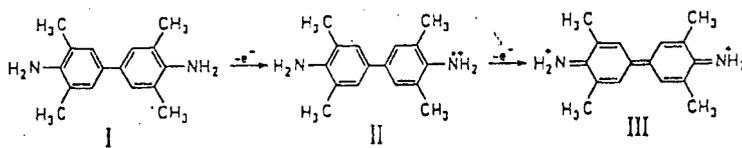


Abbildung 2.2: Peroxidase-Reaktion (nach Schmid et al., 1993)

Durch anschließende Ansäuerung mit 1-molarer Phosphorsäure -100 µl / Loch - erfolgte das Abstoppen der Farbreaktion des Enzym-Substrat-Gemisches. Es bildet sich das gelbgefärbte 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-Diphenochinon-4,4'-Diimmoniumion (**III**).

Die Stärke der Farbtintensität der Gelbfärbung (quantitative Farbkomblexbildung) ist dabei proportional zur Konzentration des detektierten Antikörpers.

## **H: Messung der Extinktionen im ELISA-Reader und Berechnung der Arbitrary Units**

Photometrische Messung der Farbtintensität unmittelbar nach Zugabe der Phosphorsäure und nach dreisekundiger Schüttelung der ELISA-Mikrotiter-Platten mit dem ASYS Hitech DigiScan- ELISA-Reader unter Verwendung eines Messfilters bei 450 nm und eines Referenzfilters von 550 nm.

Beschreibung der Extinktionen durch den direkt am ASYS Hitech DigiScan ELISA-Reader angeschlossenen Computer mit einem Software-Programm MicroWIN von Mikrotek (1995) in Optical Density-Einheiten (OD).

Angabe der OD in Prozent eines positiven und negativen Referenzserums durch anschließende Umrechnung der gemessenen OD-Werte in arbiträre Einheiten (Arbitrary Units (AU)) unter Verwendung folgender bei [Rasheed et al., 1995] angegebener Formel:

$$AU = \frac{(\ln OD \text{ sample}) - (\ln OD \text{ negative pool})}{(\ln OD \text{ positive pool}) - (\ln OD \text{ negative pool})} * 100$$

Sample steht für das zu untersuchende Plasma.

Es wurde jeweils nur mit den Mittelwerten der Doppelbestimmungen gerechnet.

Der **positive Pool** bestand aus einer Mischung von zehn Plasmaproben von *Plasmodium falciparum*-Malaria-semiimmunem Individuen aus Gabun mit hohen spezifischen IgG-Antikörperantworten.

Der **negative Pool** wurde aus Plasmaproben von deutschen Individuen gemischt, die noch niemals *Plasmodium falciparum* exponiert waren. Diese Plasmaproben kamen aus der Blutbank des Klinikums der Universität Tübingen.

Beide Pools fanden sowohl für die IgG-gesamt-ELISA als auch für die IgG-Subklassen-ELISA Verwendung.

Vor der Berechnung der AU wurde der OD-Mittelwert der Blanks von den Werten der übrigen Proben der jeweiligen ELISA-Mikrotiter-Platte abgezogen. Damit erfolgte die Eliminierung der Hintergrundadsorption.

Um die Adsorption des GST von der des MSP-1<sub>19</sub> zu trennen, wurden die OD-Werte der jeweiligen GST-Kontroll-ELISA-Mikrotiter-Platte von den OD-Werten der GST-MSP-1<sub>19</sub>-Mikrotiter-Platte subtrahiert.

Die Bewertung der gemessenen Ergebnisse erfolgte durch den sog. „**Cutoff**“-Wert, d.h. zur Beurteilung „positiver“ Plasmaproben wurde ein negativ/positiv Grenzwert festgelegt („cut-off-value“/„threshold“).

Dieser **Grenzwert** wurde wie folgt festgelegt:

Mittelwert aus der Summe der AU der Kontrollseren + 2 Standardabweichungen  
(SD = standard deviation) der Kontrollseren

Diese Kontrollseren bildeten jeweils mindestens 20 Plasmaproben deutscher Individuen, die noch nie *Plasmodium falciparum* exponiert waren. Die Plasmaproben kamen aus der Blutbank des Klinikums der Universität Tübingen (siehe oben).

AU-Werte der verschiedenen Plasmaproben der 1/95C-Studienkinder, die oberhalb dieser Schwellenwerte lagen, wurden als „positiv“, diejenigen die unterhalb dieser Schwellenwerte lagen als „0“ / „negativ“ bezeichnet.

Es ergaben sich für MSP-1<sub>19</sub> die im Folgenden aufgeführten **Schwellenwerte/Thresholds** in Arbitrary Units:

**IgGgesamt: 24**  
**IgG1 : 18**  
**IgG3 : 12**

Durch die Berechnung von „Arbitrary Units“ (AU) war die Vergleichbarkeit der Testergebnisse innerhalb der Versuchsreihe bei Verwendung des gleichen positiven und negativen Standards (positiver und negativer Pool) sowie derselben Cutoff-Werte gegeben.

Die berechneten AU wurden in ein Microsoft<sup>®</sup> Excel-Arbeitsblatt eingegeben, und die Werte, die unterhalb der zuvor berechneten Schwellenwerte lagen, als 0 bezeichnet. Danach erfolgte eine Kopie der Excel-Tabellen in das Statistik-Programm StatView<sup>®</sup>, um die statistische Auswertung der Daten zu ermöglichen.

Es wurden nur diejenigen Plasmaproben in den IgG-Subklassen-ELISA untersucht, die im IgG-gesamt-ELISA „positiv“ waren.

### **2.3.3 Verlaufskurzbeschreibung der Assays**

#### **2.3.3.1 IgG-gesamt-ELISA**

- Beschichtung/ Coating (über Nacht)
- Blockieren (6 Stunden)
- *Waschen*
- Auftragen der Proben (Inkubation über Nacht)
- *Waschen*
- Auftragen des Konjugats (Inkubation für 2 Stunden)
- *Waschen*
- Farbreaktion

#### **2.3.3.2 IgG-Subklassen-ELISA**

- Beschichtung/ Coating (über Nacht)
- Blockieren (6 Stunden)
- *Waschen*
- Auftragen der Proben (Inkubation über Nacht)
- *Waschen*
- Auftragen der monoklonalen Antikörper (Inkubation über Nacht)
- *Waschen*
- Auftragen des Konjugats (Inkubation für 2 Stunden)
- *Waschen*
- Farbreaktion

## **2.4 Arbeitsmaterialien**

### **2.4.1 Arbeitsgeräte**

#### **2.4.1.1 Steril-Arbeitsbank**

Die steril durchzuführenden Arbeitsschritte wurden in einer Steril-Arbeitsbank „Herasafe“ der Firma Heraeus Instruments (Deutschland) durchgeführt.

#### **2.4.1.2 ELISA-Reader**

Die Testauswertung der NUNC-Immuno<sup>TM</sup> Mikrotiterplatten wurde mit einem ASYS Hitech DigiScan Photometer der Firma ASYS Hitech GmbH (Wien, Österreich) unter der Verwendung der Software MikroWin 2.39 (1995) der Firma Mikrotek (Overath, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einem Referenzfilter von 550 nm vorgenommen.

.

#### **2.4.1.3 Dunn Handi Wash**

Das Absaugen der Überstände in den Löchern der 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten geschah mit einer 12-strahligen Dunn Handi Wash 110- Vakuumpumpe der Firma Dunn Labortechnik GmbH (Asbach, Deutschland).

#### **2.4.1.4 Mischer**

Die Aufsuspendierung von Reaktionsproben erfolgte mittels eines Vortex Mischers „Bender&Hobein“, IKA-Works (USA).

Für die Durchmischung von Lösungen wurde ein „Variomag“ Elektronikrührer „Mono“ (H+P Labortechnik GmbH, Darmstadt) mit variabler Motorstärke benutzt.

#### **2.4.1.5 pH-Kontrollen/-Einstellungen**

Die pH-Kontrollen wurde mit Universalindikator pH 0-14 Teststreifen der Firma Merck (Darmstadt) durchgeführt. Notwendige pH-Einstellungen erfolgten mit einem pH-Meter „Jenway 3010“ der Firma Roth Chemikalien-Laborbedarf (Karlsruhe), nach vorangehender Eichung des Gerätes mit gebrauchsfertigen Eichpufferlösungen.

#### **2.4.1.6 Waagen**

Das Abwiegen der Reagenzien wurde auf einer Präzisionswaage Mettler AE 260/9 der Firma Mettler-Toledo GmbH (Schweiz) und einer Mettler PM 4000/9-Wage vorgenommen.

#### **2.4.1.7 Wasserbad**

Die Inkubationen bei 25°C wurden in einem Wasserbadgerät GFL 1083 der Firma Bachofer (Reutlingen) durchgeführt.

### **2.4.2 Reagenzgefäße und Dosierhilfen**

#### **2.4.2.1 Spezielle Reagenzgefäße**

- 96-Loch-Flachboden- NUNC-Immuno<sup>TM</sup> Platten, MaxiSorp<sup>TM</sup> F96 (NUNC GmbH, Wiesbaden)
- 50 ml Reagent Reservoir (Costar, USA)
- Plate Sealers (Costar, USA)
- Millex-GS Sterilfilter 0,22 µm Filter Unit (Millipore S.A., Frankreich)
- 1,2 ml offene Plastik-Röhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen)
- Plastikständer (8x12Löcher) für 1,2 ml Röhrchen
- 2 ml Cryovial-Röhrchen mit Schraubverschluß (Simport, Kanada)
- filtertip-Boxen (8x12 Löcher – Greiner Labortechnik, Frickenhausen)

- 15 ml-PP-Röhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen)
- 50 ml-Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson Labware, USA)
- Bechergläser (250, 500 ml – Duran, Mainz)
- Erlenmeyerkolben (50, 100, 2 000 ml – Duran, Mainz)
- Glaszylinder (250  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 2000  $\mu$ l – Duran, Mainz)

#### **2.4.2.2 Dosierhilfen**

- Präzisionspipetten (1-10  $\mu$ l, 5-50  $\mu$ l, 50-200  $\mu$ l, 200-1000  $\mu$ l) der Firma Socorex (Schweiz) mit Greiner -Einmalpipettenspitzen (kristall: 0,5-10  $\mu$ l , gelb: 1-200 $\mu$ l, blau: 101-1000  $\mu$ l)
- Multipipetten (5–50  $\mu$ l, 50-200  $\mu$ l) der Firma Socorex (Schweiz) mit Greiner-Multipipettenspitzen (gelb: 1-200 $\mu$ l, blau: 101-1000  $\mu$ l)
- Biohit Digital Multichannel Pipette (50 – 1200  $\mu$ l) der Firma Proline Electronic mit Einmalpipettenspitzen (Titertek, Finnland)
- Pipet-Aid der Firma Drummond Scientific (USA) mit Einmalpipetten TD-EX 20°C Serological (5, 10, 25 ml – Greiner Labortechnik, Frickenhausen)

#### **2.4.3 Chemikalien**

Von Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg, wurde bezogen:

- SERVA Albumin bovine Fraction V, pH 7.0,

Von CALTAG Laboratories (Burlingame, Kanada) wurde bezogen:

- Mouse Monoclonal Antibody To Human IgG-1 Fc
- Mouse Monoclonal Antibody To Human IgG-3 Hinge

Von Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, USA wurde bezogen:

- TMB Peroxidase Substrat und Solution B

Von E. Merck, Darmstadt, wurden bezogen:

- Natriumchlorid (NaCl) zur Analyse
- Kaliumchlorid (KCl) zur Analyse
- di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- Kaliumdihydrogenphosphat für die Molekularbiologie ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Ortho-Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) - 85%

Von Sigma<sup>®</sup> Chemical Company, USA, wurden bezogen:

- Horseradish Peroxidase Conjugated Goat Anti-Human IgG (Fc specific)
- Horseradish Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (Fc specific)
- Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween20), Sigma<sup>®</sup>

### 2.4.3.1 Verwendete Puffer und Reagenzien

#### PBS (Phosphate Buffered Saline)

		<u>für 1 l:</u>
NaCl	137 mM	8,0 g
KCl	3 mM	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8 mM	1,44 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 mM	0,24 g
pH 7,4		mit Aqua dest auffüllen

Tween 20

Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween20), Sigma<sup>®</sup>

BSA

BSA (Albumin bovine Fraction V, pH 7.0)

Phosphorsäure

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>      1 M

TMB Peroxidase Substrat

Kirkegaard & Perry<sup>®</sup>

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin      400 mg / l, in einer organischen Base

Lösung B

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>      0,02% in Zitrat-Puffer

## 2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde auf einem PC mit dem Statistik-Programm StatView<sup>®</sup> vorgenommen.

Weitere innerhalb der 1/95C Studie gewonnenen Daten flossen in die Auswertung mit ein, um auf eventuelle Korrelationen mit den gemessenen AU untersucht zu werden (siehe 2.6).

Da nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden konnte, wurden **nicht-parametrische** Tests verwendet:

### Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test

Test für den Vergleich gepaarter Zweiergruppen, bei Untersuchung von zwei fortlaufende Variablen.

### Spearman-Rang-Korrelation

Analyse bei gepaarten Zweiergruppen zur Untersuchung von Korrelationen zwischen fortlaufenden Variablen.

### U-Test nach Mann und Whitney

Test zur Untersuchung von nicht-gepaarten Zweiergruppen bei Verwendung von einer stetigen und einer nominalen Variable mit zwei Stufen.

### Kruskal-Wallis-Test

Beinhaltete die nominale Variable mehr als zwei Stufen, so fand statt dem Mann-Whitney-U-Test dieser Test Anwendung.

## Kontingenztafeln

Fisher's „Exakter“ Test wurde zum Proportionsvergleich zwischen der M- und S-Gruppe verwendet.

## Beschreibende Statistik

Analysen ergaben Mediane, Mittelwerte, Quartilabstände und andere statistische Angaben zu den gewonnenen AU-Werten.

Als Signifikanzniveau wurde ein **p-Wert < 0.05** gesetzt (von zwei Seiten betrachtet).

## **2.6 Vergleichende Parameter**

Es wurde nach Zusammenhängen und Korrelationen der gewonnenen AU-Werte mit anderen innerhalb der 1/95C Studie erhobenen Daten gesucht.

Dazu wurden folgende weitere Daten verwendet und mit den in dieser Arbeit gemessenen Antikörperantworten verglichen:

Alter/ Altersklassen

AB0-Blutgruppe

Geschlecht

MBL-Promotor-Mutation

NOS-2-Mutation

Parasitämie

Reinfektionsrate (Incidence density rate)

Sichelzellgen-Trägerschaft (AS)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 IgG-Antikörperantwort gegen MSP-1<sub>19</sub>

##### 3.1.1 Profile

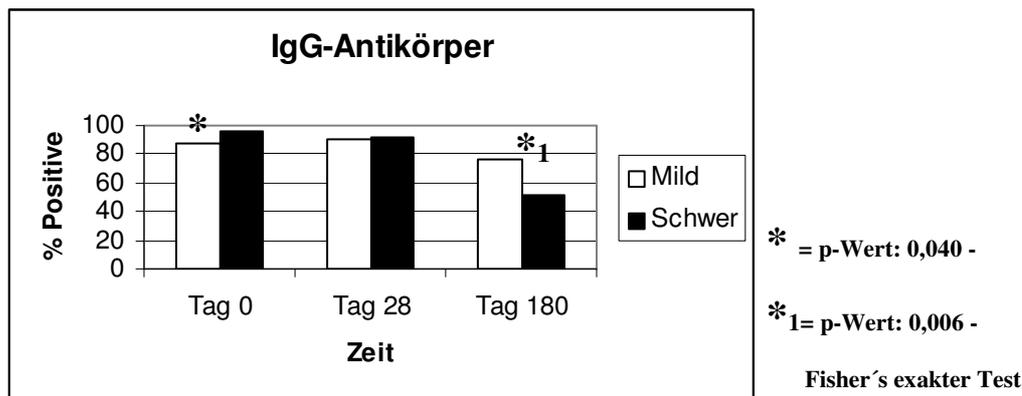


Abbildung 3-1: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren IgG-Antikörpern gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach schwerer und milder Malaria tropica

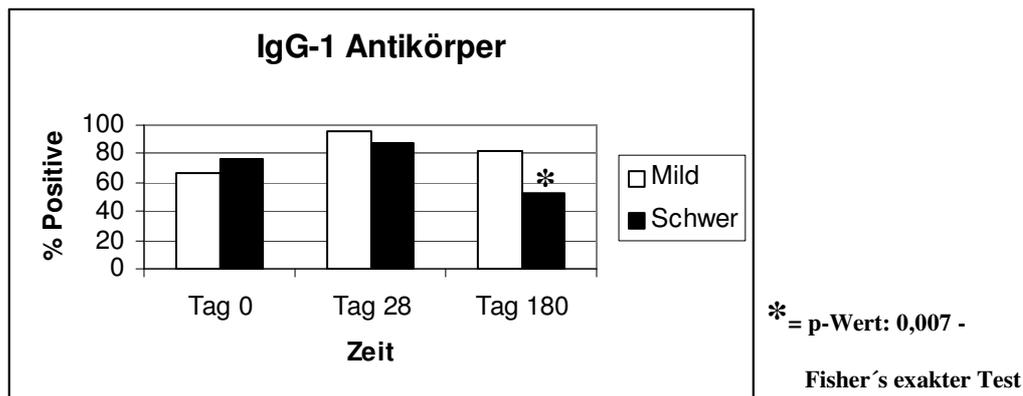
Bei Untersuchung der Studienkinder auf **IgG**-Positive gegen **MSP-1<sub>19</sub>** ist an den Untersuchungstagen Tag 0 und Tag 28 eine Responderrate von >80% festzustellen.

Die Anzahl der IgG-Positiven gegen MSP-1<sub>19</sub> nimmt sowohl innerhalb der M-Gruppe wie auch innerhalb der S-Gruppe von Tag 0 auf Tag 180 ab. Während an Tag 0, d.h. in der akuten Phase, die S-Gruppe einen gerade statistisch *signifikant* höheren Anteil an IgG-Positiven (96%) gegenüber der M-Gruppe (87%) aufweist (p-Wert: 0,040 – nach Fisher's exaktem Test), verhalten sich die Gruppen an Tag 180, d.h. im gesunden Zustand, genau umgekehrt: die Anzahl der IgG-Positiven-Kinder ist zu diesem Zeitpunkt in der M-Gruppe *signifikant* höher (76 %) als in der S-Gruppe (52%) (p-Wert: 0,006 – nach Fisher's exaktem Test). Die Anzahl der IgG-Positiven gegen MSP-1<sub>19</sub> zwischen der M- und S-Gruppe an Tag 28 ist dagegen fast gleich.

Insgesamt ist für die Anzahl der IgG-Positiven-S-Kinder eine stetige Abnahme über den gesamten Untersuchungszeitraum aufzuzeigen (96% - 92% - 52%), die besonders deutlich zwischen Tag 28 und Tag 180 wird. Dabei ist der Unterschied zwischen Tag 0

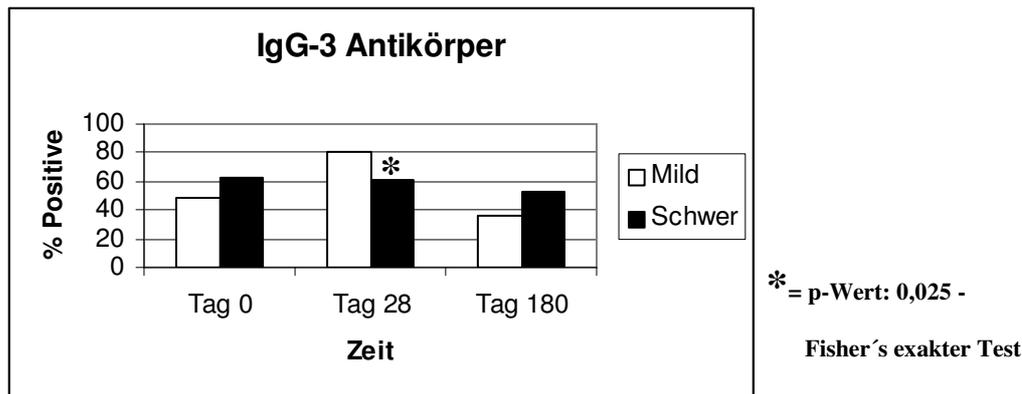
und Tag 180 und zwischen Tag 28 und Tag 180 (beidesmal beträgt der p-Wert:  $< 0,001$  – nach Fisher's exaktem Test) statistisch *signifikant*.

Die Anzahl der IgG-Positiven-M-Kinder steigt leicht von Tag 0 auf Tag 28 (87% - 90%), um von Tag 28 auf Tag 180 (90% - 76%) ebenfalls mit einem p-Wert von 0,025 (nach Fisher's exaktem Test) *signifikant* abzufallen.



**Abbildung 3-2: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren IgG-1-Antikörpern gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder und schwerer Malaria tropica**

Bei der **IgG-1**-Antikörperantwort auf das **MSP-1<sub>19</sub>** ist keine stetige Abnahme der Anzahl der Responder bei den Kinder der M- und S-Gruppe zu verzeichnen. Vielmehr steigt hier in beiden Gruppen die Anzahl der Responder von Tag 0 auf Tag 28, um von Tag 28 auf Tag 180 wieder abzufallen. Die M-Gruppe verzeichnet an Tag 0 nur eine Responder-Anzahl von 66%. Diese steigt *signifikant* (p-Wert:  $< 0,001$ ) auf 96% an Tag 28 an, um an Tag 180 *signifikant* (p-Wert: 0,014) auf 82% abzufallen. Innerhalb der S-Gruppe ist der gleiche Verlauf (76% - 88% - 53%) zu verzeichnen. Auch hier sind die Unterschiede in der Anzahl der Responder zwischen Tag 0 und Tag 28 (p-Wert: 0,07) und zwischen Tag 28 und Tag 180 (p-Wert: 0,0002) *signifikant*. Bei der IgG-1-Antikörperantwort an Tag 0 sind die Responder wie bei der IgG-Antikörperantwort in der S-Gruppe höher als in der M-Gruppe – allerdings ohne *Signifikanz*. An Tag 180 ist auch hier wieder das umgekehrte Verhältnis zu beobachten: die Anzahl der Responder in der S-Gruppe ist *signifikant* niedriger (p-Wert: 0,007) als in der M-Gruppe.



**Abbildung 3-3: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren IgG-3-Antikörpern gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder und schwerer Malaria tropica**

Die **IgG-3**-Antikörperantwort gegen das **MSP-1<sub>19</sub>** zeigt in der M-Gruppe einen ähnlichen Verlauf wie die IgG-1-Antikörperantwort: beginnend mit einem geringen prozentualen Responder-Anteil von 48% an Tag 0, ist von Tag 0 auf Tag 28 ein *signifikanter* Anstieg (p-Wert: < 0,001) auf 80% zu verzeichnen sowie ein folgender *signifikanter* Abfall (p-Wert: < 0,001) von Tag 28 auf Tag 180 auf einen Responder-Anteil von 36%. Dieser sehr starke Abfall in der Responderrate um 44% kann allerdings in diesem Ausmaß nicht bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort beobachtet werden. Innerhalb der S-Gruppe liegt der prozentuale Anteile der Responder an Tag 0 bei 63%, um an Tag 28 auf 61% abzufallen, bevor ein weiterer Abfall an Tag 180 auf 53% auszumachen ist.

An Tag 28 besteht ein *signifikanter* Unterschied zwischen dem Responderanteil in der M- (80%) und S-Gruppe (61%) - p-Wert: 0,025 – nach Fisher´s exaktem Test.

Insgesamt ist festzustellen, dass sowohl bei der IgG-Gesamt-Antikörperantwort, wie auch bei den IgG-1- und IgG-3-Subklassen-Antikörperantworten ein statistisch *signifikanter* Abfall der Responderrate von Tag 28 auf Tag 180 zu verzeichnen ist. Eine Ausnahme bildet nur die IgG-3-Antikörperantwort in der S-Gruppe, die diesen Trend nur ohne *Signifikanz* aufweisen kann. Während bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort dieser Abfall innerhalb der S-Gruppe immer stärker ausgeprägt ist als in der M-Gruppe, ist dies bei der IgG-3-Antikörperantwort umgekehrt: hier ist der Abfall der Responderrate zwischen Tag 28 und Tag 180 innerhalb der M-Gruppe wesentlich stärker ausgeprägt als in der S-Gruppe.

Weiterhin ist festzustellen, dass bei der IgG-Gesamt-Antikörperantwort die Anzahl der IgG-Positiven zwischen Tag 0 und Tag 28 ungefähr gleich bleibt, während bei den Subklassen-Antworten eine *signifikante* Zunahme des Anteils der Responder innerhalb der M-Gruppe von Tag 0 auf Tag 28 festzustellen ist.

An Tag 180 ist die Responderrate bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort in der M-Gruppe *signifikant* höher als in der S-Gruppe.

### 3.1.2 AU-Werte

An den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten kann zwischen den AU-Werten der Kindern der S- und M-Gruppe, die eine IgG-Gesamt- und eine IgG-Subklassen-Antikörperantwort gegen MSP-1<sub>19</sub> aufweisen - sogenannte „**Responder**“, nur einmal ein *signifikanter* Unterschied aufgezeigt werden - bei Anwendung des Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Tests. Bei Anwendung des U-Tests nach Mann und Whitney ist es dagegen möglich dreimal einen *signifikanten* Unterschied zwischen den AU-Werten der M- und S-Gruppe nachzuweisen – siehe Tabellen 3.1-3 auf Seite 62. Insgesamt ist zu beobachten, dass die AU-Werte der IgG-, IgG-1- und IgG-3-Antikörperantwort in der M-Gruppe - bei nur einer Ausnahme an Tag 28 bei der IgG-1-Antikörperantwort - alle höher als diejenigen der S-Gruppe liegen.

Zudem kann gezeigt werden, dass die AU-Werte innerhalb der M- und S-Gruppe von Tag 0 bis Tag 180 bei allen Antikörperantworten abnehmen. In der M- und S-Gruppe der IgG-Antikörperantwort und in den M-Gruppen der Subklassen-Antikörperantworten IgG-1 und IgG-3 geschieht diese Abnahme kontinuierlich.

**Tabelle 3.1: AU-Werte der IgG-Produktion der RESPONDER gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder (M) und schwerer (S) Malaria tropica**

Responder	M	S	p-Wert	
			W	M
Tag 0	85 (59)	81 (51)	-	-
Tag 28	82 (54)	71 (64)	-	-
Tag 180	50 (33)	44 (23)	-	-

Die Werte werden als Median (Quartilabstand) angegeben. Bei den Vergleichen zwischen M und S wird der Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test (*W*) und der U-Test nach Mann und Whitney (*M*) angewandt;  
 - = keine statistische *Signifikanz*

**Tabelle 3.2: AU-Werte der IgG-1-Produktion der RESPONDER gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder (M) und schwerer (S) Malaria tropica**

Responder	M	S	p-Wert	
			W	M
Tag 0	95 (63)	78 (74)	0,019	0,028
Tag 28	75 (58)	88 (66)	-	-
Tag 180	57 (34)	33 (33)	-	0,002

Die Werte werden als Median (Quartilabstand) angegeben. Bei den Vergleichen zwischen M und S wird der Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test (*W*) und der U-Test nach Mann und Whitney (*M*) angewandt;  
 - = keine statistische *Signifikanz*

**Tabelle 3.3: AU-Werte der IgG-3-Produktion der RESPONDER gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder (M) und schwerer (S) Malaria tropica**

Responder	M	S	p-Wert	
			W	M
Tag 0	42 (24)	31 (23)	-	-
Tag 28	35 (27)	27 (18)	-	0,004
Tag 180	33 (11)	30 (7)	-	-

Die Werte werden als Median (Quartilabstand) angegeben. Bei den Vergleichen zwischen M und S wird der Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test (*W*) und der U-Test nach Mann und Whitney (*M*) angewandt;  
 - = keine statistische *Signifikanz*

### 3.1.3 IgG-1 : IgG-3 Ratio

Durch Division der AU-Werte der IgG-1-Antikörperantwort durch die AU-Werte der IgG-3-Antikörperantwort wurde der IgG-1:IgG-3-Ratio-Wert erhalten. Dieser Wert drückt das Verhältniss der IgG-1- zu den IgG-3-Antikörpern in der jeweiligen Untersuchungsgruppe an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten aus – siehe Tabelle 3.4.

**Tabelle 3.4: IgG-1:IgG-3-Ratio gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder (M) und schwerer (S) *Malaria tropica***

	M	S	p (M – S)
Tag 0	2,02 ( 7,00)	2,41 ( 5,25)	-
<b>p</b> (Tag 0 – Tag 28)	-	0,0169 *	
Tag 28	2,02 ( 4,40)	3,81 (32,71)	0,0416*
<b>p</b> (Tag 28 – Tag 180)	-	0,0001 *	
Tag 180	11,59 (44,40)	1,00 ( 1,05)	0,0002*
<b>p</b> (Tag 0 – Tag 180)	-	0,0027 *	

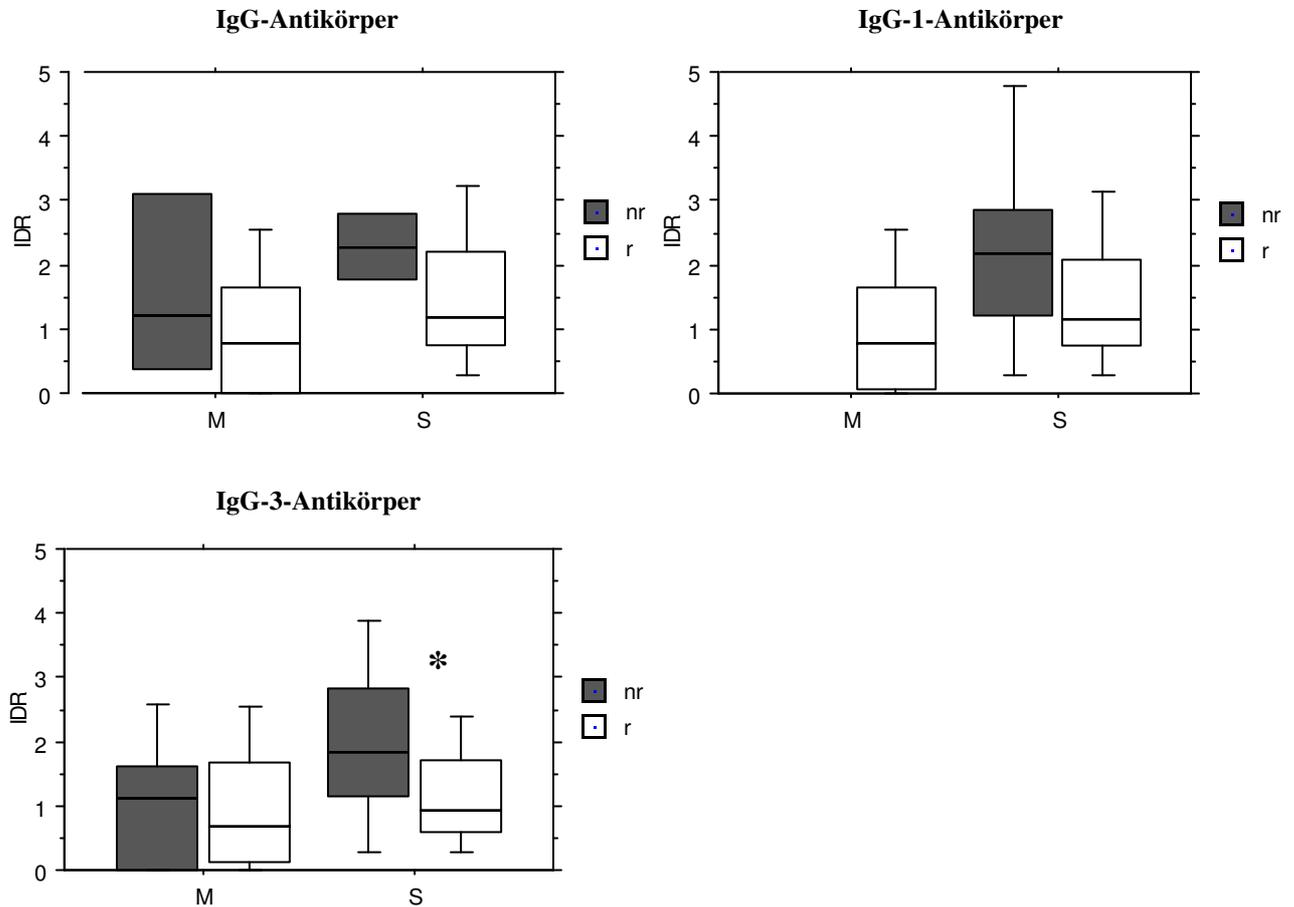
Die Werte werden als Median (Quartilabstand) angegeben. Bei den Vergleichen zwischen M und S wird der U-Test nach Mann und Whitney angewandt; p = p-Wert; \*= statistisch *signifikant*

Bei einem Vergleich der IgG-1:IgG-3-Ratio-Werte an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten innerhalb der M- und S-Gruppe wird ersichtlich, dass in der M-Gruppe von Tag 28 auf Tag 180 eine deutliche Erhöhung der IgG-1:IgG-3-Ratio zu verzeichnen ist, d.h. also eine Verschiebung des IgG-1:IgG-3 Gleichgewichts zur Seite der IgG-1-Antikörper stattfindet. In der S-Gruppe ist dies nicht zu verzeichnen. Hier ist eine Erhöhung des Ratio-Wertes von Tag 0 auf Tag 28 zu sehen. Von Tag 28 auf Tag 180 folgt eine Abnahme auf einen Ratio-Wert von 1. Während die Unterschiede zwischen den Werten in der M-Gruppe keine *Signifikanz* aufweisen, sind in der S-Gruppe alle Unterschiede in der IgG-1:IgG-3-Ratio zwischen den Untersuchungszeitpunkten *signifikant* (U-Test nach Mann und Whitney).

Bei einem Vergleich der IgG-1:IgG-3-Ratio zwischen der M- und S-Gruppe an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ist zu erkennen, dass an Tag 0 und Tag 28 die Ratio-Werte in der S-Gruppe jeweils höher sind als in der M-Gruppe, d.h. hier im Verhältnis zur IgG-3-Antikörperkonzentration eine durchschnittlich höhere IgG-1-Antikörperkonzentration zu verzeichnen ist. Diese Beobachtung ist an Tag 0 als statistischer Trend zu bezeichnen, an Tag 28 ist diese Beobachtung mit einem p-Wert von 0,0416 (U-Test nach Mann und Whitney) statistisch *signifikant*. An Tag 180 kehrt sich dieses Verhältnis um: hier ist in der M-Gruppe gegenüber der S-Gruppe ein *signifikant* höherer IgG1:IgG3-Ratio-Wert zu verzeichnen (p-Wert nach U-Test nach Mann und Whitney: 0,0002).

Insgesamt ist statistisch ein Trend in der Zunahme des IgG-1:IgG-3-Ratio-Wertes in der M-Gruppe der Kinder vom rekonvaleszenten zum gesunden Zustand zu erkennen, während in der S-Gruppe der Kinder eine statistisch *signifikante* Abnahme von Tag 28 auf Tag 180 zu verzeichnen ist – d.h. während in der Gruppe der nur mild an Malaria tropica erkrankten Kinder vom rekonvaleszenten Zustand zum gesunden Zustand eine Verschiebung des IgG-1:IgG-3-Gleichgewichts zu Gunsten der IgG-1-Antikörper stattfindet, ist in der Gruppe der schwer an Malaria tropica erkrankten Kinder eine Verschiebung des Antikörpergleichgewichts zu Gunsten der IgG-3-Antikörper zu erkennen.

### 3.2 MSP-1<sub>19</sub>-spezifische IgG-Antikörperantwort und Incidence density rate - IDR

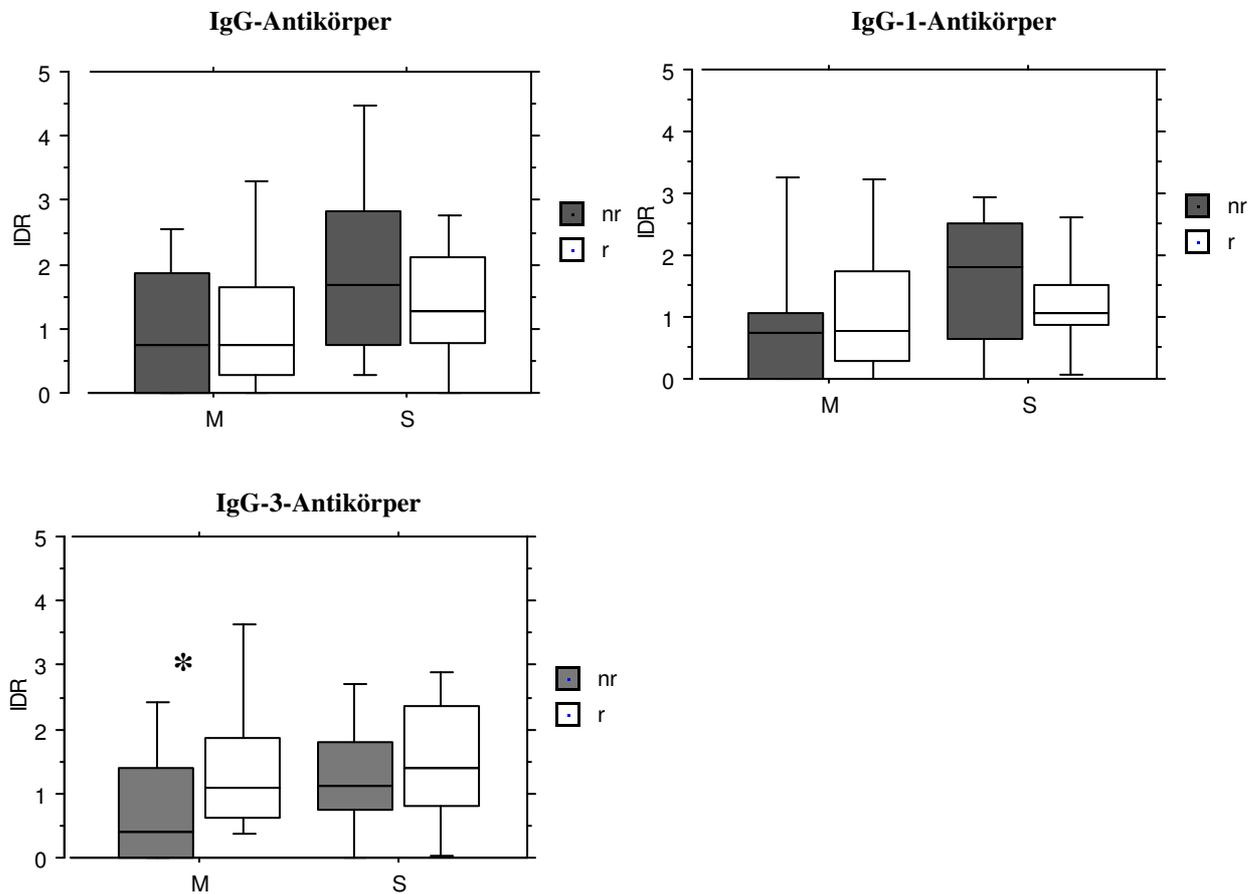


nr: „non-responder“ = keine Antikörper-Antwort; r: „responder“ = Antikörper-Antwort; M= milde Malaria tropica; S= schwere Malaria tropica; \* = statistisch *signifikanter* Unterschied (U-test nach Mann und Whitney)  $p=0,0154$ ; Median = Balken in Box; 25. und 75. Perzentil = Box-Ränder; 10. und 90. Perzentil = Balken ausserhalb Box

#### Abbildung 3.4: IgG, IgG-1-, IgG-3-Antikörperantwort auf MSP-1<sub>19</sub> und IDR (Reinfektionsrate) an Untersuchungs-Tag 28

Diejenigen Kinder, die eine **IgG-, IgG-1-, IgG-3-Antikörperantwort** gegen das **MSP<sub>19</sub>** entwickeln – Responder, weisen an **Untersuchungs-Tag 28** niedrigere Reinfektionsraten (Incidence density rate – IDR) als die Non-Respondern, d.h. diejenigen Kindern, die keine IgG-, IgG-1-, IgG-3-Antikörperantwort gegen das MSP<sub>19</sub> entwickeln, auf – **Abbildung 3.4**. Diese Beobachtung gilt sowohl innerhalb der **M-Gruppe**, wie auch innerhalb der **S-Gruppe**. Eine statistische *Signifikanz* kann

allerdings nur für die IgG-3-Antikörperantwort innerhalb der S-Gruppe zwischen den Non-Respondern und Respondern aufgezeigt werden – nach U-Test von Mann und Whitney: p-Wert: 0,015.



nr: „non-responder“ = keine Antikörper-Antwort; r: „responder“ = Antikörper-Antwort; M= milde Malaria tropica; S= schwere Malaria tropica; \* = statistisch *signifikanter* Unterschied (U-test nach Mann und Whitney)  $p=0,0369$ ; Median = Balken in Box; 25. und 75. Perzentil = Box-Ränder; 10. und 90. Perzentil = Balken ausserhalb Box

**Abbildung 3.5: IgG, IgG-1-, IgG-3-Antikörperantwort auf MSP-1<sub>19</sub> und IDR (Reinfektionsrate) an Untersuchungs-Tag 180**

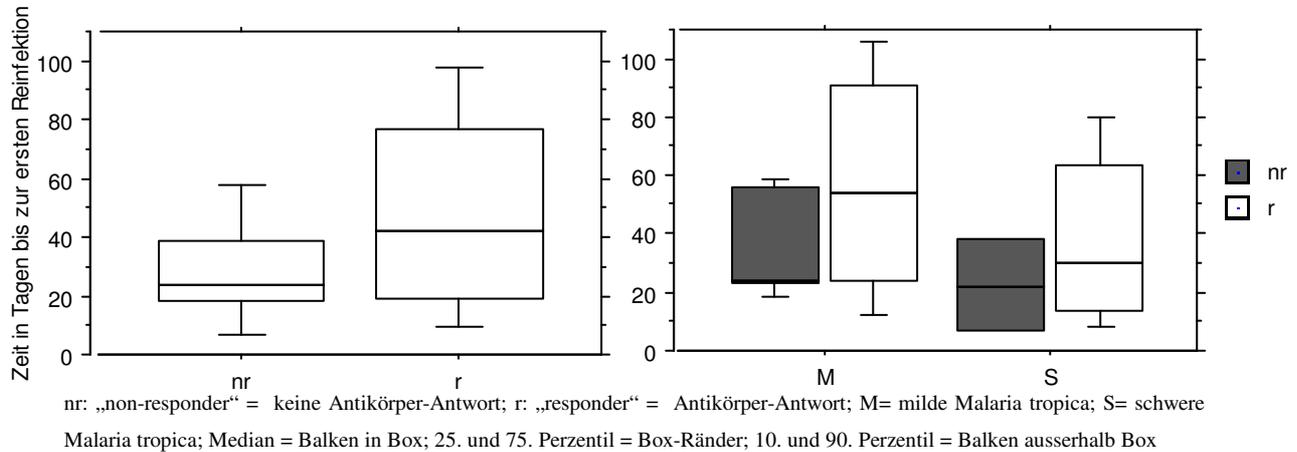
Wie in Abbildungen 3.5 dargestellt, ist an Untersuchungs-Tag 180 zu beobachten, dass in der M-Gruppe die Reinfektionsrate (IDR) bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort fast gleich ist, während bei der IgG-3-Antikörperantwort die Responder gegenüber den Non-Respondern eine statistisch *signifikant* höhere Reinfektionsrate aufweisen – U-Test von Mann und Whitney: p-Wert: 0,037.

Innerhalb der S-Gruppe zeigen sich andere Verhältnisse: während bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort wie an Untersuchungs-Tag 28 die Reinfektionsrate (IDR) in der Non-Responder-Gruppe höher als in der Responder-Gruppe liegt, ist bei der IgG-3-Antikörperantwort das umgekehrte Verhältnis zu verzeichnen: hier ist die Reinfektionsrate (IDR) bei den Respondern höher als bei den Non-Respondern - damit entspricht dieses Verhältnis dem in der M-Gruppe.

Während bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort bei Anwendung des Spearman-Rang-Korrelations-Tests für die M- und S-Gruppe keinerlei *Signifikanzen* festgestellt werden können, liegt bei der IgG-3-Antikörperantwort an Tag 180 in der M-Gruppe eine statistische *Signifikanz* mit einem p-Wert von 0,0408 und einem Rho-Wert von 0,302 vor.

Insgesamt ist festzustellen, dass während der Rekonvaleszenz, Tag 28, statistisch der Trend aufgezeigt werden kann, dass die Responder, d.h. Kinder mit einer Antikörperantwort, in allen drei untersuchten Antikörperklassen sowohl in der M- wie in der S-Gruppe eine niedrigere Reinfektionsrate als die Non-Responder, d.h. Kinder ohne eine Antikörperantwort, aufweisen, wobei im gesunden Zustand an Tag 180 dieser Trend nur in der S-Gruppe für die Antikörperklassen IgG- und IgG-1 auszumachen ist. Für die Antikörperklasse IgG-3 ist dagegen im gesunden Zustand festzustellen, dass hier sowohl in der M- wie in der S-Gruppe die Responder eine höhere Reinfektionsrate (IDR) als die Non-Responder aufweisen.

### 3.3 MSP-1<sub>19</sub>-spezifische IgG-Antikörperantwort und Zeit bis zur ersten Reinfektion



**Abbildung 3.6: IgG-Antikörperantwort auf MSP-1<sub>19</sub> und Zeit in Tagen bis zur ersten Reinfektion an Untersuchungs-Tag 28**

Bei einem Vergleich der Länge der Zeit in Tagen bis zur ersten Reinfektion der IgG-Responder, d.h. der Kinder mit einer IgG-Antikörperantwort, mit denen der Non-IgG-Responder, d.h. der Kinder ohne IgG-Antikörperantwort, ist eine schnellere Reinfektion bei den Non-IgG-Respondern zu beobachten. Allerdings ist diese Beobachtung nicht statistisch *signifikant* (p-Wert nach U-Test von Mann und Whitney: 0,110).

Nach Aufspaltung der Untersuchungsgruppe in die Kinder mit schwerer (S-Gruppe) und milder (M-Gruppe) Malaria tropica ist auch hier weiterhin dieselbe Beobachtung zu machen: die IgG-Responder weisen eine längere Zeit in Tagen bis zur ersten Reinfektion auf, als die Non-IgG-Responder. Allerdings sind die Werte auch hier nicht statistisch *signifikant* voneinander verschieden – p-Wert nach U-Test von Mann und Whitney innerhalb der M-Gruppe: 0,147, innerhalb der S-Gruppe: 0,227.

Insgesamt ist demnach der starke Trend einer verlängerten Zeit bis zur ersten Reinfektion in der IgG-Responder-Gruppe gegenüber der IgG-Non-Responder-Gruppe zu verzeichnen.

### 3.4 MSP-1<sub>19</sub>-spezifische IgG-Antikörperantwort und Alter

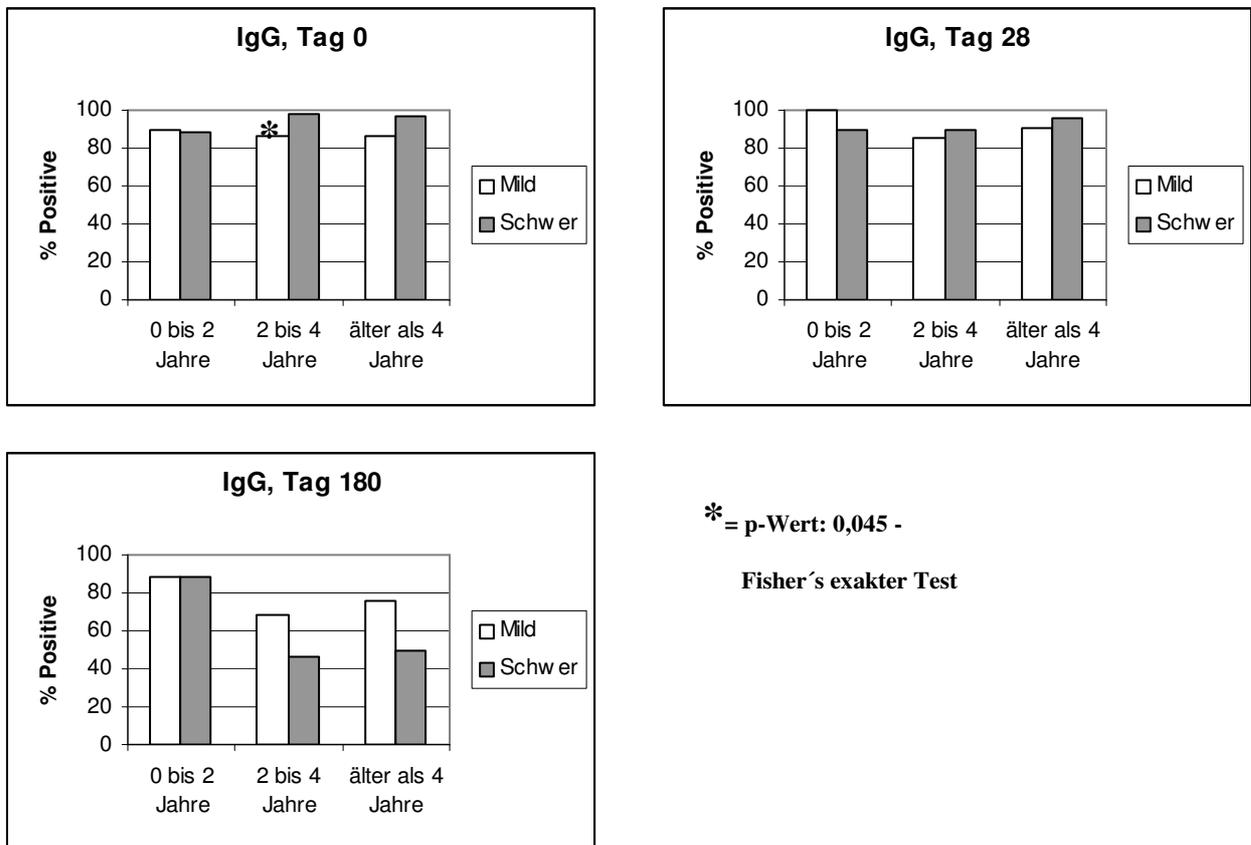
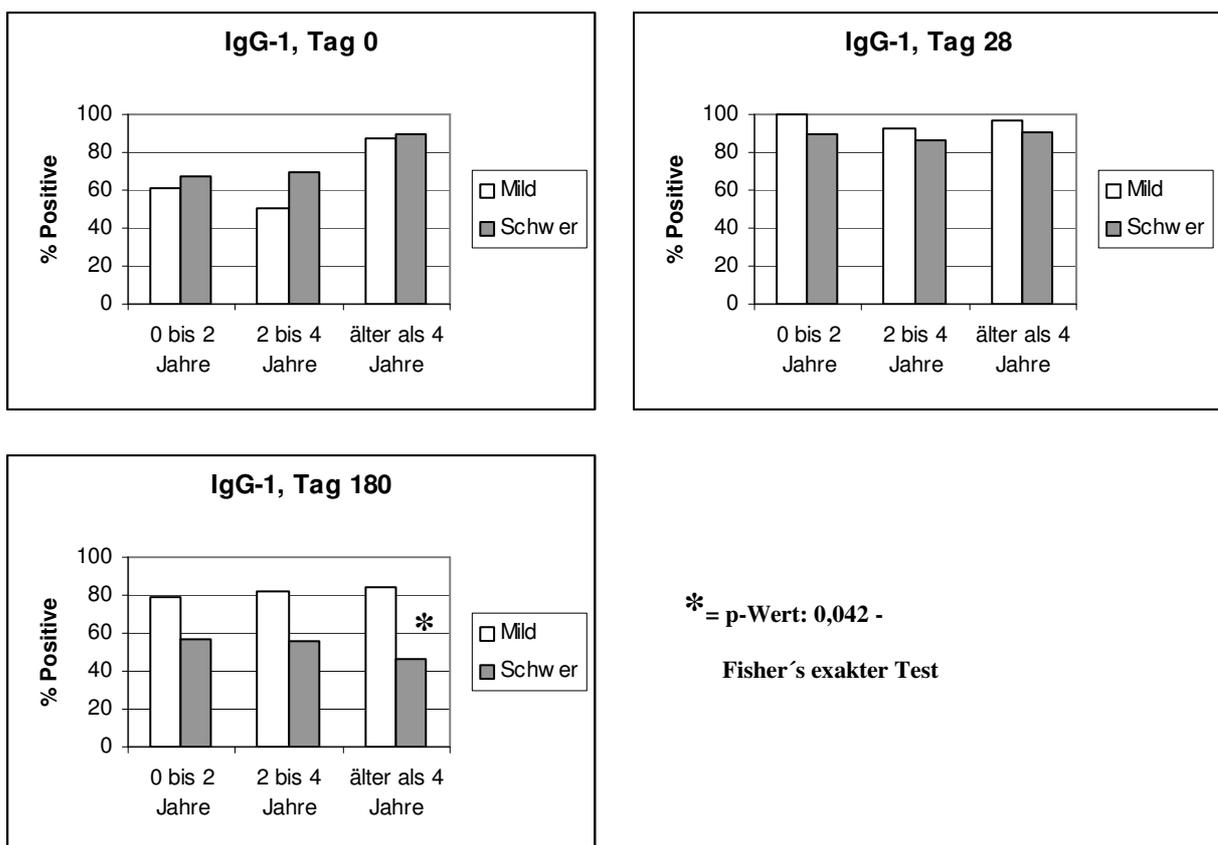


Abbildung 3.7: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren IgG-Antikörpern gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach den drei Altersklassen und nach milder und schwerer Malaria tropica

Bei Betrachtung des Untersuchungszeitraums von Tag 0 bis Tag 180 innerhalb der einzelnen Altersklassen für die IgG-Antikörperantwort gegen MSP-1<sub>19</sub> ist zu erkennen, dass an Tag 0 in allen Altersklassen sowohl in der M- wie auch in der S-Gruppe die Responderrate, d.h. die Rate der Kinder, die eine IgG-Antikörperantwort aufweisen, > 80% liegt. Dieser Prozentsatz ändert sich in den einzelnen Altersklassen während der folgenden Rekonvaleszenz an Tag 28 nicht wesentlich. Im gesunden Zustand an Tag 180 ist in den Altersgruppen „2 bis 4 Jahre“ und „älter als 4 Jahre“ eine starke Abnahme der IgG-Responderrate zu verzeichnen, während in der Altersgruppe „0 bis 2 Jahre“ die Responderrate mit >80% sowohl in der M- wie auch in der S-Gruppe stabil auf hohem Niveau bleibt. Der Abfall der Responderrate der S-Gruppe von Tag 28 auf Tag 180 ist dabei sowohl in der Altersgruppe „2 bis 4 Jahre“ mit einem p-Wert von

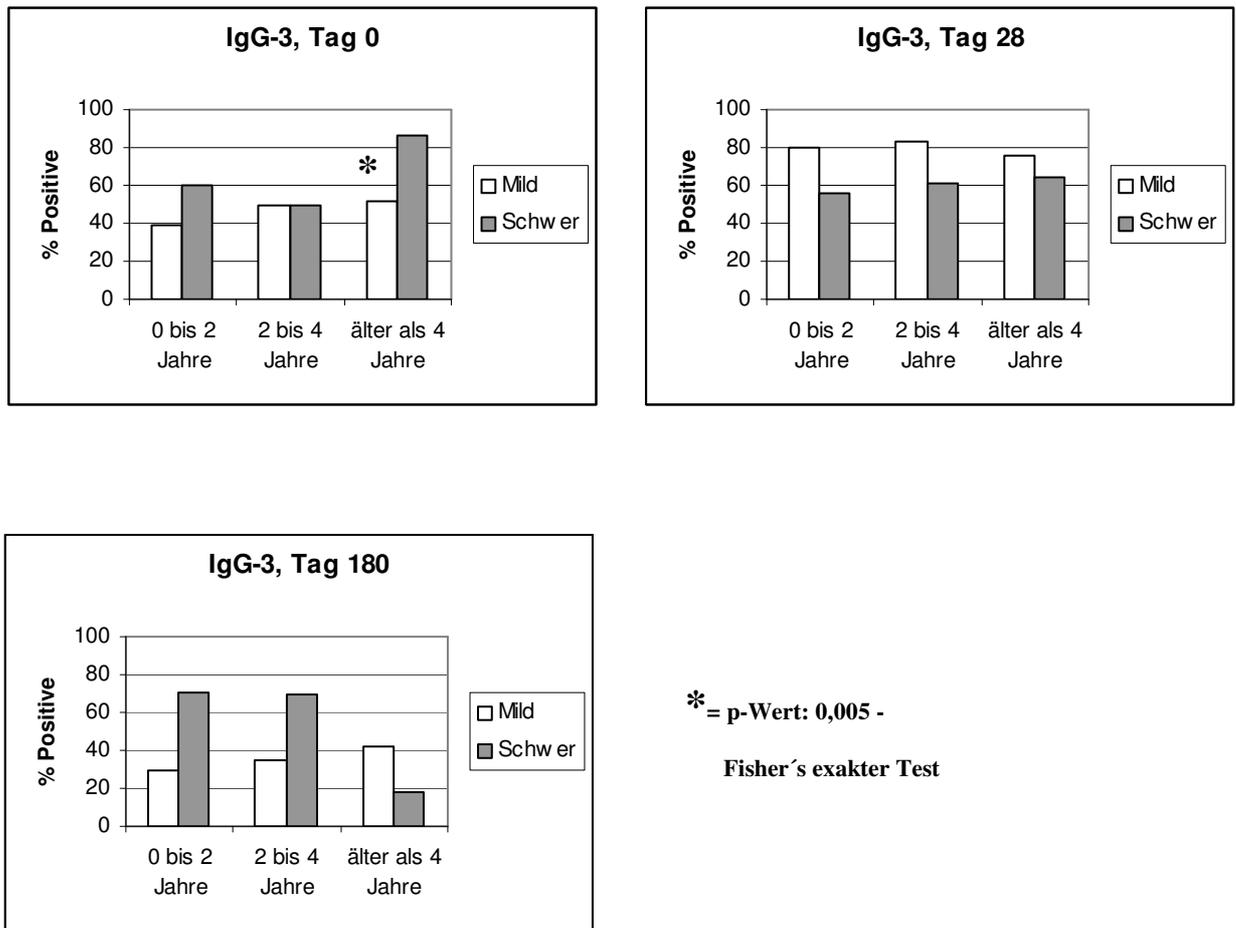
<0,001, wie auch in der Altersgruppe „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,001 hoch *signifikant* (nach Fisher's exaktem Test). Innerhalb des Untersuchungstages 180 liegt der Unterschied in der IgG-Responderrate der S-Gruppe zwischen den Altersgruppen „0 bis 2 Jahre“ und „2 bis 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,05 (nach Fisher's exaktem Test) gerade an der Grenze zur *Signifikanz* (p-Wert: <0,05). In den Altersklassen „2 bis 4 Jahre“ und „älter als 4 Jahre“ liegen die Responderraten der S-Gruppen deutlich niedriger als die der M-Gruppen. Im Vergleich zu den IgG-Responderraten an Tag 0 liegen die Responderraten der M- und S-Gruppe an Tag 180 in den Altersklassen „2 bis 4 Jahre“ und „älter als 4 Jahre“ ebenfalls deutlich niedriger. In der S-Gruppe sind diese Unterschiede *signifikant*: in beiden Altersklassen liegt der p-Wert bei <0,001 (nach Fisher's exaktem Test).



**Abbildung 3.8: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren IgG-1-Antikörpern gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach den drei Altersklassen und nach milder und schwerer Malaria tropica**

Bei dem Vergleich der verschiedenen Altersklassen über den gesamten Untersuchungszeitraum für die **IgG-1**-Antikörperantwort gegen **MSP-1<sub>19</sub>** ist an Tag 28 erneut eine hohe Responderrate von > 80% in allen Altersklassen sowohl in der M- als auch in der S-Gruppe zu beobachten. Die Responderraten an Tag 180 liegen ebenfalls wieder deutlich niedriger als an Tag 28. Im gesunden Zustand ist in allen drei Altersgruppen ein deutlicher Unterschied in der Höhe der Responderraten zwischen der M- und S-Gruppe zu erkennen: die S-Gruppe weist eine deutlich geringere Responderrate gegenüber der M-Gruppe auf. Innerhalb der höchsten Altersklasse „älter als 4 Jahre“ ist dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,042 statistisch *signifikant* (nach Fisher's exaktem Test).

In der akuten Phase an Tag 0 weist die höchste Altersklasse „älter als 4 Jahre“ eine deutlich höhere Responderrate in der M- und S-Gruppe auf, als die beiden niedrigeren Altersklassen. Deren Responderraten liegen in den S-Gruppen jeweils über denen der M-Gruppen. Insgesamt weisen sie sowohl in der S- wie auch in der M-Gruppe eine Responderrate von deutlich unter 80% auf. Dabei ist der Unterschied in der Responderrate der M-Gruppe zwischen der Altersklasse „2 bis 4 Jahre“ und „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,005 statistisch *signifikant*, während derjenige der S-Gruppe mit einem p-Wert von 0,054 gerade an der Grenze zur *Signifikanz* liegt (nach Fisher's exaktem Test). Zwischen den Responderraten an Tag 0 und Tag 180, d.h. zwischen dem akuten Krankheitszustand und dem gesunden Zustand, besteht in der S-Gruppe der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,007 und innerhalb der M-Gruppe der Altersklasse „2 bis 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,038 statistische *Signifikanz* (nach Fisher's exaktem Test). Ebenfalls läßt sich zwischen Tag 0 und Tag 28 innerhalb der Altersklasse „0 bis 2 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,009 und in der Altersklasse „2 bis 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,0003 zwischen den Responderraten der M-Gruppen statistische *Signifikanz* nachweisen (nach Fisher's exaktem Test). Weiterhin besteht in den S-Gruppen der Altersklasse „2 bis 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,0311 und der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,008 zwischen den Responderraten an Tag 28 und Tag 180 statistische *Signifikanz* (nach Fisher's exaktem Test).



**Abbildung 3.9: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren IgG-3-Antikörpern gegen MSP-1<sub>19</sub> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach den drei Altersklassen und nach milder und schwerer Malaria tropica**

Bei Betrachtung des Untersuchungszeitraums von Tag 0 bis Tag 180 innerhalb der einzelnen Altersklassen für die IgG-3-Antikörperantwort gegen MSP-1<sub>19</sub> ist zu erkennen, dass an allen Untersuchungstagen die Responderraten in der M- und S-Gruppe niedriger als bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort liegen. Auch hier weisen die Responderraten an Tag 28 im Vergleich zu den anderen Untersuchungstagen die höchsten Werte auf. Dabei stellt die M-Gruppe der Altersklasse „2 bis 4 Jahre“ mit 83% die höchste Responderrate an Tag 28 dar, die insgesamt nur noch von der 86%igen Responderrate der S-Gruppe der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ an Tag 0 übertroffen wird. An Tag 28 zeigt sich zudem in allen drei Altersklassen, dass die Responderrate innerhalb der M-Gruppe höher liegt als in der S-Gruppe. Dagegen liegt die Responderrate der S-Gruppe an Tag 0 in der Altersklasse „0 bis 2 Jahre“ und

„älter als 4 Jahre“ höher als die der jeweilige M-Gruppe. Dabei ist der Unterschied in der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,005 statistische *signifikant* (nach Fisher's exaktem Test). Ebenfalls statistisch *signifikant* ist der Unterschied zwischen den Responderraten der S-Gruppen der Altersklassen „2 bis 4 Jahre“ und „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,002 (nach Fisher's exaktem Test). In der Altersklasse „2 bis 4 Jahre“ entsprechen sich die Responderraten in der M- und S-Gruppe. Im gesunden Zustand an Tag 180 liegen bei der IgG-3-Antikörperantwort im Gegensatz zu der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort die Responderraten der S-Gruppe in den Altersklassen „0 bis 2 Jahre“ und „2 bis 4 Jahre“ höher als die der jeweiligen M-Gruppen. Nur in der höchsten Altersklasse „älter als 4 Jahre“ ist die Responderrate der S-Gruppe weiterhin geringer als die der M-Gruppe. Dabei ist der Unterschied zwischen den Responderraten der S-Gruppen der Altersklasse „0 bis 2 Jahre“ und der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,0491, sowie der Altersklasse „2 bis 4 Jahre“ und der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,018 statistisch *signifikant* (nach Fisher's exaktem Test).

Zwischen den einzelnen Untersuchungstagen treten innerhalb der Altersklassen und M- oder S-Gruppen ebenfalls statistisch *signifikante* Unterschiede (nach Fisher's exaktem Test) zwischen den Responderraten auf. Zwischen Tag 0 und Tag 180 sind die Responderraten der S-Gruppen in der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,0001 hoch *signifikant* verschieden. Ebenfalls *signifikant* verschieden sind die Responderraten der M-Gruppen zwischen Tag 0 und Tag 28 in der Altersklasse „0 bis 2 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,033 und der Altersklasse „2 bis 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,005. Zwischen Tag 28 und Tag 180 kann statistisch eine *Signifikanz* zwischen den Responderraten der M-Gruppen in allen drei Altersklassen nachgewiesen werden: „0 bis 2 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,009, „2 bis 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,003 und „älter als 4 Jahre“ mit einem p-Wert von 0,032. Zwischen denselben Untersuchungstagen ist ebenfalls in der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ eine statistische *Signifikanz* zwischen den Responderraten der S-Gruppen mit einem p-Wert von 0,026 nachzuweisen.

Insgesamt ist im Antikörperantwort-Verhalten ein Unterschied zwischen der IgG-3-Antikörperantwort im Gegensatz zu der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort festzustellen. Während die IgG- und IgG-1-Antikörperantwort an Tag 28 in allen Altersklassen Responderraten von >80% zeigen und von Tag 28 auf Tag 180 einen Abfall in der Responderrate in der M- und S-Gruppe aller Altersklassen verzeichnen, liegen die Responderraten in der M- und S-Gruppe in allen Altersklassen bei der IgG-3-Antikörperantwort generell an den Untersuchungstagen 0 und 28 niedriger. An Tag 180 zeigen die S-Gruppen der Altersklassen „0 bis 2 Jahre“ und „2 bis 4 Jahre“ bei der IgG-3-Antikörperantwort deutlich höhere Responderraten als die jeweiligen M-Gruppen. Bei allen anderen an Tag 180 untersuchten Altersklassen und Antikörpern ist das Verhältnis genau umgekehrt: die Responderraten der M-Gruppen liegen höher als die jeweiligen Responderraten der entsprechenden S-Gruppen. Lediglich bei der Altersklasse „0 bis 2 Jahre“ liegt die IgG-Antikörperantwort an Tag 180 in beiden Responderraten gleich hoch. Während an Tag 0 die Responderrate der IgG-Antikörperantwort in allen Altersklassen sowohl in der M- als auch in der S-Gruppe >80% liegt, ist bei der IgG-1-Subklassen-Antwort festzustellen, dass die Responderrate nur in der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ in der M- und S-Gruppe eine Responderrate von >80% zeigt, während in den beiden niedrigeren Altersklassen die Responderraten in den M- und S-Gruppen <80% liegen. Bei einem Vergleich der Untersuchungstage 0 und 180 ist zu erkennen, dass die Responderrate in der ältesten Altersklasse „älter als 4 Jahre“ bei allen drei gemessenen IgG-Antikörperantworten an Tag 0 in der S-Gruppe *signifikant* höher liegt als an Tag 180. Das gleiche gilt als Trend ebenfalls für die entsprechenden M-Gruppen der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ und für die S-Gruppen der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort in der Altersklassen „2 bis 4 Jahre“.

Insgesamt ist keine stetig *signifikante* Zunahme der Responderrate von der jüngsten bis zur ältesten Altersklasse bei den verschiedenen Antikörperantworten zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten auszumachen.

### **3.5 MSP-1<sub>19</sub>-spezifische IgG-Antikörperantwort und Geschlecht, AB0-Blutgruppe, Sichelzellen-Trägerschaft, NOS-2 und MBL-Mutation und Parasitämie**

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden weiterhin statistisch verglichen mit:

- AB0-Blutgruppenzugehörigkeit
- Höhe der Parasitämie
- Geschlecht
- Trägerschaft der Mutation NOS-2<sup>Lambaréné</sup> in der regulierenden Region des NOS-Synthase-2-(NOS-2) Gens
- Trägerschaft einer Mutationsvariante des Promotors des Mannose-bindenden Lektins (MBL)
- heterozygoten Trägerschaft des Sichelzellgens (Hb AS)

Diese Daten wurden ebenfalls in der 1/95C-Studie von den Untersuchungskindern erhoben.

Bei diesen Untersuchungen konnten keine statistischen *Signifikanzen* oder verstärkte statistische Trends festgestellt werden.

## 4 Diskussion

Die klinische Malariasymptomatik wird durch die Vermehrung der erythrozytären Stadien des Malariaparasiten verursacht [Warrell, 1993]. Antikörper gegen Merozoiten-Antigene können dabei die erythrozytäre Parasiteninvasion inhibieren, so dass über eine Reduktion der Parasitämie ein gewisser Schutz vor der Malaria vermittelt wird [Blackman et al., 1994; Holder, 1988]. Das Merozoiten-Oberflächenantigen *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-1 – PfMSP-1 – wird dabei als ein möglicher Impfstoff-Kandidat gegen die erythrozytären Stadien des die Malaria tropica verursachenden Erregers *Plasmodium falciparum* angesehen.

In Impfstudien an Affen und Mäusen konnte gezeigt werden, dass mit nativem PfMSP-1 immunisierte Primaten partiell oder total gegen homologe Parasiteninfektionen geschützt sind [Chang et al., 1996; Daly und Long, 1993; Kumar et al., 1995; Ling et al., 1994; Tian et al., 1997]. In einer anderen Studie wiederum konnte dieser Schutz bei homologer wie heterologer Parasiteninfektion nicht gefunden werden [Burghaus et al., 1996].

In vitro können MSP-1<sub>19</sub>-spezifische Antikörper die erythrozytäre Invasion der *Plasmodium falciparum*-Merozoiten hemmen [Chappel und Holder, 1993]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die zwei epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen bei PfMSP-1<sub>19</sub> von humanen Antikörpern erkannt werden [Shai et al., 1995], und dass in immunepidemiologischen Studien die Anwesenheit solcher Antikörper mit einem niedrigeren Risiko klinisch an Malaria zu erkranken assoziiert war [Al-Yaman et al., 1996; Branch et al., 1998; Egan et al., 1996; Hogh et al., 1995; Riley et al., 1992].

1992 konnten Riley und Mitarbeiter bei 3- bis 8-jährigen Kindern in Gambia zeigen, dass bei den Untersuchungskindern das Auftreten der gegen das 42 kDa-C-terminale Fragment von PfMSP-1 – vom West-afrikanischen Wellcome-Typ - gerichteten Antikörper *signifikant* mit Resistenz vor klinischer Malaria assoziiert war [Riley et al., 1992]. Dabei wurde die Untersuchung in einem Gebiet mit saisonaler, aber stabiler Malaria-Transmissionsrate durchgeführt [Greenwood et al., 1987]. Egan et al. zeigten 1996 bei 3- bis 8-jährigen Kindern, ebenfalls in Gambia, eine strenge Assoziation

zwischen Antikörper gegen die zweite epidermale Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne des MSP-1<sub>19</sub> vom MAD20-Typus und Schutz vor Malaria und hoher Parasitämie. Dabei belief sich in dem saisonbedingten endemischen Malariagebiet die Inokulationsrate bei den Kindern auf 1-5 infektiöse Stiche / Jahr [Greenwood et al., 1987]. In einer zweiten Population von 0- bis 8-jährigen Kindern in Sierra Leone konnte in der gleichen Studie zudem ein 40%iger Schutz vor Malaria nachgewiesen werden [Egan et al., 1996]. Dabei wurde als Antigen ein Protein gewählt, das die MAD20 Sequenz für die erste epidermale Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne und die Sequenz des Wellcome-Typus für die zweite epidermale Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne besaß. Die Transmissionsrate ist in Sierra Leone ganzjährig und liegt bei ca. 30 infektiösen Stichen / Jahr und Erwachsener [Barnish et al., 1996].

Im Gegensatz zu den bisher dargestellten Studien zeigten 1999 Dodoo et al. in Ghana bei 266 Schulkindern im Alter von 3 bis 15 Jahren, dass bei Verwendung des Wellcome- und des MAD20-Typus des MSP-1<sub>19</sub> keine Assoziation zwischen der Antikörperantwort und klinischem Schutz vor Malaria aufzuzeigen war. Dabei lag die Prävalenz des die beiden epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Bereiche beinhaltende Proteins erkennenden Antikörper bei 30% [Dodoo et al., 1999]. Die longitudinale Studie fand in einer Region mit stabiler aber saisonaler Malaria-Transmission statt. Die Inokulationsrate liegt in dieser Region bei 20 infektiösen Stichen / Jahr, wobei 98% *Plasmodium falciparum* übertragen wird [Afari et al., 1995].

In dieser Arbeit wurden die IgG-, sowie die IgG-1- und IgG-3-Antikörperantworten von gabunesischen Kindern im Alter von 8 Monaten bis 11 Jahre auf den die beiden epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen enthaltenden konservierten 19 kDa- Bereich des C-terminalen Endes des Merozoiten Surface Proteins-1 – MSP-1<sub>19</sub> - untersucht. Dabei liegt das Untersuchungsgebiet in einer Region mit stabiler *Plasmodium falciparum*-Malariatransmission mit einer infektiösen Inokulationsrate von ca. 50 infektiöser Stiche / Jahr [Sylla et al., 2000].

#### 4.1 IgG-Antikörperproduktion und MSP-1<sub>19</sub>

*An Tag 0 und Tag 28 liegt die Responderrate der IgG-gesamt-Antikörperantwort bei >80%. Während an Tag 0 die Anzahl der IgG-Positiven zwischen der M- und S-Gruppe in der S-Gruppe signifikant höher liegt, sind an Tag 28 die Responderraten beider Gruppen ungefähr auf gleichem Niveau.*

Die mit >80% gemessene Responderrate der untersuchten Kindern lässt bei dem untersuchten MSP-1<sub>19</sub>-Antigen innerhalb der humoralen Immunantwort auf eine starke Immundominanz schließen. Damit liegt die Beobachtung dieser Arbeit im Gegensatz zu den Untersuchungen von Doodo et al. und Egan et al., die in ihren Untersuchungen eine schwächere Immunantwort beschreiben. Die durch Doodo und Mitarbeiter untersuchten Kinder im Alter von 3-15 Jahren wiesen bei der die zwei epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen des Wellcome-Typus des MSP-1<sub>19</sub> beinhaltenden Antigen-Präsentation nur eine Prävalenz von 30% auf. Wurde lediglich die erste epidermale Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne präsentiert, so lag die Responderrate bei 15%. Bei Präsentation der zweiten epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne vom MAD20-Typus wurde sogar nur eine Prävalenz von 4% gefunden [Doodo et al., 1999]. Egan et al. wiesen bei westafrikanischen Kindern und Erwachsenen in Gambia eine Prävalenz von ca. 40% gegen das die zwei epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen des Wellcome-Typus wie auch des MAD20-Typus beinhaltende MSP-1<sub>19</sub>-Antigen auf sowie eine Prävalenz von <20%, wenn die zwei epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen alleine präsentiert wurden. Bei 0-8jährigen Kindern in Sierra Leone wurde sogar nur eine Antikörperprävalenz von <20% bei gemeinsamer Präsentation beider epidermaler Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen sowie von 3-4% bei Präsentation der zweiten epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne des MSP-1<sub>19</sub> gemessen [Egan et al., 1995]. Lediglich Cavanagh und Mitarbeiter konnten bei 3-27jährigen Sudanesen im Osten von Sudan in einem Gebiet von mesoendemischer und unstabiler Malaria eine Responderrate von 90% gegen das MSP-1<sub>19</sub>-Antigen vom Wellcome-Typus nachweisen [Cavanagh et al., 1998]. Dabei wurde der Unterschied zwischen dieser hohen Responderrate und den niedrigeren

Responderraten in den vorher genannten Studien von Cavanagh und Mitarbeitern durch den präzise gewählten Studienaufbau erklärt, in dem die Strategie einer longitudinalen Untersuchung mit einem nahen Monitoring der Malariainfektion über einen Zeitraum von 4 Jahren verbunden wurde. Die in der hier vorliegenden Untersuchung gefundenen Responderraten von >80% würden demnach nicht nur für eine ausgeprägte Immundominanz des die beiden epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen des Wellcome-Typus enthaltenden MSP-1<sub>19</sub> sprechen, sondern gleichfalls auch auf eine gut gewählte Studiendurchführung hinweisen.

Die hier gefundenen IgG-Responder-Prozentsätze entsprechen zudem der Tatsache, dass die meisten Studien-Kinder bereits vor Aufnahme in die Studie Kontakt mit *Plasmodium falciparum* gehabt haben, so dass es sich bei den meisten Kindern nicht um einen Erstkontakt mit dem Parasiten handelt. Von einem für die Primärantwort typischen Antikörperverlaufsbild mit zunächst sehr niedrig ausfallender IgG-Antikörperantwort – bedingt durch primäre Bildung von IgM und einen sich erst langsam vollziehenden Switch zu IgG - war daher nicht auszugehen.

Allerdings bleibt festzustellen, dass die Responderrate an Tag 0 innerhalb der Gruppe derjenigen Kinder, die schwer an der Malaria tropica erkrankt sind, höher liegt als bei den mild erkrankten Kindern. Da die Kinder innerhalb der S-Gruppe definitionsgemäß eine höhere Parasitämie aufweisen als die Kinder in der M-Gruppe, könnte dieser Unterschied damit erklärt werden, dass durch die höhere Parasitenanzahl dem Immunsystem eine größere Menge an Merozoiten-Antigen präsentiert wird. Dadurch könnte es zu einer stärkeren und schnelleren Antikörper-Produktion angeregt werden, so dass die Nachweisgrenze der Antikörper in der S-Gruppe gegenüber derjenigen in der M-Gruppe schneller erreicht und damit früher überschritten wird. Der AU-Wert der IgG-Responder der S-Gruppe liegt dabei an Tag 0 leicht unter dem der M-Gruppe. Insgesamt aber liegen die AU-Werte der Responder in der S-Gruppe unter denen der M-Gruppe, ohne dass jedoch ein statistisch *signifikanter* Unterschied zwischen der Höhe der IgG-Antikörper zwischen den Kindern der M- und S-Gruppe auszumachen ist.

*Sowohl bei der IgG-1- wie bei der IgG-3-Antikörperantwort steigt die Responderrate in der M-Gruppe von Tag 0 auf Tag 28 signifikant an, um dann an Tag 28 höher zu liegen als in der S-Gruppe.*

Diese Beobachtung zeigt, dass die Kinder in der M-Gruppe im Gegensatz zu den S-Kindern über einen Mechanismus verfügen müssen, der ihr Immunsystem in die Lage versetzt, mit der Zeit trotz geringerer Parasitenmenge mehr IgG-1- und IgG-3-Antikörper zu produzieren. Eine Antikörper-verbrauchenden Reaktion ist demnach nicht zu beobachten.

*Sowohl bei der IgG-Antikörperantwort wie auch bei den Subklassen-Antikörperantworten IgG-1 und IgG-3 zeigen die gefundenen Werte einen statistisch signifikanten Abfall der Responderrate von Tag 28 auf Tag 180. Während bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort dieser Abfall innerhalb der S-Gruppe immer stärker ausgeprägt ist als in der M-Gruppe, ist dies bei der IgG-3-Antikörperantwort umgekehrt: hier ist der Abfall der Responderrate zwischen Tag 28 und Tag 180 innerhalb der M-Gruppe wesentlich stärker ausgeprägt als in der S-Gruppe.*

Die Beobachtung des Abfalls der Responderraten vom rekonvaleszenten auf den gesunden Zustand sowohl bei der IgG- wie auch bei den IgG-Subklassen-Antikörperantworten könnte mit dem Ausbleiben von Reinfektionen und der damit im Blut einhergehenden Abnahme der Parasitenstadien versucht werden zu erklären. Dadurch bedingt kommt es zu einer Abnahme der Parasiten-Antigene und der durch die Medikamenten-induzierte Parasitenklärung erzeugten und ebenfalls als Antigene wirkenden Zerfallsprodukte. Bemerkenswert ist allerdings, dass in der Untersuchungsgruppe die Kinder der S-Gruppe, die also definitionsgemäß eine höhere Parasitenlast aufweisen, einen stärker ausgeprägten Abfall in der Responderrate bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort zeigen, als die Kinder in der M-Gruppe. Eine ähnliche Beobachtung konnten auch Luty und Mitarbeiter in derselben Untersuchungsgruppe bei der Untersuchung der IgG-Antikörperantwort auf Schizonten-Antigene machen [Luty et al., 2000].

Insgesamt weisen die Beobachtungen auf einen fundamentalen Unterschied in der Empfänglichkeit gegenüber Infektionen zwischen den beiden Gruppen von Kindern hin. Die *signifikant* geringeren Parasiten-spezifischen IgG- und IgG-1-Antikörperantworten, die in der gesunden Phase in den untersuchten Kindern mit schwerer Malaria beobachtet wurden, könnten einen sich entwickelnden Status immunologischer Toleranz in Bezug auf die Parasitenantigene widerspiegeln. Dieser Toleranz-Status könnte dabei durch die kumulativen Effekte der sich wiederholenden hohen Antigenkonzentrationen während den sukzessiven Infektionen bedingt sein [Luty et al., 2000].

Andererseits könnte bei den schwer an Malaria tropica erkrankten Kindern auch eine erhöhte Apoptose-Rate MSP-1<sub>19</sub>-spezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vorliegen, wie sie bei Wipasa et al. für eine *Plasmodium yoelii*-Infektion beschrieben wird [Wipasa et al., 2001]. Bereits in früheren Jahren konnte in Mäusen und bei Nagetier-Malaria gezeigt werden, dass die durch Immunisation induzierte protektive Immunität gegen MSP-1<sub>19</sub> neben den Antikörpertitern gegen MSP-1<sub>19</sub> auch von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen abhängig ist [Daly et al., 1995, Hirunpetcharat et al., 1997]. Malaria induzierte Apoptose wurde dabei bei Mäusen, Affen und Menschen untersucht. In mehreren dieser Studien konnte eine Reduktion der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen während einer Malaria nachgewiesen werden [Helmby et al., 2000; Hirunpetcharat et al., 1998; Lisse et al., 1994, Matsumoto et al., 2000]. Wipasa und Mitarbeiter folgern, dass sich der durch Apoptose verursachte Verlust von MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen T-Helfer-Zellen günstig auf das Parasitenwachstum auswirken könnte, indem es die Höhe der Antikörperantwort durch Störung der Ausbildung und des Fortbestandes der immunologischen Gedächtnisantwort limitieren könnte. In Patienten mit einer *Plasmodium falciparum*-Infektion ist der Verlust peripherer T-Lymphozyten mit einer Suppression sowohl der spezifischen als auch der unspezifischen Antikörperantworten assoziiert worden [Ho et al., 1986].

Weiterhin bleibt die Frage bestehen, warum sich die Responderrate bei der IgG-3-Antikörperantwort gegenläufig verhält: diese bleibt in der S-Gruppe an Untersuchungstag 180 fast gleich hoch wie an Untersuchungstag 28, während die Responderrate dagegen in der M-Gruppe *signifikant* abfällt.

In der Wirt-Parasit-Interaktion nimmt normalerweise bei einer Reinfektion die IgM-Antikörperantwort gegenüber der Erstantwort ab, während die IgG-1- und IgG-3-

Antikörperantwort zunehmen. Ab der zweiten Reinfektion sind dann die IgM-Antikörperspiegel sehr niedrig, während IgG-1-Antikörper dominieren und IgG-3-Antikörper in niedriger Konzentration persistieren. Findet danach keine weitere Reinfektion statt, so bilden die IgG-1-Antikörper die Hauptklasse der Antikörper [Ferrante und Rzepczyk, 1997]. In der hier vorliegenden Untersuchung liegt die IgG-3-Responderanzahl in der S-Gruppe an Tag 180 fast genauso hoch wie die der IgG-1-Responder. Diese Beobachtung kann darauf hinweisen, dass durch die erhöhte Reinfektionsrate innerhalb der S-Gruppe [Lell et al., 1999] eine häufigere Restimulation der Antikörper-produzierenden Zellen erfolgt, so dass die normalerweise kurze Halbwertszeit der IgG-3-Antikörperantwort verlängert wird, und es dadurch zu kontinuierlich hohen IgG-3-Antikörperspiegeln im Wirt kommt. IgG-3-Antikörper werden dabei aufgrund ihres zytophilen Charakters und der Komplementbindungsfähigkeit als potentiell effektive Schutzmediatoren betrachtet [Ferrante und Rzepczyk, 1997].

*Statistisch ist ein Trend in der Zunahme des IgG-1:IgG-3-Ratio-Wertes in der M-Gruppe der Kinder vom rekonvaleszenten zum gesunden Zustand zu erkennen, während in der S-Gruppe der Kinder eine statistisch signifikante Abnahme von Tag 28 auf Tag 180 zu verzeichnen ist – d.h. während in der Gruppe der nur mild an Malaria tropica erkrankten Kinder vom rekonvaleszenten Zustand zum gesunden Zustand eine Verschiebung des IgG-1:IgG-3-Gleichgewichts zu Gunsten der IgG-1-Antikörper stattfindet, ist in der Gruppe der schwer an Malaria tropica erkrankten Kinder eine Verschiebung des Antikörpergleichgewichts zu Gunsten der IgG-3-Antikörper zu erkennen.*

Shi und Mitarbeiter [Shi et al., 1999] fanden bei in vitro Untersuchungen über Antikörper-abhängige und Monozyten-induzierte Parasiten-Inhibition bei Blutseren von Erwachsenen aus Kenia

- für die chronische Malariainfektion wurde ein hypothetisches Modell formuliert: Antikörper-abhängige zelluläre Hemmung (ADCI), bei dem Antikörper die Parasiten im Merozoitenstadium opsonieren, die dann durch zelluläre Mechanismen eliminiert werden [Druilhe et al., 1997], wobei gezeigt werden konnte, dass bei *Plasmodium*

*falciparum* die ADCI von den zytophilen Isotypen IgG-1 und IgG-3 abhängig ist [Bouharoun-Tayoun et al., 1990] - „dass der IgG-1:IgG-3-Ratio-Wert derjenigen Individuen höher war, deren Antikörper den höchsten inhibitorischen Effekt innerhalb der Untersuchung aufwiesen. Daher vermuten Shi und Mitarbeiter, dass auch die IgG-3-Antikörper mit den protektiven IgG-1-Antikörpern interferieren können, indem sie mit ihnen um dieselben Antigen-Epitope auf den Parasiten konkurrieren. Unterstützung für diese Hypothese liefert eine weitere Studie von Shi et al. von 1996, in der Schutz vor Parasitämie in jungen kenianischen Kindern (<5 Jahre) nicht mit IgG-3- aber mit IgG-1-Antikörpern assoziiert war, die gegen die C-terminale 19-kDa Domäne der Merozoiten-Oberfläche gerichtete waren [Shi et al., 1996]. Damit zeigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit in soweit Ähnlichkeit mit denen von Shi et al. von 1996, indem ein gewisser Schutz vor der Erkrankung an der schweren Form der Malaria tropica mit dem erhöhten IgG-1:IgG-3-Ratio-Wert assoziiert zu sein scheint. Dabei entsprechen sich auch annähernd die Altersgruppe der untersuchten Kinder in beiden Untersuchungen. Ein Zusammenhang zwischen den IgG-Antikörperantworten auf das MSP-1<sub>19</sub> und der Höhe der Parasitämie kann dagegen in der hier vorliegenden Studie nicht gezeigt werden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in anderen Studien gemacht werden: Egan et al. konnten bei ihren Untersuchungen an Kindern und Erwachsenen in Gambia eine vorherrschende IgG-1-Antikörperantwort messen. Sie schliessen daraus, dass damit den IgG-1-Antikörpern eine Aufgabe in der Opsonierung und der Komplement-vermittelten Lyse freier Merozoiten zukommen könnte [Eagan et al., 1995]. Auch in der Untersuchung von Dodoo et al. an Kindern in Ghana wurde eine dominierende IgG-1-Antikörperantwort in allen positiven Anti-*Pf*MSP-1<sub>19</sub>-IgG-Proben gefunden. Aufgrund der insgesamten IgG-1-Dominanz wurde in deren Untersuchung keine IgG-1:IgG-3-Ratio gemessen. Allerdings fanden Dodoo et al. keine *signifikante* Assoziation zwischen der Antikörperhöhe und dem Schutz vor klinischer Malaria [Dodoo et al., 1999]. Auch Ferrante und Rzepczyk erwähnen, dass in untersuchten Blutseren aus Gambia IgG-1-Antikörper die dominierende Antwort auf das *Pf*MSP-1<sub>19</sub> darstellten [Ferrante und Rzepczyk, 1997]. Weiterhin schlagen Shi und Mitarbeiter vor, dass die Präsenz einer zirkulierenden, niedrigst konzentrierten Parasitämie in immunen Erwachsenen das Gleichgewicht von schützenden IgG-1- und IgG-3-Antikörpern modifizieren und den Aktivations-Status der Monozyten beeinflussen könnte. Dabei ist

zu erwarten, dass die Unterschiede in der Qualität versus Quantität von Antikörpern, Monozyten und Parasitenlast den immunitären Status auf individuellem Niveau beeinflussen. Diallo und Mitarbeiter wiesen in ihrer Untersuchung zu IgG-1/IgG-3-Antikörperantworten auf MSP-1<sub>19</sub> bei Erwachsenen aus dem Senegal darauf hin, dass die IgG-1:IgG-3-Ratio auch von den Antigenen abhängt, die in den Isotyp-spezifischen Immunassays verwendet werden [Diallo et al., 2001].

#### **4.2 Zusammenhang der MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-Antikörperantwort mit der Incidence density rate und Zeit bis zur ersten Reinfektion**

*Sowohl während der Rekonvaleszenz, an Tag 28, als auch im gesunden Zustand, an Tag 180, weisen die Responder, d.h. Kinder mit einer Antikörperantwort, bei der IgG-Antikörperantwort in der M- wie in der S-Gruppe eine niedrigere Reinfektionsrate als die Non-Responder, d.h. Kinder ohne eine Antikörperantwort, auf.*

*Dieser statistische Trend ist auch bei der IgG-1- und IgG-3-Subklassen-Antikörperantwort an Tag 28 zu beobachten. Im gesunden Zustand, an Tag 180, ist dieser statistische Trend dagegen nur in der S-Gruppe für die IgG-1-Antikörperantwort auszumachen. Bei der IgG-3-Antikörperantwort weisen sowohl in der M- wie in der S-Gruppe die Responder eine höhere Reinfektionsrate (IDR) als die Non-Responder auf.*

Lell et al. konnten für die gleiche Untersuchungsgruppe nachweisen, dass die Kinder der S-Gruppe *signifikant* höhere Reinfektionsraten aufweisen, als diejenigen der M-Gruppe. Dabei wird Reinfektion als *Plasmodium falciparum*-Parasitämie in Begleitung von Malaria-Krankheitssymptomen definiert [Lell et al., 1999]. Die beobachteten unterschiedlichen Reinfektionsraten führen Lell et al. dabei teilweise auf angeborene Resistenzen zurück. In derselben Patientengruppe konnte eine Assoziation zwischen einer verlängerten Zeit bis zur ersten Reinfektion und einer Punktmutation in der Promotorregion des Stickstoffmonoxid-Synthase-2-Gens (NOS2<sup>Lambaréné</sup>) gefunden werden [Kun et al., 1998a].

In der hier vorliegenden Arbeit kann nun für MSP-1<sub>19</sub> während der Rekonvaleszenz zusätzlich der statistische Trend aufgezeigt werden, dass in beiden Gruppen diejenigen Kinder, die eine IgG-Antikörperantwort entwickeln, d.h. die sogenannten Responder, eine niedrigere Reinfektionsrate als die Non-Responder sowohl in der M- wie S-Gruppe aufweisen. Dabei ist die Beobachtung in der S-Gruppe bei der IgG-3-Antikörperantwort statistisch *signifikant*. IDR und Antikörperantwort zeigen zu diesem Zeitpunkt somit eine negative Korrelation, d.h. eine Antikörperproduktion gegen MSP-1<sub>19</sub> scheint in der Rekonvaleszenz unabhängig von der Schwere der ursprünglich durchgemachten Erkrankung einen schützenden Effekt vor erneuten Reinfektion zu haben.

Der gleiche statistische Trend ist im gesunden Zustand an Tag 180 für die IgG- und IgG-1-Antikörperantwort zu beobachten. Dabei ist dieser allerdings in der S-Gruppe stärker ausgeprägt als in der M-Gruppe.

Für die IgG-3-Antikörperantwort zeigt sich dagegen ein anderes Bild: hier weisen die Responder sowohl in der M- wie auch in der S-Gruppe höhere Reinfektionsraten als die Non-Responder auf. Wie ist das zu erklären ?

Blackman et al. stellten bei ihren Untersuchungen über das Antikörperverhalten gegen MSP-1 fest, dass einige Antikörper, die an das MSP-1<sub>19</sub> binden, den zweiten Prozessierungsschritt des MSP-1-Moleküls inhibieren können, wobei andere Antikörper, die an das gleiche Antigen binden, dies nicht können [Blackman et al., 1994]. Diese zweite Gruppe von Antikörpern konnte wiederum in zwei Untergruppen unterteilt werden: sogenannte „blockierende“ Antikörper und sogenannte „neutrale“ Antikörper. Dabei wurde entdeckt, dass die „blockierenden“ Antikörper das Binden der inhibierenden Antikörper an das Antigen blockieren. Dagegen interferieren die „neutralen“ Antikörper nicht mit der Bindung der inhibitorischen Antikörpern, haben aber gleichzeitig auch keinerlei biologischen Effekt bei Bindung an das Antigen [Holder et al., 1999]. Zudem konnte gezeigt werden, dass nicht nur der C-terminale Teil des MSP-1 ein Ziel für „blockierende Antikörper“ ist, sondern dass Antikörper gegen andere Teile des MSP-1 auch als „blockierende Antikörper“ agieren können [Patino et al., 1997]. Holder et al. schließen daraus, dass bei Vorliegen einer frühen Induktion von „blockierende“ Antikörper während einer Infektion, diese wahrscheinlich gegen die Aktion der sich erst nachfolgend entwickelnden inhibierenden Antikörper wirken.

Könnte es also sein, dass die gemessenen IgG-3-Antikörper an Tag 180 bei den Untersuchungskindern in dieser Studie zu einem größeren Anteil aus „blockierenden“ als inhibierenden Antikörpern bestehen ? Dadurch wäre der protektive Effekt der inhibierenden Antikörper "blockiert", und es würde sich eine höhere Reinfektionsrate ausbilden können.

Andererseits ist bekannt, dass die IgG-3-Antikörper nur eine Halbwertszeit von 8 Tagen besitzen [Ferrante und Rzepczyk, 1997]. Von daher kann davon ausgegangen werden, dass diejenigen Kinder, die sowohl in der M- als auch in der S-Gruppe IgG-3-Antikörper an Tag 180 besitzen, erst kurz vor Tag 180 eine Reinfektion durchgemacht haben müssen. Normalerweise aber sollte bei wiederholten Reinfektionen eher die IgG-1-Antikörperantwort dominieren. Könnte es demnach vielleicht auch sein, dass eine sich bei Reinfektion gegen das MSP-1<sub>19</sub> ausbildende IgG-3-Antikörperantwort hinweisend auf ein defizienteres Immunsystem ist, so dass es leichter zur Ausbildung von Reinfektionen kommen kann ? Eine weitere Abklärung durch zeitlich engmaschigere Kontrolluntersuchungen innerhalb der 1/95C-Studie wäre daher wünschenswert gewesen.

*Außerdem ist der starke Trend einer verlängerten Zeit bis zur ersten Reinfektion in der IgG-Responder-Gruppe gegenüber der IgG-Non-Responder-Gruppe zu verzeichnen.*

Dieses Ergebnis bestätigt die oben gemachten Beobachtungen.

### 4.3 Verlauf der MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-Antikörperantwort mit dem Alter

*In der vorliegenden Untersuchung liegt die IgG-Responderrate sowohl in der M- wie auch in der S-Gruppe in allen Altersklassen an Tag 0 und Tag 28 >80%. Im gesunden Zustand an Tag 180 bleibt die Responderrate mit >80% nur in der jüngsten Altersklasse – „0 bis 2 Jahre“ - erhalten, während sie in den beiden älteren Altersklassen – in den S-Gruppen statistisch signifikant - auf <80% absinkt. Dabei ist die Abnahme der Anzahl der Responder in der S-Gruppe wieder deutlich stärker ausgeprägt, als in der M-Gruppe.*

Eine altersabhängige Zunahme der IgG-Antikörperantwort wie sie bei Egan et al. und Riley et al. beschrieben wurde kann in dieser Arbeit nicht aufgezeigt werden [Egan et al., 1995; Riley et al., 1992]. Damit entspricht das in dieser Arbeit erhaltene Ergebnis eher den Beobachtungen von Dodoo et al., die ebenfalls in ihrer Untersuchungsgruppe keine Zunahme einer Antikörperantwort mit zunehmendem Alter beobachten konnten [Dodoo et al., 1999]. Bemerkenswert ist die an allen drei Untersuchungszeitpunkten konstant >80% bleibende Responderrate in der jüngsten Altersklasse „0 bis 2 Jahre“ sowohl in der M- wie S-Gruppe. Während im gesunden Zustand an Tag 180 die Responderrate in den älteren Altersklassen deutlich abfällt, bleibt sie in der jüngsten Altersklasse weiterhin >80%. Könnte diese Beobachtung bei den jüngsten Kindern noch mit dem Vorhandensein von maternalen Antikörpern erklärt werden? Diese können von der Mutter auf das Kind hauptsächlich im dritten Trimenon diaplazentar übertragen werden [Hogh et al., 1995]. Allerdings ist das jüngste Kind in der hier vorliegenden Untersuchungsgruppe 8 Monate. Normalerweise wird beobachtet, dass die passiv transferierten maternalen Antikörper hauptsächlich in den ersten Lebensmonaten präsent sind, um dann ab dem 6 Monat nur noch in geringerem Maße im kindlichen Organismus zu persistieren [Hogh et al., 1995; Hollingdale et al., 1989; Riley et al., 2000].

Branch et al. konnten 1998 bei Kindern in Kenia für das erste Lebensjahr eine *signifikante* Assoziation zwischen der Präsenz von IgG-Antikörpern gegen das MSP-1<sub>19</sub> und einem Schutz vor Malaria aufzeigen [Branch et al., 1998].

Oder könnte es sein, dass in diesen jüngsten Kindern der bei einer anderen Studie [Wipasa et al., 2001] für MSP-1<sub>19</sub>-spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen postulierte Apoptose-Mechanismus noch nicht in dem Maße ausgebildet ist, wie bei den älteren Kindern ? Bildet sich dieser Mechanismus womöglich erst durch sich wiederholende Infektionen aus ?

*Bei der IgG-1-Subklassen-Antwort weist in der akuten Phase an Tag 0 die höchste Altersklasse „älter als 4 Jahre“ mit >80% eine deutlich höhere Responderrate in der M- und S-Gruppe auf, als die beiden niedrigeren Altersklassen mit <80%. Dabei ist der Unterschied in der M-Gruppe zwischen der Altersgruppe „2 bis 4 Jahre“ und „älter als 4 Jahre“ statistisch signifikant. Der Unterschied in der Responderrate der M-Gruppe zwischen der Altersgruppe „0 bis 2 Jahre“ und „älter als 4 Jahre“ liegt an der Grenze zur Signifikanz.*

Bei der nach Altersklassen getrennten Untersuchung der Antikörperantwort der IgG-1-Subklasse fällt der Unterschied in der Responderrate zwischen der ältesten Altersklasse „älter als 4 Jahre“ und den beiden jüngeren Altersklassen mit den Kindern von 0 bis 4 Jahren auf: während die Kinder älter als 4 Jahre schon im akuten Zustand an Tag 0 eine Responderrate von >80% aufweisen, liegt die Responderrate bei den jüngeren Kinder deutlich – teilweise statistisch *signifikant* – niedriger. Erst an Tag 28 entsprechen sich die Responderraten mit >80% in allen Altersklassen. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass das Immunsystem der älter als 4-jährigen Kinder durch multiple Reinfektionen einen Status erreicht hat, in dem es sehr schnell auf eine Plasmodien-Infektion reagieren kann.

Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre, dass das Antigen nach dem Verschwinden der Merozoiten und des durch Zerstörung der Merozoiten freigesetzten Materials im lymphatischen Gewebe zurückgehalten und von langlebigen Antigen-präsentierenden Zellen - z.B. dendritische Zellen [Zinkernagel, 1996] – immer weiter präsentiert wird, so dass es zu einer andauernden Stimulation der betreffenden B-Zellen führt. Folglich bleiben die Antikörper-Spiegel hoch, obwohl keine Erreger mehr da sind. Dieser Mechanismus könnte um so besser ausgeprägt sein, je älter die Kinder und damit je ausgereifter das Immunsystem ist. Zu dieser Annahme würden die kontinuierlich

>80%ige Responderraten an allen Untersuchungstagen passen. Zur weiteren Abklärung müßte allerdings der Tag 0 der ersten auf die Untersuchung an Tag 180 folgenden Reinfektion mit in die Auswertung einbezogen werden. Diese Untersuchungen wurden aber nicht in der hier zugrunde liegenden Follow-up-Studie durchgeführt. Die Kinder der S-Gruppe zeigen dagegen das Phänomen der kontinuierlich >80%igen Responderrate nicht. Hier ist ein *signifikanter* Abfall der Responderrate von Tag 0 und Tag 28 auf Tag 180 zu verzeichnen, ähnlich wie auch in den beiden jüngeren Altersgruppen.

*Bei Vergleich der Responderraten der Untersuchungstage 0 und 180 bei der IgG-3-Subklassen-Antikörperantwort ist eine hoch signifikante Abnahme der Responder in der S-Gruppe der ältesten Altersklasse „älter als 4 Jahre“ zu verzeichnen, während in den beiden jüngeren Altersklassen ein Trend zur Zunahme der Responderrate in der S-Gruppe beobachtet werden kann. Während im gesunden Zustand die Responderraten der S-Gruppe in den beiden jüngeren Altersklassen bei um die 70% liegt, ist sie in der ältesten Altersklasse <20%. Die Responderrate der M-Gruppe liegt dabei an Tag 180 in der ältesten Altersklasse über der der S-Gruppe, während sie in den jüngeren Altersklassen deutlich unter denen der S-Gruppe liegt. Damit verhält sich die IgG-3-Antikörperantwort in den beiden jüngeren Altersklassen gegenläufig zu der der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort.*

*Beim Vergleich der IgG-1-Responderraten im akuten Zustand mit denen im gesunden Zustand ist für alle Altersgruppen eine teilweise statistisch signifikante Abnahme in der S-Gruppe zu verzeichnen, sowie eine ebenfalls teilweise statistisch signifikante Zunahme in der M-Gruppe in den beiden Altersgruppen „2 bis 4 Jahre“ und „0 bis 2 Jahre“. In der M-Gruppe der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ bleibt die Responderrate an Tag 180 auf gleich hohem Niveau wie an Tag 0.*

*Die IgG-3-Responderraten der S-Gruppe der Altersklassen „0 bis 2 Jahre“ und „2 bis 4 Jahre“ sind an Tag 180 signifikant höher als die der Altersklasse „älter als 4 Jahre“. Im akuten Zustand weist die S-Gruppe der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ mit einer Responderrate von 86% die höchste in dieser Arbeit gemessene Responderrate für die IgG-3-Antikörperantwort auf. Sie liegt damit signifikant höher als die der*

*entsprechenden M-Gruppe und ebenfalls signifikant höher als die Responderrate der S-Gruppe der Altersklasse „2 bis 4 Jahre“.*

*Insgesamt ist der Trend auszumachen, dass an allen Untersuchungstagen in allen Altersklassen in der M- und S-Gruppe die Responderraten niedriger als bei der IgG- und IgG-1-Antikörperantwort liegen. Während von Tag 28 auf Tag 180 in allen Altersklassen die Responderrate in der M-Gruppe und in der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ auch in der S-Gruppe signifikant abnimmt, nimmt sie in der S-Gruppe der Altersklassen „0 bis 2 Jahre“ und „2 bis 4 Jahre“ trendhaft zu.*

Die IgG-3-Antikörperantwort in den verschiedenen Altersklassen präsentiert sich sehr vielgestaltig. Die *signifikant* höhere IgG-3-Responderrate in der S-Gruppe der ältesten untersuchten Kinder gegenüber der M-Gruppe derselben Altersklasse und gegenüber der M- und S-Gruppen der jüngeren Altersgruppen ist auffällig. Die gemessenen Werte deuten darauf hin, dass eine IgG-3-Antikörperantwort im akuten Zustand keinen schützenden Effekt vor schwerer Malaria tropica aufweist. Sie ist vielleicht sogar vielmehr für eine Protektion hinderlich.

Während die M-Gruppe in der Altersklasse „älter als 4 Jahre“ im akuten Zustand eine hohe IgG-1-Antikörper-Responderrate aber eine niedrige IgG-3-Antikörper-Responderrate zeigt, weist die S-Gruppe derselben Altersklasse eine hohe IgG-1-Antikörper-Responderrate und eine hohe IgG-3-Antikörper-Responderrate auf. Nach der Studie von Holder et al. und anderen, können bei einer polyklonalen Antikörperantwort blockierende und inhibierende Antikörper gemeinsam auftreten [Holder et al., 1999]. Könnte die vorliegende Beobachtung somit ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die im akuten Zustand innerhalb der S-Gruppe bei einer größeren Anzahl von Respondern gebildeten IgG-3-Antikörper vielleicht zu einem höheren Anteil aus blockierender Antikörpern bestehen, so dass die protektiven Effekte der inhibierenden Antikörper dadurch verhindert werden? Holder et al. weisen in ihrer Untersuchung darauf hin, dass bei früher Induzierung blockierender Antikörper die Wirkung der nachfolgend gebildeten inhibierenden Antikörper blockiert wird. Sie empfehlen daher die genaue Untersuchung der Entwicklungs-Kinetik der verschiedenen Antikörper bei einer Antikörperantwort [Holder et al., 1999].

Der *signifikante* Abfall der IgG-, IgG-1- und IgG-3-Antikörperantwort in der S-Gruppe der ältesten Altersklasse von Tag 0 auf Tag 180 könnte wiederum Folge einer möglicherweise erhöhten Apoptose-Rate MSP-1<sub>19</sub>-spezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen innerhalb der schwer an Malaria tropica erkrankten Kinder sein. Der gleichzeitige Rückgang der Responderraten in beiden Subklassen kann dabei als verstärkendes Argument für obige Annahme angesehen werden. Zur weiteren Beurteilung müssten wiederum Blutproben für die Messungen der Antikörperantworten an Tag 0 der ersten Reinfektion nach Tag 180 vorliegen. Diese wurden aber in der 1/95C-Studie nicht erhoben.

Die gegenläufige Beobachtung in den beiden jüngeren Altersklassen der S-Gruppe könnte darauf hinweisen, dass in diesem frühen Lebensalter der spezifische Apoptose-Mechanismus noch gar nicht oder aber nur in sehr geringem Maße ausgebildet ist. Die in den S-Gruppen *signifikant* gegenüber den M-Gruppen erhöhte Reinfektionsrate [Lell et al., 1999] könnte damit für die zu beobachtende beständig hohe IgG-3-Antikörperantwort verantwortlich sein.

Der auffällige Unterschied im Antikörperantwortverhalten zwischen der ältesten Altersklasse „älter als 4 Jahre“ und den beiden jüngeren Altersklassen ist womöglich damit zu erklären, dass sich bei den ältesten Kindern das Immunsystem soweit ausgebildet und auf die Plasmodien-Infektion eingestellt hat, dass alle bisher aufgezeigten Immun-Mechanismen für den Wirt optimal miteinander wirken. Gupta et al. wiesen bei Untersuchungen in Kenia nach, dass sich Immunität gegen schwere nicht-cerebrale Malaria nach erfolgreichen infektiösen Stichen während der ersten und zweiten Infektion unabhängig von den Transmissionsraten entwickeln. Demnach hat sich eine Immunität gegen schwere Malaria mit dem Erreichen des 5. Lebensjahres nahezu vollständig ausgebildet [Gupta et al., 1999].

Allerdings wird in der Literatur die Assoziation zwischen der Transmissionsrate und der Zeitspanne bis zur Entwicklung einer Immunität vor schwerer Malaria tropica auch wie folgt beschrieben: in Regionen mit niedrigerer *Plasmodium falciparum*-Malariaendemizität oder einer unstablen Malariatransmission ist die Immunität der Bevölkerung gering, und klinische Malariaverläufe, wie auch schwere Komplikationen, können in allen Altersgruppen auftreten [Wildling et al., 1995]. In Regionen mit hohen Transmissionsrate sind dagegen schwere *Plasmodium falciparum*-Malaria-

Erkrankungen der Kinder wesentlich seltener [Snow, et al., 1997]. Als mögliche Erklärung wird angeführt, dass Säuglinge in diesen Regionen eine gesteigerte Exposition für Malariainfektionen aufweisen, während sie aber noch – wahrscheinlich über die maternalen Antikörper - vor der Krankheit geschützt sind [Slutsker et al., 1996; Kitua et al., 1996; Wagner et al., 1998]. Somit würden die Kinder aus dieser Zeit mit einem wesentlich höheren Immunitätsgrad gegenüber denjenigen aus den Gebieten mit niedrigerer Transmissionsrate hervorgehen.

Da sich die hier vorliegende Arbeit auf eine in einem Gebiet mit stabiler, hoher Transmissionsrate durchgeführte Studie bezieht, müßte demnach eine kürzere Zeitspanne bis zur Ausbildung eines protektiven Schutzes vor schwerer *Plasmodium-falciparum*-Malaria festzustellen sein. Dazu wäre jedoch eine vergleichende Untersuchung mit gepaarten Patienten aus einem Gebiet mit unstabiler, niedrigerer *Plasmodium falciparum*-Transmissionsrate durchzuführen.

#### **4.4 Zusammenhang der MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-Antikörperantwort mit Geschlecht, AB0-Blutgruppe, Sichelzellgen-Trägerschaft, MBL- und NOS-2-Mutation und Parasitämie**

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls statistische Vergleiche der gefundenen gegen MSP-1<sub>19</sub> gerichteten IgG-Antikörperwerte mit der Verteilung des Geschlechts, der AB0-Blutgruppenzugehörigkeit, der Sichelzellgen-Trägerschaft sowie der Trägerschaft der MBL- und NOS-2<sup>Lambaréné</sup>-Mutationsvariante und der gemessenen Parasitämie der Untersuchungskinder vorgenommen. Dabei konnten keine statistische *Signifikanzen* gefunden werden.

Damit können die Beobachtung von Egan et al, Riley et al und Shi et al., die in Kindern eine Assoziation zwischen dem Schutz vor Parasitämie und einer MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-Antikörperantwort aufzeigen [Egan et al., 1995; Riley et al., 1992; Shi et al., 1996], nicht bestätigt werden. Die Beobachtungen von Doodoo et al., die solch eine Assoziation ebenfalls nicht aufzeigen konnten, aber bestätigt werden [Doodoo et al, 1999].

Die in der hier vorliegenden Untersuchungsgruppe in vorherigen Studien gefundene positiv korrelierende Assoziation zwischen der IgG-Antikörperantwort auf Peptide aus der PfEMP-1-DBL-1-Region der parasitierten Erythrozyten und der Blutgruppe 0-Trägerschaft [Köhler, 2000] kann für das MSP-1<sub>19</sub> Antigen ebenfalls nicht beschrieben werden.

Auch Egan et al. konnten in ihrer Untersuchung in Gambia und Sierra Leone keine Assoziation zwischen dem Geschlecht oder der Sichelzellgen-Trägerschaft und der PfMSP-1<sub>19</sub> Antikörper-Prävalenz beobachten [Egan et al., 1996].

#### **4.5 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit auf Grundlage der in einem stabilen *Plasmodium falciparum*-Transmissionsgebiet durchgeführten 1/95C-Studie gezeigt werden, dass spezifisch gegen den konservierten C-terminalen Teil des Merozoiten-Oberflächenantigens MSP-1 – MSP-1<sub>19</sub> – gerichtete IgG-Antikörper während der Infektion mit *Plasmodium falciparum* von an Malaria tropica schwer und mild erkrankten gabunesischen Kinder gebildet werden. Dies geschieht mit einer hohen Responderrate von >80%, so dass von einer deutlichen Immunogenität des untersuchten Antigens ausgegangen werden kann. Damit steht die hier vorliegende Studie im Gegensatz zu ähnlichen Studien, die von Riley et al., Egan et al. und Doodoo et al. in den vergangenen Jahren durchgeführt wurden, und in denen eine wesentlich geringere Immunantwort von <40% beschrieben wird. Dabei scheint die spezifische Immunogenität hauptsächlich von den beiden epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen abzuhängen, die innerhalb des MSP-1<sub>19</sub> lokalisiert sind. Bei Vorhandensein beider epidermaler Wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen im präsentierten Antigen lag die höchste Immunogenität vor [Doodoo et al., 1999; Egan et al., 1996; Riley et al. 1992]. Lediglich Cavanagh et al. fanden eine Responderrate von 90%, wobei deren Untersuchung aber in einem Gebiet von mesoendemischer und unstabiler Malaria

durchgeführt wurde [Cavanagh et al., 1998]. Damit kann mit der hier vorliegenden Studie erstmals bei Kindern eine Responderrate mit >80% gegen MSP-1<sub>19</sub> in einem Gebiet mit stabiler *Plasmodium falciparum*-Transmission nachgewiesen werden.

Während die Responderrate im akuten Zustand innerhalb der schwer an Malaria tropica erkrankten Kinder höher liegt als in der Gruppe der nur mild erkrankten Kinder, wird in der hier vorliegenden Studie in der gesunden Phase bei den schwer an Malaria tropica erkrankten Kinder eine *signifikant* geringere MSP-1<sub>19</sub>-spezifische IgG- und IgG-1-Antikörperantwort als bei den nur mild an Malaria tropica erkrankten Kindern gefunden. Es bleibt zu diskutieren, ob diese Beobachtung eher nach Luty et al. zu interpretieren ist, der einen sich durch wiederholt hohe Antigenkonzentrationen entwickelnden Toleranz-Status des Immunsystems vorschlägt [Luty et al., 2000], oder aber ob vielleicht der bei Wipasa et al. beschriebene Apoptose-Mechanismus von MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der S-Gruppe dafür verantwortlich zu machen ist [Wipasa et al., 2001].

Weiterhin kann in der hier vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu Shi et al. kein Zusammenhang zwischen der IgG-Antikörperantwort auf das MSP-1<sub>19</sub> und der Höhe der Parasitämie gezeigt werden. Shi et al. wiesen in ihrer Studie eine Assoziation zwischen dem Schutz vor Parasitämie und den gegen das MSP-1<sub>19</sub> gerichteten IgG-1-Antikörpern nach [Shi et al., 1996].

Allerdings scheint in der hier vorliegenden Studie ein gewisser Schutz vor der Erkrankung an der schweren Form der Malaria tropica mit einem erhöhten IgG-1:IgG-3-Ratio-Wert assoziiert zu sein. In der Gruppe der nur mild an Malaria tropica erkrankten Kindern liegt der IgG-1:IgG-3-Ratio-Wert im gesunden Zustand *signifikant* höher als in der Gruppe der schwer an Malaria tropica erkrankten Kinder. Ob dieser Schutz womöglich über die bisher hauptsächlich bei Erwachsenen gezeigte Antikörper-abhängige zelluläre Hemmung (ADCI) [Bouharoun-Tayoun et al., 1990; Druilhe et al., 1997; Shi et al., 1999] vermittelt wird, ist weiter zu untersuchen.

Während Lell et al. für die gleiche Untersuchungsgruppe nachweisen konnten, dass die Kinder der S-Gruppe *signifikant* höhere Reinfektionsraten aufweisen, als diejenigen der

M-Gruppe [Lell et al., 1999], zeigt die hier vorliegende Arbeit zusätzlich eine negative Korrelation zwischen der Reinfektionsrate und der gemessenen Antikörperantwort während der Rekonvaleszenz, d.h. eine Antikörperproduktion gegen MSP-1<sub>19</sub> scheint in der Rekonvaleszenz unabhängig von der Schwere der Erkrankung einen schützenden Effekt vor erneuten Reinfektion zu haben. Im gesunden Zustand bleibt der gleiche statistische Trend für die IgG- und IgG-1-Antikörperantwort erhalten. Allerdings scheint dieser schützende Effekt keinerlei Auswirkung auf den Ausgang einer *Plasmodium falciparum*-Infektion zu haben. Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene genaue Differenzierung zwischen MSP-1<sub>19</sub>-spezifischer IgG-Antikörperantwort und Reinfektionsrate, sowie schwerem und mildem Krankheitsverlauf, wurde in den zum Vergleich herangezogenen Studien von Egan et al., Riley et al. und Dodo et al. nicht vorgenommen. Die Untersuchungen von Egan et al. und Riley et al. zeigen einen Schutz vor Malaria und hoher Parasitämie, Dodo et al. konnten dagegen keinerlei Assoziation zwischen den Antikörperspiegeln und einem Schutz vor Malaria feststellen. Dagegen konnte in der hier vorliegenden Studie im Einklang mit der Studie von Dodo et al. aber im Gegensatz zu den Beobachtungen von Egan et al., Riley et al. und Shi et al. keine altersabhängige Zunahme der IgG-Antikörperantwort beobachtet werden.

Für die IgG-3-Antikörperantwort zeigt sich dagegen in der vorliegenden Studie im gesunden Zustand eine höhere Reinfektionsrate in der S-Gruppe als in der M-Gruppe. Damit verhält sich die Reinfektionsrate hier genau gegenläufig zu den IgG- und IgG-1-Antikörperantworten. Diskutiert wurde, ob diese Beobachtung in Zusammenhang mit der von Holder et al. und anderen gemachten Beobachtung zu bringen ist, dass bei einer polyklonalen MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen Antikörperantwort neben inhibierenden auch blockierende und neutrale Antikörpern gebildet werden [Holder et al., 1999; Uthapibull et al., 2001]. Holder weist darauf hin, dass das Messen der totalen Antikörperantworten – auch das der Antigen- oder Epitop-spezifischen – keinerlei Hinweis auf die protektive Qualität der gemessenen Antikörper geben kann. Vielmehr bestimmt das Verhältnis der inhibitorischen zu den blockierenden Antikörpern das Ergebnis: Inhibition der Erythrozyteninvasion oder aber Erythrozyteninvasion. Sollte sich das Hervorbringen von blockierenden Antikörpern als ein sich zur Umgehung einer protektiven Immunantwort entwickelter Evasion-Mechanismus darstellen, so Holder, so kann davon

ausgegangen werden, dass diese Antikörper bestimmte Eigenschaften aufzeigen: sie werden mehr gegen konservierte als variable Epitope gerichtet sein, so dass Parasiten-Varianten, die nicht von den blockierenden Antikörpern erkannt werden, bevorzugt zerstört werden. Weiterhin zeigen sie wahrscheinlich eine hohe Immunogenität, werden bei der ersten Infektion induziert und werden früh im Leben präsent sein, wobei sie womöglich von der Mutter bereits transferiert werden.

Es bleibt zu diskutieren, ob das Phänomen der blockierenden Antikörper die Diskrepanzen zwischen den einzelnen Studien von Riley et al., Egan et al., Doodoo et al. und der hier vorliegenden Studie sowie die Unterschiede zwischen den schwer an Malaria tropica erkrankten Kindern und den nur mild erkrankten Kindern erklären kann.

Einen weiteren Hinweis dafür gibt die nach Altersklassen getrennte Analyse der in dieser Studie gemessenen Werte: im akuten Zustand wurde bei den ältesten Kinder eine *signifikant* höhere IgG-3-Responderrate in der S-Gruppe als in der M-Gruppe gefunden. Dies lässt erkennen, dass die *PfMSP-1<sub>19</sub>*-spezifischen IgG-3-Antikörper im akuten Zustand wohl keinen protektiven Effekt vor der Ausbildung von schwerer Malaria tropica aufweisen. Zudem konnte beobachtet werden, dass innerhalb der ältesten Altersklasse im akuten Zustand die M-Gruppe eine hohe IgG-1-Antikörper-Responderrate aber eine niedrige IgG-3-Antikörper-Responderrate zeigt, während die S-Gruppe eine hohe IgG-1-Antikörper-Responderrate und eine hohe IgG-3-Antikörper-Responderrate aufweist. Da davon ausgegangen werden kann, dass sich das Immunsystem in dieser Altersklasse bereits vollständig ausgebildet hat [Gupta et al., 1999], bleibt zu diskutieren, ob die *PfMSP-1<sub>19</sub>*-spezifischen IgG-3-Antikörper bei der hier vorliegenden Untersuchung womöglich hauptsächlich blockierende Antikörper beinhalten, die die wahrscheinlich protektiven *PfMSP-1<sub>19</sub>*-spezifischen IgG-1-Antikörper [Egan et al, 1995, Shi et al., 1996] blockieren. Uthaipibull et al. konnten bereits einigen von den blockierenden und inhibierenden Antikörpern erkannten *PfMSP-1<sub>19</sub>*-Epitopen spezifischen Lokalisationen innerhalb der Struktur des *PfMSP-1<sub>19</sub>* zuweisen [Uthaipibull et al., 2001].

Abschließend bleibt festzustellen, dass aus der Literatur zu erkennen ist, dass ein möglicher Mechanismus der Merozoiten-Neutralisation die Inhibition der MSP-1-Prozessierung darstellt [O'Donnell, 2001]. Dabei wird nach Holder und anderen die qualitative Spezifität der Antikörperantwort vor allem entscheidend sein. Ein Impfstoff basierend auf MSP-1<sub>19</sub> sollte demnach die Induktion von blockierenden Antikörpern minimieren und die von inhibierenden Antikörpern maximieren.

Das Verstehen der bei einer Vakzinierung induzierten Immunmechanismen wird daher für die Bewertung von Impfstoffkandidaten in Zukunft entscheidend sein. Es gilt generell die funktionelle Aktivität neben den Antikörperspiegeln zu bestimmen. Zudem bleibt es wichtig, die dreidimensionale Struktur zu beachten [Morgan et al., 1999].

In Bezug auf die hier vorgelegte Studie ist zukünftig eine Untersuchung auf das Verhältnis von inhibierenden versus blockierenden Antikörpern in den beiden Untersuchungsgruppen in einer Nachfolgestudie durchzuführen.

Insgesamt ist von einem multifunktionellen Zusammenspiel aller erwähnten Immun-Mechanismen auszugehen. Zu erhellen bleibt, ob sich diese jeweils in den beiden Untersuchungsgruppen ergänzen oder gegenseitig aufheben. Zudem bleibt der Zeitpunkt der vollständigen Ausbildung dieser Immun-Mechanismen zu bestimmen. Möglicherweise angeborene Resistenzmechanismen, die die protektiven Effekte einer erhöhten IgG-Antikörperantwort modifizieren oder überlagern könnten, sind dabei zu beachten [Stirnadel et al., 2000].

## 5 Zusammenfassung

Malaria ist eine Infektionskrankheit, die beim Menschen durch verschiedene Arten von Plasmodien ausgelöst wird. Die weitaus meisten Infektionen werden weltweit durch *Plasmodium falciparum* verursacht, dem Erreger der Malaria tropica, der sowohl die schwersten als auch meisten tödlichen Verlaufsformen verursacht. Nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation beträgt die jährliche Inzidenz der Malaria weltweit 300-500 Millionen klinischer Fälle, von denen mehr als 1 Million tödlich verlaufen.

Die Immunantwort beim Menschen während einer Malaria umfasst sowohl zelluläre als auch humorale, spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen. Klinisch relevant ist dabei vor allem die gegen die Krankheit verursachenden ungeschlechtlichen Blutstadien gerichtete Immunität. Die durch die Malaria beim Wirt ausgelöste Immunantwort dient der Kontrolle der Vermehrung und letztlich der Elimination der Parasiten, trägt wahrscheinlich aber auch maßgeblich zur Pathologie der Erkrankung bei. Dabei wird die humorale Immunität durch spezifisch gegen Plasmodienantigene gebildete Antikörper vermittelt. Diese Plasmodienantigene sind u.a. auf der Oberfläche der Merozoiten lokalisiert. Eines der dort exprimierten Proteine ist das *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 - PfMSP1, das u.a. für die Erythrozyten-Invasion verantwortlich gemacht wird.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die IgG-Antikörperantwort und die Antikörperantwort der Subklassen IgG-1 und IgG-3 auf den 19 kDa konservierten C-terminalen Teil des MSP-1 – MSP-1<sub>19</sub> - von 200 afrikanischen Kindern gemessen, die von 1995-1996 in Lambaréné, Gabun, am Albert-Schweitzer-Hospital – ein für Malaria tropica hochendemisches Gebiet - in eine Studie aufgenommen wurden. Dabei schloss die Studie je 100 Kinder mit schwerer Malaria, sowie 100 Kinder mit einer leichten Verlaufsform der Infektion, gepaart nach Alter und Geschlecht, ein. Zur Bestimmung der Antikörperwerte fanden venöse Blutentnahmen der Patienten bei Aufnahme in die Studie – Tag 0, nach 28 Tagen und nach vollständiger Gesundung - frühestens 180 Tage nach Aufnahme in die Studie, statt. Die Bestimmung der spezifischen

Antikörperantworten erfolgte mittels des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA nach dessen Optimierung. Es wurde dabei der Einfluss von verschiedenen Parametern auf diese Antikörperantworten untersucht, u.a. der Einfluss des Alters, der Parasitämie und der Reinfektionsrate.

Mit der vorliegenden Untersuchung kann erstmals gezeigt werden, dass in einem stabilen *Plasmodium falciparum*-Malariatransmissionsgebiet in mehr als 80% der von an Malaria tropica schwer und mild erkrankten gabunesischen Kinder spezifische IgG-Antikörper gegen MSP-1<sub>19</sub> während der Infektion mit *Plasmodium falciparum* gebildet werden. Eine altersabhängige quantitative Zunahme ist dabei nicht zu beobachten.

Zwischen der gemessenen MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-Antikörperantwort und der Reinfektionsrate kann eine negative Korrelation aufgezeigt werden, die aber keinen schützenden Effekt vor der Schwere der Ausbildung einer *Plasmodium falciparum*-Infektion aufweist.

Im parasitenfreien Zustand ist die Responderrate der MSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG- und IgG-1-Antikörperantwort in der Gruppe der mild an Malaria tropica erkrankten Kinder höher als die in der Gruppe der schwer an Malaria tropica erkrankten Kinder. Letztere Gruppe zeigt im parasitenfreien Zustand nach einer akuten Infektion eine deutliche IgG- und IgG-1-Responderratenabnahme.

Bei einem Vergleich der IgG-1- und IgG-3-Subklassen-Antikörperantworten kann eine Assoziation zwischen einem erhöhten IgG-1:IgG-3-Ratio-Wert und Schutz vor der Erkrankung an der schweren Form der Malaria tropica beobachtet werden.

Insgesamt weist die vorliegende Untersuchung darauf hin, dass die PfMSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-3-Antikörper im Gegensatz zu den PfMSP-1<sub>19</sub>-spezifischen IgG-1-Antikörpern bei Kindern keinen protektiven Effekt vor der Ausbildung von schwerer Malaria tropica zeigen. Vielmehr können Protektions-blockierende Eigenschaften vermutet werden. Die dafür verantwortlich zu machenden Immunmechanismen bleiben aufzuklären.

## 6 Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

Neben Standardabkürzungen wurden hauptsächlich international gebräuchliche SI-Einheiten verwendet.

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATS	Acid terminal Sequenz
AU	Arbitrary Units
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster Determinants
CP	Carbonate-Puffer
CSP	Circumsporozoite Protein
DBL	Duffy-Binding-Like
DDT	Dichlor-diphenyl-trichlor-äthan (Chlorohenotan)
EGF	Epidermal Growth Factor
EIA	Enzymimmunassays
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
Fab	Fragment Antigen Binding
Fc	Fragment Crystalline
g	Gramm
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GST	Glutathion-S-Transferase
Hb	Hämoglobin
Hb-S	Sichelzellanämie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IDR	Incidence Density Rate (Infektionsrate)
IgG	Immunglobulin G
IgG1	Immunglobulin G, Subklasse 1

IgG2	Immunglobulin G, Subklasse 2
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
µl	Mikroliter
M	Molarität
MBL	Mannose-bindendes-Lectin
M-Kinder	Kinder mit milder (unkomplizierter) <i>Plasmodium falciparum</i> Malaria
mM	Millimolar
MSP	Merozoite Surface Protein
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOS2	Stickstoffmonoxid-Synthase-2
OD	Optische Dichte
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
pH	pondus Hydrogenii – negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RIA	Radioimmunassay
ROS	Reactive Oxygen Species
SD	Standard Deviation
S-Kinder	Kinder mit schwerer <i>Plasmodium falciparum</i> Malaria
Tab.	Tabelle
TM	Transmembrandomäne
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
WHO	World Health Organisation

## 7 Literaturverzeichnis

**Adams, J.H., Hudson, D.E., Torii, M., Ward, G.E., Wellems, T.E., Aikawa, M., Miller, L.H. (1990)**

The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites.

Cell. 63, 141-153

**Adams, J.H., Sim, B.K., Dolan, S.A., Fang, X., Kaslow, D.C., Miller, L.H. (1992)**

A family of erythrocyte binding proteins in malaria parasites.

Proc Natl Acad Sci USA. 89, 7085-7089

**Afari, E.A., Appawu, M., Dunyo, S., Baffoe-Wilmot, A., Nkrumah, F.K. (1995)**

Malaria infection, morbidity and transmission in two ecological zones in southern Ghana.

Afr J Health Sci. 2, 312-316

**Aikawa, M. (1988)**

Human cerebral malaria.

Am J Trop Med Hyg. 39, 3-10

**Aikawa, M., Atkinson, C.T. (1990)**

Immunoelectron microscopy of parasites.

Adv Parasitol. 29, 151-214

**Al-Yaman, F., Genton, B., Kramer, K.J., Chang, S.P., Hui, G.S., Baisor, M., Alpers, M.P. (1996)**

Assessment of the role of naturally acquired antibody levels to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in protecting Papua New Guinean children from malaria morbidity.

Am J Trop Med Hyg. 54, 443-448

**Anonym (1992)**

Editorial. Rediscovering wormwood, qinghaosu for malaria.

Lancet. 339, 649-651

**Anonymus (1990)**

Exchange transfusion in *falciparum* malaria.

Lancet. 335, 324-325

**Aribot, G., Rogier, C., Sarthou, J.L., Trape, J.F., Balde, A.T., Druilhe, P., Roussillon, C. (1996)**

Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, West Africa).

Am J Trop Med Hyg. 54, 449-457

- Barnish, G., Maude, G.H., Bockarie, M.J., Greenwood, B.M. (1994)**  
Malaria in a rural area of Sierra Leone. III: Vector ecology and disease transmission.  
Ann Trop Med Parasitol. 88, 251-262
- Bathurst, I.C., Gibson, H.L., Kansopon, J., Hahm, B.K., Green, K.M., Chang, S.P. (1993)**  
An experimental vaccine cocktail for *Plasmodium falciparum* malaria.  
Vaccine. 11, 449-456
- Blackman, M.J., Heidrich, H.G., Donachie, S., McBride, J.S., Holder, A.A. (1990)**  
A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies.  
J Exp Med. 172, 379-382
- Blackman, M.J., Ling I.T., Nicholls, S.C., Holder, A.A. (1991)**  
Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains.  
Mol Biochem Parasitol. 49, 29-34
- Blackman, M.J., Holder, A.A. (1992)**  
Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP1<sub>33</sub> as a noncovalently associated complex with other fragments of MSP1.  
Mol Biochem Parasitol. 50, 307-316
- Blackman, M.J., Scott, F.T., Shai, S., Holder, A.A. (1994)**  
Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein.  
J Exp Med. 180, 389-393
- Bouharoun-Tayoun, H., Attanath, P., Sabchareon, A., Chongsuphajaisiddhi, T., Druilhe, P. (1990)**  
Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes.  
J Exp Med. 172, 1633-1641
- Bouharoun-Tayoun, H., Druilhe, P. (1992)**  
*Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity.  
Infect Immun. 60 (4), 1473-1481
- Bouharoun-Tayoun, H., Oouvray, C., Lunel, F., Druilhe, P. (1995)**  
Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages.  
J Exp Med. 182, 409-418

**Boyle, D.B., Newbold, C.I., Smith, C.C., Brown, K.N. (1982)**

Monoclonal antibodies that protect in vivo against *Plasmodium chabaudi* recognize a 250,000-dalton parasite polypeptide.

Infect Immun. 38, 94-102

**Bradley, D.J., Newbold, C.I., Warrell, D.A. (1990)**

Malaria, 587-620

in: Warrell, D.A.: Infektionskrankheiten: Lehrbuch

VCH, 1990, Weinheim, Basel, Cambridge, New York

**Branch, O.H., Udhayakumar, V., Hightower, A.W., Oloo, A.J., Hawley, W., Nahlen, B.L., Bloland, P.B., Kaslow, D.C., Lal, A.A. (1998)**

A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19 kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: association with febrile illness, parasitaemia and anaemia.

Am J Trop Med Hyg. 58, 211-219

**Bray, R. und Sinden, R. (1979)**

The sequestration of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in the placenta.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 73, 716-719

**Brinkmann, U., Brinkmann, A. (1991)**

Malaria and health in Africa: the present situation and epidemiological trends.

Trop Med Parasitol. 42, 204-213

**Brown, A., Pal, R. (1971)**

Insecticide resistance in arthropods.

2<sup>nd</sup> ed., Monograph Series No. 38, WHO, Genf

**Brown, K.N. (1982)**

Seiten 171-196

in: Chandra, R.K.: Critical Reviews in Tropical Medicine.

Vol. I, Plenum Press, New York

**Brown, K., Berzins, K., Jarra, W., Schettters, T. (1986)**

Immune responses to erythrocytic malaria.

Clin Immunol Allergy. 6, 227-249

**Brown, K.N., Brown, I.N. (1995)**

Immunity to malaria: antigenic variation in chronic infections of *Plasmodium knowlesi*.

Nature. 208, 1286-1288

**Burghaus, P.A., Holder A.A. (1994)**

Expression of the 19-kilodalton Carboxy-terminal fragment of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in *Escherichia coli* as a correctly folded protein.

Mol Biochem Parasitol. 64, 165-169

**Burghaus, P.A., Welde, B.T., Hall, T., Richards, R.L., Egan, A.F., Riley E.M., Ballou, W.P., Holder, A.A. (1996)**

Immunization of *Aotus nancymai* with recombinant C terminus of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in liposomes and alum adjuvant does not induce protection against a challenge infection.

Infect Immun. 64, 3614-3619

**Burmester, G.R., Pezzutto, A. (1998)**

Taschenatlas der Immunologie.

1.Aufl., Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York

**Butcher, G.A. (1992)**

HIV and malaria: a lesson in immunology.

Parasitol Today. 8, 307-311

**Butler, D. (1997)**

Time to put malaria control on the global agenda.

Nature. 386, 535-540

**Cavanagh, D.R., Elhassan, I.M., Roper, C., Robinson, V.J., Giha, H., Holder, A.A., Hviid, L., Theander, T.G., Arnot, D. E., McBride, J.S. (1998)**

A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan.

J Immunol. 161, 347-359

**Chang, S.P., Kramer, K.G., Yamaga, K.M., Kato, A., Case, S.E., Siddiqui, W.A. (1988)**

*Plasmodium falciparum*: gene structure and hydrophobicity profile of the major merozoite surface antigen (gp195) of the Uganda-Palo Alto isolate.

Exp Parasitol. 67, 1-11

**Chang, S.P., Gibson, H.L., Leeng, C.T., Barr, Hui, G.S.N. (1992)**

A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth.

J Immunol. 149, 548-555

**Chang, S.P., Case, S.E., Gosnell, W.L., Kramer, K.J., Tam, L.Q., Hashiro, C.Q., Nikaido, C.M., Gibson, H.L., Lee-Ng, C.T., Barr, P.J., Yokota, B.T., Hui, G.S.N. (1996)**

A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria.

Infect Immun. 64, 253-261

**Chappel, J.A., Holder, A.A. (1993)**

Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1.

Mol Biochem Parasitol. 60, 303-312

**Chappel, J.A., Egan, A.F., Riley, E.M., Druilhe, P., Holder, A.A. (1994)**

Naturally acquired human antibodies which recognize the first epidermal growth factor-like module in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 do not inhibit parasite growth in vitro.

Infect Immun. 62, 4488-4494

**Cheng, Q., Jones, G., Liu, E.X., Kidson, C., Saul, A. (1991)**

Identification of a common *Plasmodium* epitope (CPE) recognised by a pan-specific inhibitory monoclonal antibody.

Mol Biochem Parasitol. 49, 73-82

**Clark, I.A., Al Yaman, F.M., Jacobson, L.S. (1997)**

The Biological Basis of Malarial Disease.

Int J Parasitology. 27, 1237-1249

**Cohen, S., McGregor, I.A., Carrington, S. (1961)**

Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria.

Nature. 192, 733-737

**Colwell, W.T., Brown, V., Christie, P., Lange, J., Reece, C., Yamamoto, K., Henry, D.W. (1972)**

Antimalarial arylaminopropanols.

J Med Chem. 15, 771-775

**Conway, D.J., Rosario, V., Oduola, A.M.J., Salako, L.A., Greenwood, B.M., McBride, J.S. (1991)**

*Plasmodium falciparum*, intragenic recombination and non-random associations between polymorphic domains of the precursor to the major merozoite surface antigens.

Exp Parasitol. 73, 469-480

**Conway, D.J., Cavanagh, D.R., Tanabe, T., Roper, C., Mikes, Z.S., Sakihama, N., Bojang, K.A., Oduola, M.J., Kremsner, P.G., Arnot, D.E., Greenwood, B.M., McBride, J.S. (2000)**

A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses.

Nature medicine. 6, 689-692

**Cooper, J.A., Cooper, L.T., Saul, A.J. (1992)**

Mapping of the region predominantly recognized by antibodies to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA 1.

Mol Biochem Parasitol. 51, 301-312

**Cooper, J.A. (1993)**

Merozoite surface antigen-I of *Plasmodium*.

Parasitol Today. 9, 50-54

**Cox, F.E. (1974)**

Vaccination against malaria.

Nature. 252, 268**Dafa`alla, T.H., Ghalib, H.W., Abdelmageed, A., Williams, J. H. (1992)**

The profile of IgG and IgG subclasses of onchocerciasis patients.

Clin Exp Immunol. 88, 258-263**Daly, T.M., Long, C.A. (1993)**A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice.Infect Immun. 61, 2462-2467**Daly, T.M., Long, C.A. (1995)**

Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria.

J Immunol. 155, 236**Diallo, T.O., Spiegel, A., Diouf, A., Perraut, R., Kaslow, D.C., Garraud, O. (2001)**Short report: IgG1/IgG3 antibody responses to various analogs of recombinant yPfMSP1<sub>19</sub> – A study in immune adults living in areas of *Plasmodium falciparum* transmission.Am J Trop Med Hyg. 64, 204-206**Diggs, C.L., Ballou, W.R., Miller, L.H. (1993)**

The major merozoite surface protein as a malaria vaccine target.

Parasitol Today. 9, 300-302**Dodoo, D., Theander, T.G., Kurtzhals, J.A.L., Koram, K., Riley, E., Akanmori, B.D., Nkrumah, F.K., Hviid, L. (1999)**Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria.Infect Immun. 67, 2131-2137**Dönges, J. (1988)**

Parasitologie.

2. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York

**Druilhe, P., Perignon, J.L. (1997)**

A hypothesis about the chronicity of malaria infection.

Parasitol Today. 13, 353-357**Ebbell, B. (1937)**

The Papyrus Ebers.

Levin &amp; Munksgaard, Copenhagen

**Egan, A.F., Chappel, J.A., Burghaus, P.A., Morris, J.S., McBride, Holder, A.A., Kaslow, D.C., Riley, E.M. (1995)**

Serum antibodies from Malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP1<sub>19</sub>, the carboxyl-terminal fragment of the major merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum*.

Infect Immun. 63, 456-466

**Egan, A.F., Morris, J., Barnish, G., Allen, S., Greenwood, B.M., Kaslow, D.C., Holder, A.A., Riley, E.M. (1996)**

Clinical Immunity to *Plasmodium falciparum* Malaria is Associated with Serum Antibodies to the 19-kDa C-Terminal Fragment of the Merozoite Surface Antigen, PfMSP-1.

J Infect Dis. 173, 765-769

**Egan, A.F., Burghaus, P.A., Druilhe, P., Holder, A.A., Riley, E.M. (1999)**

Human antibodies to the 19 kDa fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro.

Parasite Immunol. 21, 133-139

**English, M., Marsh, K. (1997)**

Childhood Malaria – pathogenesis and treatment.

Curr Op Inf Dis. 10, 221-225

**Engvall, E., Perlmann, P. (1972)**

Enzyme-linked-immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.

J Immunol. 109, 129-135

**Epstein, N., Miller, L.H., Kaushel, D.C., Udeinya, I.J., Rener, J., Howard, R.J., Asofsky, R., Aikawa, M., Hess, R.L. (1981)**

Monoclonal antibodies against a specific surface determinant on malarial (*Plasmodium knowlesi*) merozoites block erythrocyte invasion.

J Immunol. 127, 212-217

**Etlinger, H.M., Caspers, P., Matile, H., Schoenfeld, H.J., Stueber, D., Takacs, B. (1991)**

Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with *Plasmodium falciparum*.

Infect Immun. 59, 3498-3503

**Feldkamp, C.S. (1992)**

Evaluation and clinical validation of immunoassays, 83-109

in: Nakamura RM., Kashara Y., Rechnitz GA., eds.: Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990s; Detroit, Michigan

**Ferrante, A., Rzepczyk, C.M. (1997)**

Atypical IgG Subclass Antibody Responses to *Plasmodium falciparum* Asexual Stage Antigens.

Parasitol Today. 13 (4), 145-148

**Früh, K., Doumbo, O., Müller, H.M., Koita, O., McBride, J., Crisanti, A., Toure, Y., Byjard, H. (1991)**

Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* is strain specific and short-lived.

Infect Immun. 59, 1319-1324

**Fujioka, H. und Aikawa, M. (1999)**

The Malaria Parasite and its Life-cycle, 19-56

in: Mats Wahlgren und Peter Perlmann: Malaria – Molecular and Clinical Aspects; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands

**Gabaldon, A. (1969)**

Global eradication of malaria: Changes of strategy and future outlook.

Am J Trop Med Hyg. 18, 641-656

**Galinski, M.R., Medina, C.C., Ingravallo, P., Barnwell, J.W. (1992)**

A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites.

Cell. 69, 1213-1226

**Garnham, P.C.C. (1967)**

Reflections on Laveran, Marchiafava, Golgi, Koch and Danilewski after sixty years.

Roy Soc Trop Med Hyg. 61, 753-764

**Gerold, P., Schofield L., Blackman, M.J., Holder, A.A., Schwarz, R.T. (1996)**

Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface protein-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*.

Mol Biochem Parasitol. 75, 131-143

**Golgi, C. (1885)**

Sulla infezione malarica.

G Acad Med Torino. 33, 733

**Graninger, W., Thalhammer, F., Hollenstein, U., Zotter, G., Kremsner, P.G. (1992)**

Serum protein concentrations in *Plasmodium falciparum* malaria.

Acta Trop. 52, 121-128

**Greenwood, B.M., Bradley, A.K., Greenwood, A.M., Byass, P., Jammeh, K., Marsh, K., Tulloch, S., Oldfield, F.S., Hayes, R. (1987)**

Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 81, 478-486

**Greenwood, B., Marsh, K., Snow, R. (1991)**

Why Do Some African Children Develop Severe Malaria ?  
Parasitol Today. 7, 277-281

**Guevara Patino, J.A., Holder, A.A., McBride, J.S., Blackman, M.J. (1997)**

Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies.  
J Exp Med. 186, 1689-1699

**Gupta, S., Trenholme, K., Anderson, R.M., Day, K.P. (1994)**

Antigenic diversity and the transmission dynamics of *Plasmodium falciparum*.  
Science. 263, 961-963

**Gupta, S., Snow, R.W., Donnelly, R.W., Newbold, C.N. (1999)**

Acquired immunity and post-natal clinical protection in childhood cerebral malaria.  
Proc R Soc. 266, 33-38

**Gysin, J., Hommel, M., Pereira da Silva, L. (1980)**

Experimental infection of the squirrel monkey (*Saimiri sciareus*) with *Plasmodium falciparum*.  
J. Parasitol. 66, 1003-1009

**Hadley T.J., Klotz, F.W., Miller L.H., (1986)**

Invasion of erythrocytes by malaria parasites: cellular and molecular overview.  
Ann Rev Microbiol. 40, 451-477

**Haworth, J. (1988)**

The global distribution of malaria and the present control effort, 1384-1386  
in: Wernsdorfer, W., McGregor, I.: Malaria: principles and practice of malariology;  
Churchill Livingstone, Edinburgh

**Helmby, H., Cavelier, L., Pettersson, U., Wahlgren, M. (1993)**

Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface.  
Infect Immun. 61, 284-288

**Helmby, H., Jonsson, G., Troye-Blomberg, M. (2000)**

Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS.  
Infect Immun. 68, 1485-1490

**Hill, A.V. (1992)**

Malaria resistance genes: a natural selection.  
Trans R Soc Trop Med Hyg. 86, 225-226

**Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J., Greenwood, B.M. (1991)**

Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria.

Nature. 352, 595-600

**Hirunpetcharat, C., Tian, J.H., Kaslow, D.C., van Rooijen, N., Kumar, S., Berzofsky, J.A., Miller, L.H., Good, M.F. (1997)**

Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1<sub>19</sub>) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4<sup>+</sup> T cells.

J Immunol. 159, 3400-3411

**Hirunpetcharat, C., Stanistic, D., Liu, X.Q., Vadolas, J., Strugnell, R.A., Lee, R., Miller, L.H., Kaslow, D.C., Good, M.F. (1998)**

Intranasal immunization with yeast-expressed 19-kD carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 (yMsp1<sub>19</sub>) induces protective immunity to blood stage malaria infection in mice.

Parasite Immunol. 20, 413-420

**Ho, M., Webster, H.K., Looareesuwan, S., Supanaranond, W., Phillips, R.E., Chanthavanich, P., Warrell, D.A. (1986)**

Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to *Plasmodium falciparum*.

J Infect Dis. 153, 763-771

**Hogh, B., Marbiah, N.T., Burghaus, P.A., Andersen, P.K. (1995)**

Relationship between Maternally Derived Anti-*Plasmodium falciparum* Antibodies and Risk of Infection and Disease in Infants Living in an Area of Liberia, West Africa, in which Malaria is Highly Endemic.

Infect Immun. 63, 4034-4038

**Holder, A.A. (1988)**

The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity.

Prog Allergy. 41, 72-97

**Holder, A.A. (1994)**

Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion.

Parasitology. 108 (Suppl.), 5-18

**Holder, A.A. (1996)**

Preventing merozoite invasion of erythrocytes, 77-104

in: Hoffmann, S.L.: Malaria Vaccine Development: a multi-immune response approach.

Washington, DD: American Society for Microbiology

**Holder, A.A., Freeman, R.R. (1981)**

Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens.

Nature. 294, 361-364

**Holder, A.A., Freeman, R.R. (1984)**

The three major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight precursor.

J Exp Med. 160, 624-629

**Holder, A.A., Lockyer, M.J., Odlink, K.G., Sandhu, J.S., Riveros-Moreno, V., Nicholls, S.C., Hillman, Y., Davey, L.S., Tizard, M.L.V., Schwartz, R.T., Freeman, R.R. (1985)**

Primary structure of the precursor of the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites.

Nature. 317, 270-273

**Holder, A.A., Sandhu, J.S., Hillman, Y., Davey, L.S., Nicholls, S.C., Cooper, H., Lockyer, M.J. (1987)**

Processing of the precursor to the major merozoite antigens of *Plasmodium falciparum*.

Parasitology. 94, 199-208

**Holder, A.A., Freeman, R.R., Nicholls, S.C. (1988)**

Immunization against *Plasmodium falciparum* with recombinant polypeptides produced in *Escherichia coli*.

Parasite Immunol. 10, 607-617

**Holder, A.A., Blackman, M.J., Burghaus, P.A., Chappel, J.A., Ling, I.T., McCallum-Deighton, N., Shai, S. (1992)**

A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function.

Mem Inst Oswaldo Cruz. 87, Suppl. III, 37-42

**Holder, A.A., Patino, J.A.G., Uthaipibull, C., Syed, S.E.H., Ling, I.T., Scott-Finnigan, T., Blackman, M.J. (1999)**

Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria.

Parasitologia. 41, 409-414

**Hollingdale, M.R., Hogg, B., Petersen, E., Wirtz, R.A., Bjorkman, A. (1989)**

Age-dependent occurrence of protective anti-*Plasmodium falciparum* sporozoite antibodies in a holoendemic area of Liberia.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 83, 322-324

**Hughes, A.L. (1992)**

Positive selection and interallelic recombination at the merozoite surface antigen-1 (MSA-1) locus of *Plasmodium falciparum*.

Mol Biol Evol. 9, 381-393

**Hui, G.S.N., Siddiqui, W.A. (1987)**

Serum from Pf195 protected Aotus monkeys inhibit *Plasmodium falciparum* growth in vitro.

Exp Parasitol. 64, 519-522

**Hui, G.S.N., Tam, L.Q., Chang, S.P., Case, S.E., Hashiro, C., Siddiqui, W.A., Shiba, T., Kusumoto, S., Kotani, S. (1991)**

Synthetic low-toxicity muramyl dipeptide and monophosphoryl lipid A replace Freund complete adjuvant in inducing growth-inhibitory antibodies to the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein, gp195.

Infect Immun. 59, 1585-1591

**Jakobsen, P.H., Bate, C.A., Taverne, J., Playfair, J.H. (1995)**

Malaria: toxins, cytokines and disease.

Parasite Immunol. 17, 223-231

**Jeffrey, G.M., Gibon, F.D. (1966)**

Studies on chloroquine-resistance of *Plasmodium falciparum* in Upper Volta and Liberia, West Africa.

Bull WHO. 35, 441-449

**Jeffrey, H.C., Leach, R.M. (1975)**

Atlas of Medical Helminthology and Protozoology.

2. Aufl., Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York

**Kaneko, O., Kimura, M., Kawamoto, F., Ferreira, M.U., Tanabe, K. (1997)**

*Plasmodium falciparum*: allelic variation in the merozoite surface protein 1 gene in wild isolates from southern Vietnam.

Exp Parasitol. 86, 45-57

**Kang, Y., Long, C.A. (1995)**

Sequence heterogeneity of the C-terminal, Cys-rich region of the merozoite surface protein-1 (MSP-1) in field samples of *Plasmodium falciparum*.

Mol Biochem Parasitol. 73, 103-110

**Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M. (1998)**

Medizinische Mikrobiologie.

9. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

**Kemeny, D.M. (1994)**

ELISA.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

**Kitua, A.Y., Smith, T., Alonso, P.L., Masanja, H., Urassa, H., Menendez, C., Kimario, J., Tanner M. (1996)**

*Plasmodium falciparum* malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission.

Trop Med Int Health. 1, 475-484

**Köhler, C. (2000)**

Antikörperantwort gegen konservierte Regionen des variablen Antigens *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1.

Biologische Diplomarbeit, Universität Tübingen

**Kremsner, P.G., Zotter, G.M., Feldmeier, H., Graninger, W., Rocha, R.M., Wiedermann, G. (1988)**

A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated malaria in Acre, Brazil.

J Infect Dis. 158, 1368-1371

**Kremsner, P.G., Winkler, S., Brandts, C., Neifer, S., Bienzl, U., Graninger, U. (1994)**

Clindamycin in combination with chloroquine or quinine is an effective therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children from Gabon.

J Infect Dis. 169, 467-470

**Kremsner, P.G., Radloff, P., Metzger, W., Wildling, E., Mordmüller, B., Philipps, J., Jenne, L., Nkeyi, M., Prada, J., Bienzle, U., Graninger, W. (1995)**

Quinine plus clindamycin improves chemotherapy of severe malaria in children.

Antimicrob Agents Chemother. 39, 1603-1605

**Kretschmer, H., Bienzle, U., Klauß, V., Kremsner, P.G., Leichsenring, M. (1996)**

Malaria, 134-163

in: Knobloch, J.: Tropen- und Reisemedizin

1. Aufl., Gustav-Fischer Verlag, Jena

**Kumar, A., Arora, R., Kaur, P., Chauhan, V.S., Sharma, P. (1993)**

„Universal“ T helper cell determinants enhance immunogenicity of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen peptide.

J Immunol. 148, 1499-1505

**Kumar, S., Yadava, A., Keister, D.B., Tian, J.H., Ohl, M., Perdue Greenfield, K.A., Miller, L.H., Kaslow, D.C. (1995)**

Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys.

Mol Med. 1, 325-332

**Kun, J.F.J., Mordmüller, B., Lell, B., Lehmann, L.G., Luckner, D., Kremsner, P.G. (1998a)**

Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria.

Lancet. 351, 265-266

**Kun, J.F.J., Schmidt-Ott, R.J., Lehman, L.G., Lell, B., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Kremsner, P.G. (1998b)**

Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambaréné, Gabon.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 92, 110-114

**Kwiatkowski, D. (1992)**

Malaria: becoming more specific about non-specific immunity.

Curr Opin Immunol. 4, 425-431

**Lang, W. (2000)**

Malaria, 19-22

in: Lang, W. und Löscher, T.:Tropenmedizin in Klinik und Praxis.

3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

**Laveran, A. (1881)**

De la nature parasitaire des accidents de l'impaludisme.

C R Acad Sciences Paris. 93, 627-632

**Laveran, A. (1884)**

Traité de fièvres palustres.

Doin., Paris

**Lell, B., May, J., Schmidt-Ott, R.J., Lehman, L.G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Schmid, D., Herbich, K., Mockenhaupt, F.P., Meyer, C.G., Bienzle, U., Kremsner, P.G. (1999)**

The Role of Red Blood Cell Polymorphisms in Resistance and Susceptibility to Malaria.

Clinical Infectious Diseases. 28, 794-799

**Lew, A.M., Langford, C.J., Anders, R.F., Kemp, D.J., Saul, A., Fardoulis, C., Geysen, M., Sheppard, M. (1989)**

A protective monoclonal antibody recognizes a linear epitope in the precursor to the major merozoite antigens of *Plasmodium cabaudi adami*.

PNAS. 86, 3768-3772

**Ling, I.T., Ogun, S.A., Holder A.A. (1994)**

Immunization against malaria with a recombinant protein.

Parasite Immunol. 16, 63-67

**Lingelbach, K. (1994)**

Malaria.

in: Röllinghoff, M.: Immunologische und molekulare Parasitologie.

Fischer Verlag, Stuttgart, Jena

**Lisse, I.M., Aaby, P., Whittle, H., Knudsen, K. (1994)**

A community study of T lymphocyte subsets and malaria parasitaemia.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 88, 709-710

**Locher, C.P., Tam, L.Q. (1993)**

Reduction of disulfide bonds in *Plasmodium falciparum* gp195 abolishes the production of growth-inhibitory antibodies.

Vaccine. 11, 1119-1123

**Locher, C.P., Tam, L.Q., Chang, S.P., McBride, J.S., Siddiqui, W.A. (1996)**

*Plasmodium falciparum*: gp195 tripeptide repeat-specific monoclonal antibody inhibits parasite growth in vitro.

Exp Parasitol. 84, 74-83

**Looareesuwan, S., Phillips, R., White, N., Kietinun, S., Karbwang, J., Rackow, C., Turner, R., Warrell, D. (1985)**

Quinine and severe falciparum malaria in late pregnancy.

Lancet. 2, 4-8

**Lucius, R. und Loos-Frank, B. (1997)**

Parasitologie.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

**Luckner, D., Lell, B., Greve, B., Lehman, G., Schmidt-Ott, R.J., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Mba, R., Kreamsner, P.G. (1998)**

No influence of socioeconomic factors on severe malarial anaemia, hyperparasitaemia or reinfection.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 92, 478-481

**Luty, A.J.F., Kun, J.F.J., Kreamsner, P.G. (1998)**

Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria.

J Infect Dis. 178, 1221-1224

**Luty, A.J.F., Lell, B., Schmidt-Ott, R.J., Lehman, L. G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Migot-Nabias, F., Deloron, P., Nussenzweig, R.S., Kreamsner, P.G. (1999)**

Interferon- $\gamma$  response are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum*.

J Infect Dis. 179, 980-988

**Luty, A.J.F., Ulbert, S., Lell, B., Lehman, L., Schmidt-Ott, R., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Schmid, D., Herbich, K., Dubois, B., Deloron, P., Kreamsner, P.G. (2000)**

Antibody responses to *Plasmodium falciparum*: their evolution according to the severity of a prior clinical episode and their association with subsequent reinfections.

Am J Trop Med Hyg. 62, 566-572

**Lyon, J.A., Thomas, A.W., Hall, T., Chulay, J.D. (1989)**

Specificities of antibodies that inhibit merozoite dispersal from malaria-infected erythrocytes.

Mol Biochem Parasitol. 36, 77-86

**MacLeod, C.L. (1988)**

Malaria, 8-42

in: MacLeod, C.L.: Parasitic infections in pregnancy and the newborn.  
Oxford Medical Publications, Oxford**Malarianetwork (17. September 1999)**[www.malarianetwork.org/index.cgi?=-malaria&u=guest&p=&r=malariaburtre](http://www.malarianetwork.org/index.cgi?=-malaria&u=guest&p=&r=malariaburtre)**Manson-Bahr, P.H. (1963)**The story of malaria: the drama and the actors.  
Intern Rev Trop Med. 2, 329-390**Marsh, K., Howard, R.J. (1986)**Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants.  
Science. 231, 150-153**Marsh, K., Otoo, L., Hayes, R.J., Carson, D.C., Greenwood, B.M. (1989)**Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection.  
Trans R Soc Trop Med Hyg. 83, 293-303**Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanly, M., Marsh, V., Newton, C., Winstanley, P., Warn, P., Peshu, N., Pasvol, G., Snow, R. (1995)**Indicators of life-threatening malaria in African children.  
N Engl J Med. 332, 1399-1404**Marshall, V.M., Silva, A., Foley, M., Cranmer, S., Wang, L., McColl, D.J., Kemp, D.J., Coppel, R.L. (1997)**A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain.  
Infect Immun. 65, 4460-4467**Matsumoto, J., Kawai, S., Terao, K., Kirinoki, M., Yasutomi, Y., Aikawa, M., Matsuda, H. (2000)**Malaria infection induces rapid elevation of the soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of Macaca monkeys to *Plasmodium coatneyi* infection.  
Infect Immun. 68, 1183-1188**McBride, J.S., Heidrich, H.G. (1987)**Fragments of the polymorphic Mr 185000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex.  
Mol Biochem Parasitol. 23, 78-84

**McCull, D.J., Silva, A., Foley, M., Kun, J.F.J., Favaloro, J.M., Thompson, J.K., Marshall, V.M., Coppel, R.L., Kemp, D.J., Anders, R.F. (1994)**

Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites.

Mol Biochem Parasitol. 68, 53-67

**Mehlhorn, H., Piekarski (1998)**

Grundriß der Parasitenkunde.

5. Aufl., Gustav Fischer Verlag

**Miller, L.H., Roberts, T., Shahabuddin, M., McCutchan, T.F. (1993)**

Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1).

Mol Biochem Parasitol. 59, 1-14

**Miller, L.H., Good, M.F., Milon, G. (1994)**

Malaria pathogenesis.

Science. 264, 1878-1883

**Morgan, W.D., Birdsall, B., Frenkiel, T.A., Gradwell, M.G., Burghaus, P.A., Syed, S.E.H., Uthapibull, C., Holder, A.A., Feeney, J. (1999)**

Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1.

J Mol Biol. 289, 113-122

**Müller, H.M., Früh, K., von Brunn, A., Esposito, F., Lombardi, S., Crisanti, A., Bujard, H. (1989)**

Development of the human immune response against the major surface protein (gp190) of *Plasmodium falciparum*.

Infect Immun. 57, 3765-3769.

**O'Donnell, R.A., Koning-Ward, T.F., Burt, R.A., Bockarie, M., Reeder, J.C., Cowman, A.F., Crabb, B.S. (2001)**

Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1<sub>19</sub> are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to Malaria.

J Exp Med. 193, 1403-1412

**Oeuvray, C., Bouharoun-Tayoun, H., Gras-Masse, H., Bottius, E., Kaidoh, T., Aikawa, M., Filgueira, A., Tartar, A., Druilhe, P. (1994)**

Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes.

Blood. 84, 1594-1602

**Ohnmacht, C.J., Patel, A.R., Lutz, R.E. (1971)**

Antimalarial 7-bis (trifluoromethyl) (2-piperidyl) 4-quinoline methanols.

J Med Chem. 14, 926-928

- Patino, J.A.G., Holder, A.A., McBride, J.S., Blackman, M.J. (1997)**  
Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies.  
J Exp Med. 186, 1689-1699
- Philipps, J., Radloff, P.D., Lehmann, L.G., Baksai, L., Milovanovic, D., Nkeyi, M., Wernsdorfer, W.H., Kremsner, P.G. (1996)**  
Clinical diagnosis of malaria: can the patients help us improve ?  
Trans R Soc Trop Med Hyg. 90, 42
- Pirson, P.J., Perkins, M.E. (1985)**  
Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites.  
J Immunol. 134, 1946-1951
- Pschyrembel (1998)**  
Klinisches Wörterbuch.  
258. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Qari, S.H., Shi, Y.P., Goldman, I.F., Nahlen, B.L., Tibayrenc, M., Lal, A.A (1998)**  
Predicted and observed alleles of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1), a potential malaria vaccine antigen.  
Mol Biochem Parasitol. 92, 241-252
- Rasheed, F.N., Bulmer J.N., de Francisco, A., Jawla, M.F.B., Jakobsen, P.H., Jepson, A., Greenwood, B.M. (1995)**  
Relationships between maternal malaria and malarial immune response in mothers and neonates.  
Parasite Immunol. 17, 1-10
- Riley, E.M., Allen, S.J., Wheeler, J.G., Blackman, M.J., Bennett, S., Takacs, B., Schönfeld, H.J., Holder, A.A., Greenwood, B.M. (1992)**  
Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity.  
Parasite Immunol. 14, 321-337
- Riley, E.M., Wagner, G.E., Ofori, M.F., Wheeler, J.G., Akanmori, B.D., Tetteh, K., McGuinness, D., Bennett, S., Nkrumah, F.K., Anders, R.F., Koram, K.A. (2000)**  
Lack of Association between Maternal Antibody and Protection of African Infants from Malaria Infection.  
Infect Immun. 68, 5856-5863
- Roitt, I. M. (1993)**  
Leitfaden der Immunologie.  
4. Aufl., Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin

**Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.M. (1995)**

Kurzes Lehrbuch der Immunologie.  
3. Aufl., Thieme Verlag Stuttgart, New York

**Rosenburg, R. und Wirtz, R.A. (1990)**

An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito.  
Trans R Soc Trop Med Hyg. 84, 209-212

**Ross, R. (1897a)**

Observations on a condition necessary to the transformation of the malaria crescent.  
Brit med J. I, 251-255

**Ross, R. (1897b)**

On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood.  
Brit med J. II, 1786-1788

**Sabchareon, A., Burnouf, T., Ouattara, D., Attanath, P., Bouharoun-Tayoun, H., Chantavanich, P., Foucault, C., Chongsuphajaisiddhi, T., Druilhe, P. (1991)**

Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria.  
Am J Trop Med Hyg. 45, 297-308

**Sam-Yellowe, T.Y. (1996)**

Rhoptry organelles of the Apicomplexa: their role in host cell invasion and intra-cellular survival.  
Parasitol Today. 12, 308-316

**Schimitscheck, E. und Werner, G.T. (1985)**

Malaria, Fleckfieber, Pest.  
S. Hirzel Verlag, Stuttgart

**Schmid, G.H., Radunz, A., Gröschel-Stewart, U. (1993)**

Immunologie und ihre Anwendung in der Biologie.  
1. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

**Schmidt-Ott, R., Luckner, D., Lehman, L.G., Lell, B., Matousek, P., Greve, B., Kremsner, P.G. (1997)**

Sulfadoxin/pyrimethamine for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in young children in Gabon.  
Trans R Soc Trop Med Hyg. 91, 578-579

**Schmidt-Ullrich, R., Brown, J., Whittle, H., Lin, P.S. (1986)**

Human-human hybridomas secreting monoclonal antibodies to the M<sub>r</sub> 195,000 *Plasmodium falciparum* blood stage antigen.  
J Exp Med. 163, 179-188

- Scholander, C., Treutinger, C.J., Hultenby, K., Wahlgren, M. (1996)**  
Novel fibrillar structure confers adhesive property to malaria-infected erythrocytes.  
*Nature Med.* 2, 204-208
- Schunkert, H., Handt, S. (1988)**  
Transfusionsmalaria bei Promyelozytenleukämie.  
*Deutsche med Wochenschrift.* 113, 1841-1843
- Shai, S., Blackman, M.J., Holder, A.A. (1995)**  
Epitopes in the 19kDa fragment of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1 (PfMSP-1<sub>19</sub>) recognized by human antibodies.  
*Parasite Immunol.* 17, 269-275
- Shi, Y.P., Sayed, S., Qari, S.H., Roberts, J.M., Udhayakumar, V., Oloo, A.J., Hawley, W.A., Kaslow, D.C., Nahlen, B.L., Lal, A.A. (1996)**  
Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1.  
*Infect Immun.* 64, 2716-2723
- Shi, Y.P., Udhayakumar, V., Oloo, A.J., Nahlen, B.L., Lal, A.A. (1999)**  
Differential effect and interaction of monocytes, hyperimmune sera, and immunglobulin G on the growth of asexual stage *Plasmodium falciparum* parasites.  
*Am J Trop Med Hyg.* 60, 135-141
- Siddiqui, W.A., Tam, L.Q., Kramer, K.J., Hui, G.S.N., Case, S.E., Yamaga, K.M., Chang, S.P., Chan, E.B., Kan, S.C. (1987)**  
Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria.  
*PNAS.* 84, 3014-3018
- Sim, B.K.L. (1995)**  
EBA-175: A erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum*.  
*Parasitol Today.* 11, 213-217
- Sim, B.K., Chitnis, C.E., Wasniowska, K., Hadley, T.J., Miller, L.H. (1994)**  
Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*.  
*Science.* 264, 1941-1944
- Sinnis, P., Sim, B.K.L. (1997)**  
Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*.  
*Trends Microbiol.* 5, 52-58
- Slutsker, L., Khoromana, C.O., Hightower, A.W., Macheso, A., Wirima, J.J., Breman, J.G., Heymann, D.L., Steketee, R.W. (1996)**  
Malaria infection in infancy in rural Malawi.  
*Am J Trop Med Hyg.* 55, 71-76

**Smith, D.B., Johnson, K.S. (1988)**

Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.

Gene. 67, 31-40

**Snow, R.W., Schellenberg, J.R., Peshu, N., Forster, D., Newton, C.R., Winstanley, P.A., Mwangi I., Waruiru, C., Warn, P.A., Newbold, C. (1993)**

Periodicity and space-time clustering of severe childhood malaria on the coast of Kenya.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 87, 386-390

**Snow, R.W., Omumbo, J.A., Lowe, B., Molyneux, C.S., Obiero, J.O., Palmer, A., Weber, M.W., Pinder, M., Nahlen, B., Obongo, C., Newbold, C., Gupta, S. (1997)**

Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa.

Lancet. 349, 1650-1654

**Stafford, W.H.L., Blackman, M.J., Harris, A., Shai, S., Grainger, M., Holder A.A. (1994)**

N-terminal amino acid sequence of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 polypeptides.

Mol Biochem Parasitol. 66, 157-160

**Stirnadel, H.A., Al-Yaman, F., Genton, B., Alpers, M.P., Smith, T.A. (2000)**

Assessment of different sources of variation in the antibody responses to specific malaria antigens in children in Papua New Guinea.

Int J Epidemiol. 29, 579-586

**Stoll, P. (1997)**

Entwicklung und Erprobung eines Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA) zum quantitativen Nachweis von humanem Insulin-Like Growth Factor-Bindungsprotein-3.

Med. Dissertation, Universität Tübingen

**Sylla, E.H.K., Kun, J.F.J., Kremsner, P.G. (2000)**

Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 94, 554-556

**Sylla, E.H.K., Lell, B., Kun, J.F.J., Kremsner, P.G. (2001)**

*Plasmodium falciparum* transmission intensity and infection rates in children in Gabon.

Parasitol Res. 87, 530-533

**Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M., Scaife, J.G. (1987)**

Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.

J Mol Biol. 195, 273-287

- Taylor, R.R., Allen, S.J., Greenwood, B.M., Riley, E.M. (1998)**  
IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria.  
Am J Trop Med Hyg. 58, 406-413
- Tian, J.H., Kumar, S., Kaslow, D.C., Miller, L.H. (1997)**  
Comparison of protection induced by immunization with recombinant proteins from different regions of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii*.  
Infect Immun. 65, 3032-3036
- Torii, M. und Aikawa, M. (1998)**  
Ultrastructure of Asexual Stages, 123-134  
in: Irwin W. Sherman: Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection;  
ASM Press, Washington, D.C.
- Trager, W., Rudzinska, M.A., Bradbury, P.C. (1966)**  
The fine structure of *Plasmodium falciparum* and its host erythrocytes in natural malarial infections in man.  
Bull WHO. 35, 883-885
- Trager, W., Jensen, J.B. (1976)**  
Human malaria parasites in continuous culture.  
Science. 193, 673-675
- Triglia, T., Healer, J., Caruana, S.R., Hodder, A.N., Anders, R.F., Crabb, B.S., Cowman, A.F. (2000)**  
Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species.  
Mol Microbiol. 38, 706-718
- Trucco, C., Fernandez-Reyes, D., Howell, S., Stafford, W. H., Scott-Finnigan, T. J., Grainger, M., Ogun, S. A., Taylor, W. R., Holder, A. A. (2001)**  
The merozoite surface protein 6 gene codes for a 36 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex.  
Mol Biochem Parasitol. 112, 91-101
- Uthaipibull, C., Aufiero, B., Seyd, S.E.H., Hansen, B., Guevara Patino, J.A., Angov, E., Ling, I.T., Fegeding, K., Morgan, W.D., Ockenhouse, C., Birdsall, B., Feeney, J., Lyon, J.A., Holder, A.A. (2001)**  
Inhibitory and blocking monoclonal antibody epitopes on merozoite surface protein 1 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.  
J Mol Biol. 307, 1381-1394
- Vanderberg, J., Chew, S. und Stewart, M.J. (1990)**  
Plasmodium sporozoite interactions with macrophages in vitro: a video microscopic analysis.  
J. Protozool. 37, 528-536

**Wagner, G., Koram, K., McGuinness, D., Bennett, S., Nkrumah, F., Riley, E. (1998)**

High incidence of asymptomatic malaria infections in children under 1 year of age in Ghana, detected by multicopy gene polymerase chain reaction.

Am J Trop Med Hyg. 59, 115-123

**Wahlgren, M. (1986)**

Antigens and antibodies involved in humoral immunity to *Plasmodium falciparum*.

Ph D Thesis. Karolinska Institute, Stockholm. ISBN 91-7900-026-6.

**Wahlgren, M., Berzins, K., Perlmann, P., Persson, M. (1983)**

Characterization of the humoral immune response in *Plasmodium falciparum* malaria.

II. IgG subclass levels of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in different sera.

Clin Exp Immunol. 54, 135-142

**Wahlgren, M., Björkman, A., Perlmann, H., Berzins, K., Perlmann, P. (1986)**

Anti-*Plasmodium falciparum* antibodies acquired by residents in a holoendemic area of Liberia during development of clinical immunity.

Am J Trop Med Hyg. 35, 22-29

**Wahlgren, M., Fernandez, C., Scholander, C., Carlson, J. (1994)**

Rosetting.

Parasitol Today. 10, 73-79

**Wahlgren, M., Perlmann, P. (1999)**

Malaria: Molecular and Clinical Aspects.

Harwood academic publishers, Gordon and Breach Publishing Group

**Ward, G.E., Chitnis, C.E., Miller, L.H. (1994)**

The invasion of erythrocytes by malaria merozoites, 155-190

in: Russell, D., ed.: Strategies for Intracellular Survival of Microbes

London: W.B. Saunders

**Warrell, D.A. (1993)**

Clinical features of malaria, 35-49

in: Gillis, H.M. and Warrell, D.A.: Bruce-Chwatt's essential malariology.

Edward Arnold, London, England

**Warrell, D.A., Molyneux, M.E., Beales, P.F. (1990)**

Severe and complicated Malaria, 2<sup>nd</sup> edition.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 84 (2)

**Webster, H. K., Lehnert, E.K. (1994)**

Chemistry of artemisinin: an overview.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 88, Suppl., 27-29

**Weltalmanach (1997)**

Gabun, 250

in: Fischer Weltalmanach.

Fischer Taschenbuch-Verlag, Frankfurt am Main

**Wernsdorfer, W.H. (1980)**

The importance of malaria in the world, 1-93

in: Kreier, J.P.: Malaria, Vol.I

Academic Press, New York

**Wernsdorfer, W.H. (1981)**

Prospects for the development of malaria vaccines.

Bull WHO. 59, 33-341**Wernsdorfer, W.H. (1988)**

Transfusion malaria and other forms of induced malaria, 903-912

in: Wernsdorfer, W.H., McGregor, I.: Malaria-Principles and Practice of Malariology  
Vol. II, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York**Wernsdorfer, W.H. (1991)**

The development and spread of drug-resistant malaria.

Parasitol Today. 11, 297-303**Wernsdorfer, W.H., McGregor, I. (1988)**

Malaria: Principles and practice of malariology.

Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York

**Wernsdorfer, W.H., Payne, D. (1991)**The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*.Pharmac Ther. 50, 95-121**White, G.B. (1996)**

Mosquitoes.

in: Cook, C.G.: Manson`s Tropical Diseases.

20.Auflage, Saunders London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo

**White, N.J. (1992)**

Antimalarial drug resistance: the pace quickens.

J Antimicrob Chemother. 30, 571-585**White, N.J. (1994)**

Artemisinin: current status.

Trans R Soc Trop Med Hyg 88, Suppl.,3-4**White, N.J., Ho, M. (1992)**

The pathophysiology of malaria.

Adv Parasitol. 31, 83-173

**Whitworth, J., Morgan, D., Quigley, M., Smith, A., Mayanja, B., Eotu, H., Omoding, N., Okongo, M., Malamba, S., Ojwiya, A. (2000)**

Effect of HIV-1 and increasing immunosuppression on malaria parasitaemia and clinical episodes in adults in rural Uganda: a cohort study.

Lancet. 356, 1051-1056

**WHO (World Health Organisation) (1969)**

Re-examination of the global strategy of malaria eradication.

Official records of the WHO. 176, Annex 1

**WHO (World Health Organisation) (1990)**

Severe and complicated malaria.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 84 Suppl II, 1-65

**WHO (World Health Organisation) (1997)**

World malaria situation in 1994, Part I.

Weekly Epidemiological Record. 72, 269-76

**WHO (World Health Organisation) (2001)**

[www.mosquito.who.int/cmc\\_upload/0/000/014/813/Malaria\\_at\\_a\\_glance1.html](http://www.mosquito.who.int/cmc_upload/0/000/014/813/Malaria_at_a_glance1.html)

[www.rbm.who.int](http://www.rbm.who.int)

**Wildling, E., Winkler, S., Kremsner, P.G., Brandts, C., Jenne, L., Wernsdorfer, W.H. (1995)**

Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogooué, Gabon.

Trop Med Parasitol. 46, 77-82

**Winograd, E., Clavijo, C. A., Bustamante, L. Y., Jaramillo, M. (1999)**

Release of merozoites from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes could be mediated by non-explosive event.

Parasitol Res. 85, 621-624

**Wipasa, J., Xu, H., Stowers, A., Good, M.F. (2001)**

Apoptotic delition of Th cells specific for the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein 1 during malaria infection.

J Immunol. 167, 3903-3909

**Withington (1909)**

Greek therapeutics and the malaria theory.

in: Jones, W.H.S.: Malaria and Greek History.

Manchester University Publication historical series VIII

**Wu, T., Black, C.G., Wang, L., Hibbs, A.R., Coppel, R.L. (1999)**

Lack of sequence diversity in the gene encoding merozoite surface protein 5 of *Plasmodium falciparum*.

Mol Biochem Parasitol. 103, 243-250

**Zinkernagel, R.M., Bachmann, M.F., Kündig, T.M., Oehen, S., Pirchet, H., Hengartner, H. (1996)**

On Immunological Memory.

Ann Rev Immunol. 14, 333-367

**Zweig, S., Singer, S.J. (1979)**

Concanavalin A-induced endocytosis in rabbit reticulocytes, and its decrease with reticulocyte maturation.

J Cell Biol. 80, 487-491

## 8 Verzeichnis der Abbildungen

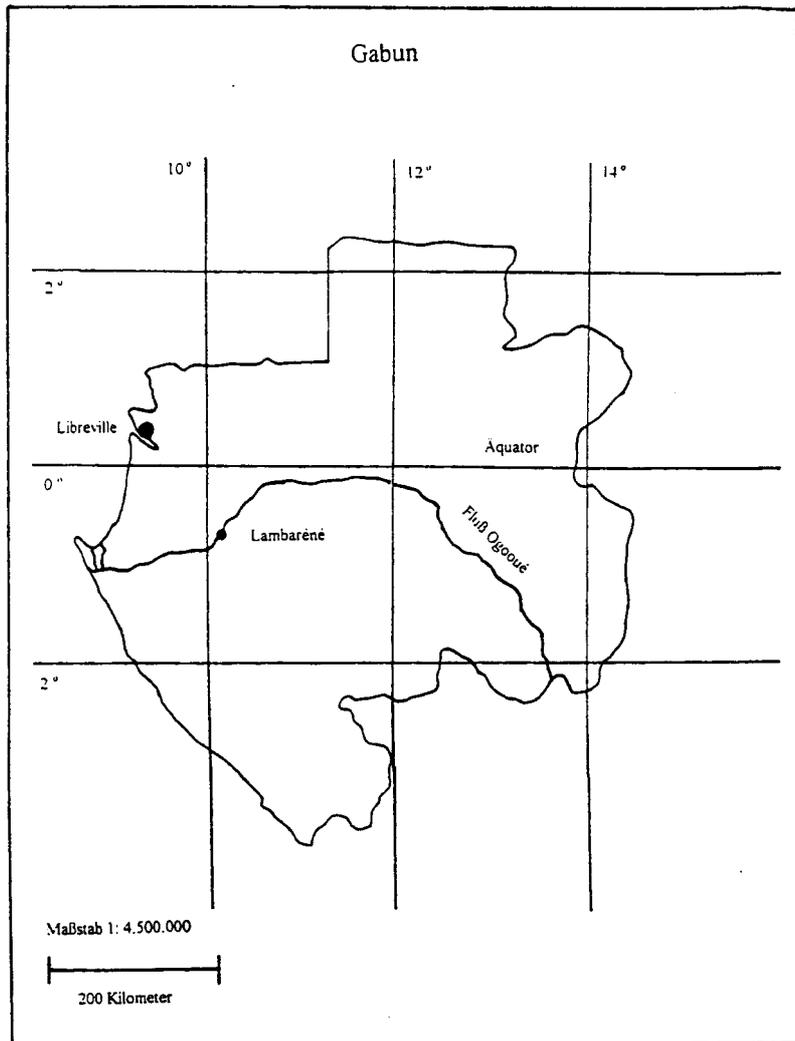
Abbildung 1-1: Klassifikation und Eigenschaften der <b>IgG-Isotypen</b> .....	24
Abbildung 2-1: <b>ELISA</b> -Platten – Belegung der Kavitäten.....	44
Abbildung 2-2: Peroxidasereaktion (nach Schmid et al., 1993).....	46
Abbildung 3-1: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren <b>IgG</b> -Antikörpern gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten.....	58
Abbildung 3-2: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren <b>IgG-1</b> -Antikörpern gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten.....	59
Abbildung 3-3: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren <b>IgG-3</b> -Antikörpern gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten.....	60
Abbildung 3-4: <b>IgG</b> -, <b>IgG-1</b> -, <b>IgG-3</b> -Antikörperantwort auf <u>MSP-1<sub>19</sub></u> und <b>IDR</b> (Reinfektionsrate) an Untersuchungs- <b>Tag 28</b> .....	65
Abbildung 3-5: <b>IgG</b> -, <b>IgG-1</b> -, <b>IgG-3</b> -Antikörperantwort auf <u>MSP-1<sub>19</sub></u> und <b>IDR</b> (Reinfektionsrate) an Untersuchungs- <b>Tag 180</b> .....	66
Abbildung 3-6: <b>IgG</b> -Antikörperantwort auf <u>MSP-1<sub>19</sub></u> und Zeit in Tagen bis zur ersten <b>Reinfektion</b> an Untersuchungs- <b>Tag 28</b> .....	68
Abbildung 3-7: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren <b>IgG</b> -Antikörpern gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach den drei <b>Altersklassen</b> .....	69
Abbildung 3-8: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren <b>IgG-1</b> -Antikörpern gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach den drei <b>Altersklassen</b> .....	70
Abbildung 3-9: Prozentuale Anteile von Kindern mit nachweisbaren <b>IgG-3</b> -Antikörpern gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach den drei <b>Altersklassen</b> .....	72
Anhang-Abbildung 10-1: Übersichtskarte Gabun.....	130
Anhang-Abbildung 10-2: <i>Plasmodium falciparum</i> -Lebenszyklus.....	131
Anhang-Abbildung 10-3: Immunglobulin-Struktur.....	132
Anhang-Abbildung 10-4: <u>MSP-1<sub>19</sub></u> -Struktur.....	133
Anhang-Abbildung 10-5: Blantyre Komascor.....	134

## 9 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 3.1: <b>AU-Werte</b> der <b>IgG</b> -Antikörperproduktion der <u>RESPONDER</u> gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder und schwerer Malaria tropica.....	62
Tabelle 3.2: <b>AU-Werte</b> der <b>IgG-1</b> -Antikörperproduktion der <u>RESPONDER</u> gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder und schwerer Malaria tropica.....	62
Tabelle 3.3: <b>AU-Werte</b> der <b>IgG-3</b> -Antikörperproduktion der <u>RESPONDER</u> gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder und schwerer Malaria tropica.....	62
Tabelle 3.4: <b>IgG-1:IgG-3-Ratio</b> gegen <u>MSP-1<sub>19</sub></u> an den drei Untersuchungszeitpunkten, getrennt nach milder und schwerer Malaria tropica.....	63

## 10 Anhang

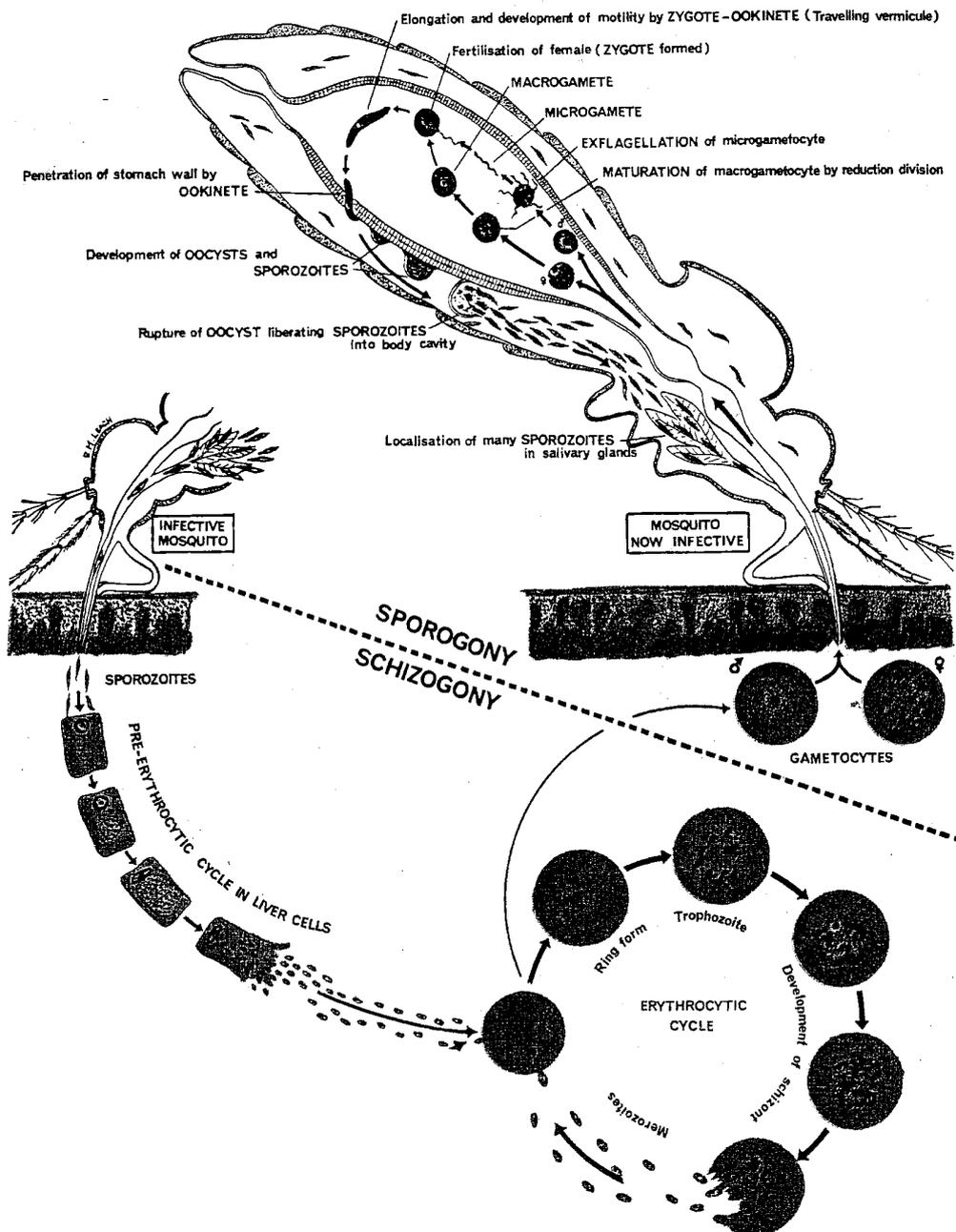
Anhang-Abbildung 10-1: Übersichtskarte Gabun



Übersichtskarte Gabun

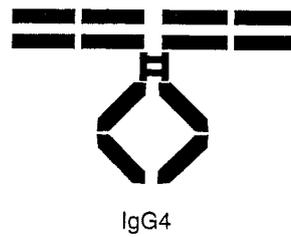
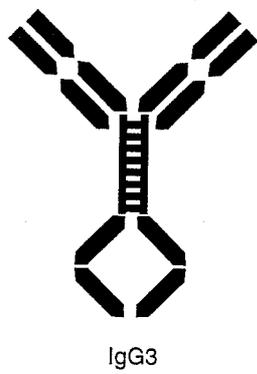
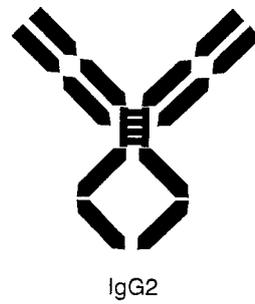
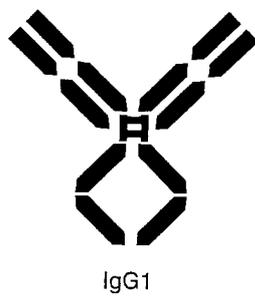
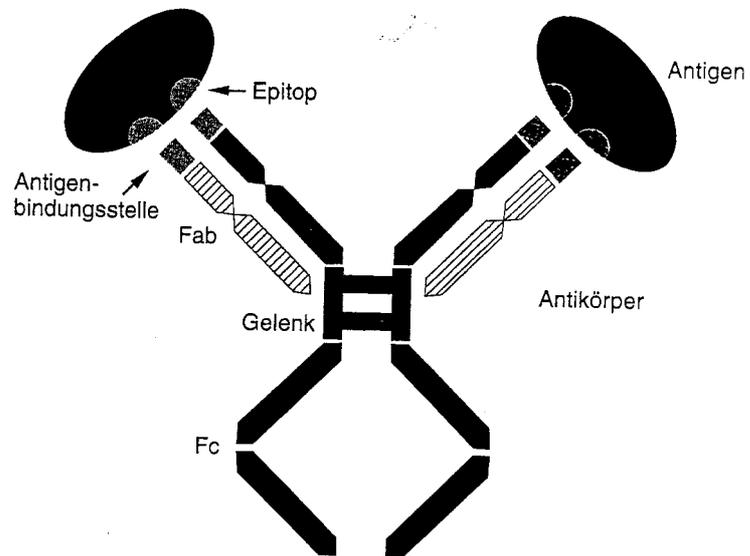
Anhang-Abbildung 10-2: Plasmodium falciparum-Lebenszyklus

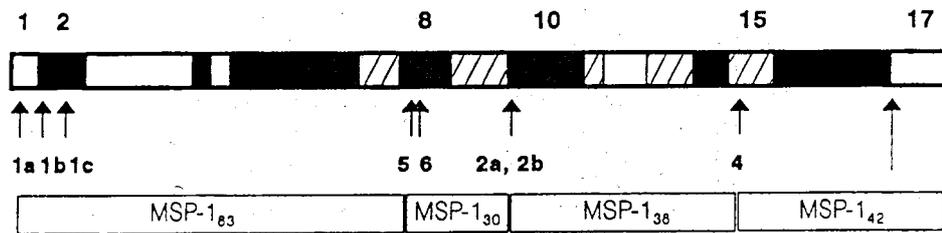
(aus: Atlas of Medical Helminthology and Protozoology,  
H.C. Jeffrey and R.M. Leach, 1975)



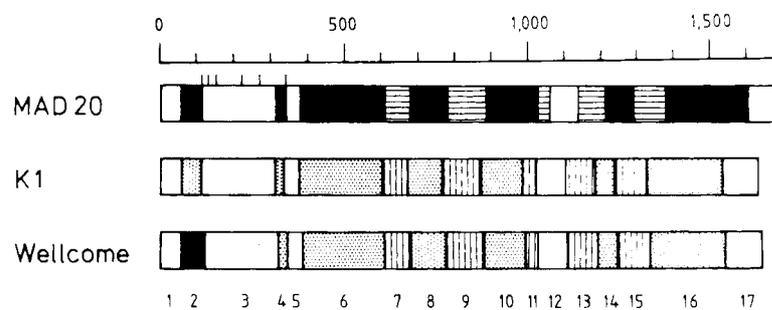
### Anhang-Abbildung 10-3: Immunglobulin-Struktur

(aus: ELISA, D.M. Kemeny, 1994)

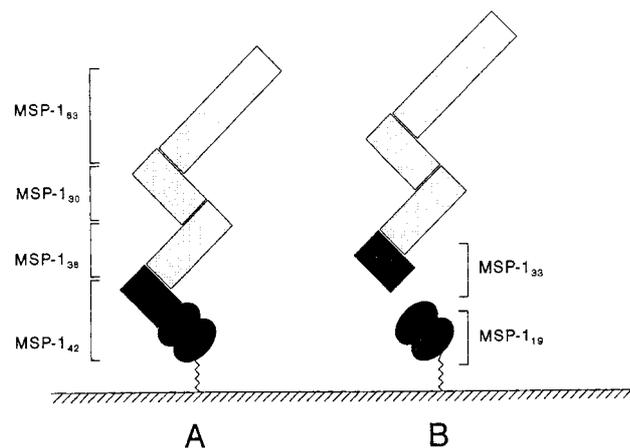


Anhang-Abbildung 10-4: MSP-1<sub>19</sub>-Struktur

Diagrammatische Darstellung der Aminosäuresequenz des MSP-1 von *Plasmodium falciparum* mit aufgezeigten Schneidepositionen zur Hervorbringung der Polypeptide (nach Stafford et al., 1994). Schwarze Bereiche entsprechen einer hohen Homologie (87-97%), schraffierte Bereiche einer mittleren Homologie (65-77%) und leere Bereiche einer niedrigen Homologie (10-38%) zwischen den dimorphen Formen.



Vereinfachte Darstellung der Aminosäuresequenz der verschiedenen MSP-1-Linien von *Plasmodium falciparum*. Die Sequenzen werden unterschieden in konservierte Bereiche (schwarz), semi-konservierte Bereiche (schraffiert) und variable Bereiche (leer).



Schematische Darstellung der Sekundärprozessierung des MSP-1 von *Plasmodium falciparum* (nach Blackman et al., 1994)

**Anhang-Abbildung 10-5: Blantyre Komascoring**

<b>Okulomotorik</b>	orientiert (Augen folgen dem Gesicht der Mutter)	1
	nicht orientiert	0
<b>verbale Reaktion auf Schmerzreiz</b>	normales Schreien	2
	wimmern	1
	keine Reaktion	0
<b>motorische Reaktion auf Schmerzreiz</b>	Lokalisation des Schmerzes	2
	nicht orientierte Reaktion	1
	keine Reaktion	0

Komascoring ergibt sich aus der Summe der Wertpunkte  
Blantyre-Komascoring bei Gesunden = 5

## 11 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Vor allem danke ich meinem Betreuer Dr. Adrian J. F. Luty für die gute Arbeitsatmosphäre, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die immer bereitwillige Offenheit, mir bei der Durchführung der Arbeit zur Seite zu stehen.

Herrn Prof. Dr. med. Peter G. Kremsner danke ich nicht nur für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Laborplatzes in der Sektion Humanparasitologie am Institut für Tropenmedizin, sondern insbesondere auch für das mir entgegengebrachte persönliche Interesse, den Anstoß und die stete Unterstützung und Ermutigung zum Doppelstudium der Diplom-Biologie und Humanmedizin.

„Uhren-Urwald-Doktor (le grand blanc)“ Dr. med. Bertrand Lell und PD Dr. Jürgen Kun danke ich für manche fruchtbare Diskussion und ihre Anregungen.

Eine große persönliche Bereicherung stellte für mich ein Studienaufenthalt am Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné, Gabun, mit Professor Dr. med. Peter G. Kremsner, Leiter des dortigen internationalen Forschungslabors, im Februar 2002 dar. Ich konnte u.a. dabei einige derjenigen Studienkinder persönlich kennenlernen, deren Blutproben als Grundlage dieser hier vorliegenden Arbeit dienten. Dieser Aufenthalt wurde durch ein Stipendium des DAAD und des Lehrfonds PROFIL der Universität Tübingen möglich.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Renate und Klaus Köhler und meinem Bruder Dr.med.Guido Köhler für die vielfältige persönliche Unterstützung während meines Studiums. Meinen Eltern Renate und Klaus Köhler habe ich zudem für die treue finanzielle Unterstützung, die mir das Studium überhaupt erst ermöglichte, ganz herzlich zu danken.

Herrn Prof. Dr. med. Friedrich W. Schmahl danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

## 12 Lebenslauf

Name: Carsten Köhler  
Geburtsdatum: 19. Mai 1972  
Geburtsort: Haan / Rheinland  
Nationalität: deutsch

### Schulische Ausbildung:

1978 – 1982            Grundschule in Haan / Rheinland

1982 – 1991            Städtisches Gymnasium Haan mit Abschluss Abitur

anschließend

1991 – 1992            Zivildienst im Operationsbereich des Städtischen Klinikums  
Solingen, Lehrkrankenhaus der Albertus Magnus Universität Köln

### Akademische Ausbildung:

1992 – 2000            Studium der Diplom-Biologie an der Albertus Magnus Universität  
Köln und der Eberhard Karls Universität Tübingen

Biologie-Diplom mit den Schwerpunktfächern  
Zoologie / Humanparasitologie, Humanphysiologie und  
Humangenetik / Anthropologie

1997 – 2003            Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität  
Tübingen; 2000/01 Stipendiat der Richard-Winter-Stiftung  
2. Staatsexamen im März 2003, 3. Staatsexamen am 16.11.2004  
in Hechingen/Zollern-Alb-Kreis

- 2003 – 2004      Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen und der  
                         Kreisklinik Hechingen, Kreisklinikum des Zollern-Alb-Kreises
- 2004                Forschungsaufenthalt am KEMRI, Kilifi, Kenia
- 19.11.2004        Approbation zum Arzt
- seit 2000          Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tropenmedizin,  
                         Sektion Humanparasitologie, u.a. als Referent für  
                         Auslandsbeziehungen der Medizinischen Fakultät
- seit 2005          Forschungsaufenthalt am Leiden University Medical Center,  
                         Niederlande