

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung VII – Tropenmedizin
(Schwerpunkt: Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin,
Humanparasitologie)

**Charakterisierung der natürlich erworbenen humoralen
Immunantwort gesunder Erwachsener auf Antigene des
Malariaimpfstoffkandidaten GMZ2 in Gabun**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Laurenz, Léa Josette

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Proikas-Cezanne

Tag der Disputation: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
------------------------------	----------

Tabellenverzeichnis	vii
----------------------------	------------

1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der Malaria	1
1.1.1 Historischer Hintergrund	1
1.1.2 Geographische Verteilung der Malaria tropica	1
1.1.3 Bedeutung	2
1.2 Malaria tropica und ihr Erreger <i>Plasmodium falciparum</i>	4
1.2.1 Erreger	4
1.2.2 Pathogenese	9
1.2.3 Klinik	9
1.2.4 Diagnostik	11
1.2.5 Therapie	12
1.3 Das menschliche Immunsystem	13
1.3.1 Angeborene (unspezifische) Immunantwort	13
1.3.2 Adaptive (spezifische) Immunantwort	13
1.3.3 Die humorale Immunantwort durch B-Zellen und Antikörper	14
1.3.4 Antikörper	14
1.3.5 B-Zellentwicklung und daraus hervorgehende B-Zellklassen	15
1.3.6 Entwicklung des serologischen Memorys	17
1.4 Natürliche Immunantwort des Menschen auf <i>Plasmodium falciparum</i>	20
1.4.1 Epidemiologie der natürlich erworbenen <i>Pf</i> -Immunität	20
1.4.2 Mechanismen der adaptiven Immunantwort gegen prä-erythrozytäre Infektionsstadien	23
1.4.3 Mechanismen der zellulären Immunantwort gegen prä-erythrozytäre Infektionsstadien	23
1.4.4 Mechanismen der humoralen Immunantwort gegen erythrozytäre Infektionsstadien	24
1.4.5 Impfstoffentwicklung	25
1.4.6 Antigenpezifität protektiver IgG und das Fusionsprotein GMZ2	26

1.5	Fragestellung	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Studiendesign	29
2.2	Studienort	30
2.3	Studienpopulation	31
2.4	Material	33
2.5	Diagnostik	33
2.6	Fraktionierung in mononukleäre Zellen (PBMC), Plasma und Erythrozyten	36
2.7	B-Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie	38
2.8	Quantitative IgG- und IgM-Bestimmung mittels ELISA	42
2.9	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Studienpopulation	46
3.2	Klinische Diagnostik	49
3.2.1	Parasitologie	49
3.2.2	Hämatologie	54
3.2.3	Assoziationen zwischen Blutbildparametern, <i>Pf</i> -Infektion und Malariasymptomen	56
3.3	Analyse der IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität	57
3.3.1	Deskriptive Analyse der IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität	58
3.3.2	Explorative Analyse der IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität nach regionalen und individuellen Subpopulationen	61
3.3.3	Vergleich der IgM- und IgG-GMZ2-Serumreaktivität	70
3.4	Analyse der GMZ2-reaktiven Memory-B-Zellen	70
3.4.1	Durchflusszytometrische Analyse der B-Zellpopulationen, insbesondere der klassischen und atypischen Memory-B-Zellen	70
3.4.2	Analyse der klassischen und atypischen Memory-B-Zellen nach geographischen und individuellen Subpopulationen	71
4	Diskussion	77
4.1	Studienpopulation	77
4.2	Blutbildparameter, <i>Pf</i> -Infektionsstatus und anamnestisch erhobene Malariasymptome	80
4.3	GMZ2-reaktive IgG und IgM	82
4.4	GMZ2-reaktive B-Zellen und Memory-B-Zellen	84

4.5	Vergleich der <i>Pf</i> -Immunantwort nach geographischen Subpopulationen im Stadt-Land-Vergleich	87
4.6	Ausblick	89
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	95
7	Erklärung zum Eigenanteil	116

Abbildungsverzeichnis

1.1	Weltweite Prävalenz der Malaria tropica innerhalb der stabilen Übertragungsgrenze 2010	2
1.2	<i>Pf</i> -Malaria – Blutausstrich	4
1.3	Lebenszyklus	5
1.4	Erythrozytäre Phase mit Erythrozytensequestration	8
1.5	Sequestration und Schizontenruptur	8
1.6	Antikörperstruktur	15
1.7	Hypothetische Immunitäts-Expositionskurve (a) und <i>Pf</i> -Immunität nach Populationsalter in endemischen Gebieten (b)	22
2.1	Gabun - Topographie	30
2.2	Studiengebiet	32
2.3	Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation	37
2.4	Optisches System des BD FACSCalibur	38
2.5	Spektren der verwendeten Fluorochrome	40
2.6	Das BD FACSCalibur am MRU Lambaréne	41
3.2	Geografische Verteilung der Studienpopulation – aktuelle Wohnorte aller eingeschlossenen Probanden nach GPS-Koordinaten.	46
3.1	Studienpopulation im Boxplot nach Alter und Geschlecht mit Angabe von Malariapräventionsmaßnahmen.	47
3.3	Probandenfluss im Diagramm	50
3.4	Kontingenztafel als Mosaikplot mit <i>Odds Ratio</i> – <i>Pf</i> -Infektion versus Anämie und <i>Pf</i> -Infektion versus Fieber	58
3.5	Darstellung von Blutbildparametern im Boxplot – Vergleich <i>Pf</i> -positiv versus <i>Pf</i> -negativ, eosinophile Granulozytenkonzentration versus GMZ2-IgG bzw. -IgM, jeweils mit Regressionsgerade	59
3.6	Geografische Verteilung der Studienpopulation – Einteilung in regionale Subpopulationen	62
3.7	IgG- und IgM-GMZ2-Reaktivität im Serum – Total und nach Subpopulationen	64
3.8	Fortsetzung von Abb. 3.7	65

3.9	Fortsetzung von Abb. 3.7	66
3.10	Vergleich der IgG-GMZ2-Reaktivität nach regionalen Subpopulationen und im Stadt-Land-Vergleich im Boxplot.	67
3.11	Vergleich der Immunglobulin M (IgM)-Hybridprotein aus <i>Glutamate-Rich Protein</i> und <i>Merozoite Surface Protein 3</i> (GMZ2)-Reaktivitäten nach regionalen Subpopulationen und im Stadt-Land-Vergleich im Boxplot.	68
3.12	Vergleich der IgG- und IgM-GMZ2-Reaktivitäten des <i>Plasmodium falciparum</i> (<i>Pf</i>)-positiven und <i>Pf</i> -negativen Probandenkollektivs im Boxplot.	69
3.13	FACS <i>gating</i> für die Isolation von klassischen und atypischen Memory-B-Zellen am Beispiel des PBMC-Isolats von MP070	71
3.14	Klassische und atypische IgG ⁺ GMZ2 ⁺ Memory-B-Zellen und IgG ⁺ GMZ2 ⁺ naive Vorläufer-B-Zellen im Boxplot.	72
3.15	GMZ2-reaktive klassische und atypische Memory-B-Zellen der Probanden MP036, MP070 und MP071 im Vergleich zu einer <i>Pf</i> -naiven Referenzprobe im Dotplot	73
3.16	B-Zellpopulationen gegen GMZ2 nach Subpopulationen im Histogramm	76
4.1	<i>Pf</i> -Neutralisation der Serum-IgG der Studienpopulation im Vergleich zu einer Chloroquine-Lösung	85
4.2	Weltweite Prävalenz der Malaria tropica – Entwicklung von 2000 über 2010 bis 2015 im Vergleich	90

Tabellenverzeichnis

1.1	Ig-Hauptklassen – Verteilung und Funktionen	16
2.1	Ein- und Ausschlusskriterien	31
2.2	Hardware und Software	33
2.3	Verbrauchsmaterial	33
2.4	Chemikalien, Lösungen, Nährmedien, Puffer, Reagenzien	34
2.5	Geräte	35
2.6	Schematische Darstellung der untersuchten Zellpopulationen	40
2.7	Zellmarkierungen A-C	41
3.1	Gesamtübersicht über die Studienpopulation – Demographische und epidemiologische Daten	47
3.1	Studienpopulation – Demographie und Epidemiologie (<i>Fortsetzung</i>)	48
3.1	Studienpopulation – Demographie und Epidemiologie (<i>Fortsetzung</i>)	49
3.2	Übersicht über positiv getestete Probanden – <i>Pf</i> -Parasitologie, Fieber und Malariapräventionsmaßnahmen	51
3.3	Gesamtübersicht über die parasitologische Diagnostik – <i>Pf</i> -Parasitologie, Fieber und Malariapräventionsmaßnahmen	51
3.3	Parasitologische Diagnostik – <i>Pf</i> -Parasitologie, Fieber und MPM (<i>Fortsetzung</i>)	52
3.3	Parasitologische Diagnostik – <i>Pf</i> -Parasitologie, Fieber und MPM (<i>Fortsetzung</i>)	53
3.5	Gesamtübersicht über die hämatologische Diagnostik	54
3.5	Gesamtübersicht über die hämatologische Diagnostik (<i>Fortsetzung</i>)	55
3.5	Gesamtübersicht über die hämatologische Diagnostik (<i>Fortsetzung</i>)	56
3.4	Blutbild mit Differentialblutbild – Deskriptive Analyse	57
3.6	IgG-GMZ2-Serumreaktivität – Deskriptive Analyse	60
3.7	IgM-GMZ2-Serumreaktivität – Deskriptive Analyse	60
3.8	IgG-GMZ2-Reaktivität im Stadt-Land-Vergleich – Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis-Test	69
3.9	IgM-GMZ2-Reaktivität im Stadt-Land-Vergleich – Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis-Test.	70

3.10 Vergleich der IgG- und IgM-Serumreaktivitäten gegen GMZ2 – Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	70
3.11 Deskriptive Analyse der im FACS- <i>gating</i> isolierten Lymphozyten und B-Zellen.	73
3.12 Deskriptive Analyse der durchflusszytometrischen ermittelten IgG ⁺ B-Zell-Populationen nach naiven und reifen B-Zellen, klassischen und atypischen Memory-B-Zellen	74
3.13 Deskriptive Analyse der durchflusszytometrischen ermittelten IgG ⁻ B-Zell-Populationen nach naiven und reifen B-Zellen, klassischen und atypischen Memory-B-Zellen	75

Abkürzungsverzeichnis

ADCI	<i>Antibody-Dependent Cellular Inhibition</i>
Ag	Antigen
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ACT	Artemisinin-Kombinationstherapeutika
AtM	Atypische Memory-B-Zellen
BC	B-Zellen
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
C_H	Konstanter Teil der schweren Immunglobulinpolypeptidkette
C_L	Konstanter Teil der leichten Immunglobulinpolypeptidkette
CM	Klassische Memory-B-Zellen
CRAN	<i>Comprehensive R Archive Network</i>
DMSO	Dimethyl Sulphoxide Hybri-Max
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIR	Entomologische Inokulationsrate
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunsorbent Assay</i>
FACS	Durchflusszytometer
FcRL	<i>Fc Receptor-Like Protein</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenzkanäle
FSC	<i>Forwardscatter</i>
GLURP	<i>Glutamate-Rich Protein</i>
GMZ2	Hybridprotein aus <i>Glutamate-Rich Protein</i> und <i>Merozoite Surface Protein 3</i>
GPS	<i>Global Positioning System</i>
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
Hb	Hämoglobin
HRP-2	<i>Histidine-Rich Protein 2</i>
ID	Identifikationsnummer
Ig	Immunglobuline

IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
INF	Interferon
ITN	Insektizid-imprägnierte Moskitonetze
i. v.	Intravenös
LED	Leuchtdiode
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>
MBC	Memory-B-Zellen
MCH	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mIg	Membranständige Immunglobuline
MPI	Max-Planck Institut für Infektionsbiologie Berlin
MPM	Malariapräventionsmaßnahmen
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
MRU	<i>Medical Research Unit</i> (Medizinische Forschungseinrichtung)
MSP3	<i>Merozoite Surface Protein 3</i>
MW	Mittelwert
NK	Natürliche Killerzellen
P.	<i>Plasmodium</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Periphere mononukleare Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-F	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 2 % fetalem Kälberserum
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> -Erythrozytenmembranprotein 1
PfSPZ	<i>Plasmodium falciparum</i> -Sporozoit
PK1	<i>Point Kilométrique</i> (Distanz zum Beginn der Bundesstraße)
pLDH	Parasitäre Laktatdehydrogenase

post-GC	Aus der Keimzentrumsreaktion (<i>germinal center</i>) hervorgegangene B-Zellen
RPMI	Zellkulturmedium für Leukozyten
RDT	<i>Rapid Diagnostic Tests</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rt.	<i>Route</i> (Bundesstraße)
SSC	<i>Sidescatter</i>
SD	Standardabweichung
Strep-HRP	Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Streptavidin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
V_H	Variabler Teil der schweren Immunglobulinpolypeptidkette
V_L	Variabler Teil der leichten Immunglobulinpolypeptidkette
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Malaria

Malaria ist eine lebensbedrohliche, in tropischen Weltregionen hochendemische, durch Stechmücken übertragene parasitäre Infektionskrankheit. Sie zählt heute neben dem humanen Immunodefizienz-Virus (HIV) bzw. Aids und Tuberkulose zu den größten Herausforderungen des internationalen Gesundheitswesens. Die Infektion wird durch sogenannte Plasmodien übertragen. *Plasmodium falciparum* wird als Verursacher der *Malaria tropica* mit der höchsten Mortalitätsrate die größte Bedeutung zugeschrieben.[212]

1.1.1 Historischer Hintergrund

Der Begriff Malaria (*mal'aria* = "schlechte Luft") entstammt dem mittelalterlichen Latein. Die Erkrankung wurde früher landläufig aufgrund ihres räumlichen Bezugs zu Sümpfen und Marschland und seines schubweisen Fiebertverlaufs auch als Sumpf- oder Wechselieber bezeichnet. 1880 legte Alphonse Laveran mit der Identifikation von Plasmodien im Blut den Grundstein der modernen Malariaforschung.[98] 1927 konnte Wagner-Jauregg mit seiner "Malariatherapie" für Neurosyphilispatienten zeigen, dass eine Immunität gegen Malaria im Menschen induzierbar ist, was in den folgenden Jahrzehnten durch zahlreiche Studien bestätigt werden konnte.[36, 86]. Cohen et al. (1961) und weitere Autoren zeigten anhand passiver Serumtransferexperimente, dass Antikörper dabei eine zentrale Rolle in der Entwicklung der natürlich erworbenen Malariaimmunität spielen.[32, 160, 168]

1.1.2 Geographische Verteilung der *Malaria tropica*

Malaria ist in einer breiten Fläche um den Äquator, dem sogenannten Malariagürtel, endemisch verbreitet. Es werden drei Endemietypen unterschieden: Die stabile endemische Malaria, in der die Bevölkerung konstanten Malariainfektionsraten ausgesetzt sind; die instabile endemische Malaria, mit einem mehr oder weniger konstanten, zeitlich schwankendem Malariarisiko; und der epidemischen Malaria, in der eine Gruppe von Individuen plötzlich, oft aufgrund atypischer Klimabedingungen oder Migration, einem stark erhöhten Malariarisiko ausgesetzt sind. Die Gebiete

stabiler und instabiler Malaria entsprechen den tropischen Weltregionen (s. Abb. 1.1). Sie zeichnen sich durch tropisches Klima mit durchgehend hohen Temperaturen, hoher Luftfeuchtigkeit und hohen Niederschlagsmengen in Verbindung mit stehenden Wasserflächen aus, die den übertragenden Stechmücken konstant gute Brutstätten bieten. In trockeneren Regionen treten endemische Malariaausbrüche meist nur während der Regenzeit auf. Das Malariarisiko wird insgesamt in ländlichen Gebieten höher, als in Städten angegeben.[30]

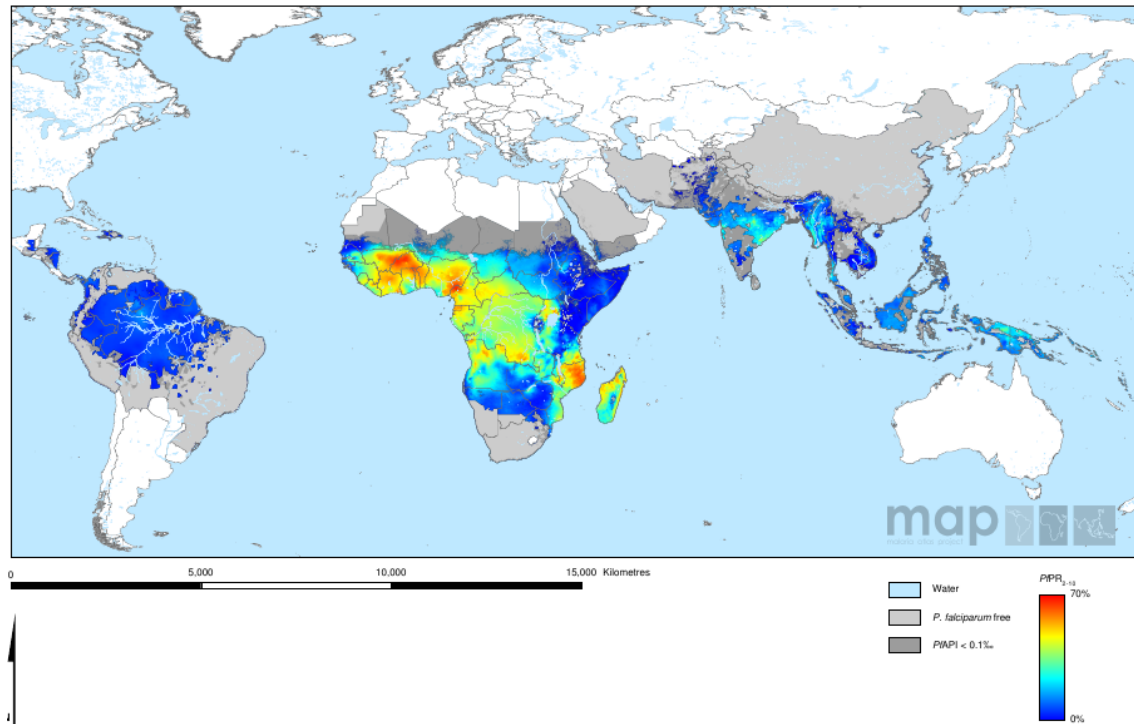


Abb. 1.1: Weltweite Prävalenz der *Malaria tropica* innerhalb der stabilen Übertragungsgrenze, 2010. Der abgebildete Kennwert ($PfPR_{2-10}$) ist die nach Alter genormte *P. falciparum* Parasitenrate. Sie beschreibt den geschätzten Anteil zwei bis zehn Jahre alter Individuen der Allgemeinbevölkerung, die auf das Jahr 2010 gemittelt jeweils mit *P. falciparum* infiziert waren.[108]

1.1.3 Bedeutung

Nahezu 50 % der Weltbevölkerung (3,2 von über 7,3 Mrd. Menschen 2015) sind dem Risiko ausgesetzt an Malaria zu erkranken. 2015 wurden laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 214 Mio. Neuerkrankungen mit insgesamt 438.000 Todesfällen, davon über 80 % in Afrika, verzeichnet.[212, 191] Andere Autoren bezifferten die Anzahl der Todesfälle im Jahr 2010 auf auf 1,24 Mio, die WHO im Vergleich auf 650.000. Dies zeigt die Unsicherheit bei der Schätzung der durch Malaria verursachten Krankheitslast.[125, 209] In hochendemischen Gebieten haben schwangere Frauen und Kinder im ersten bis fünften Lebensjahr ein besonders hohes Risiko

schwer zu erkranken. So treten 78 % der tödlichen Verläufe bei Kindern in dieser Altersgruppe auf.[211]

Malaria wirkt sich zudem negativ auf die wirtschaftliche Entwicklung der betroffenen Regionen aus. Der durch Malaria verursachte direkte finanzielle Schaden (z. B. aufgrund von Krankheitslast, Arbeitsausfall, Therapiekosten oder frühem Tod) wird in Afrika auf ca. 12 Mrd. US \$ pro Jahr geschätzt und hemmt das Wirtschaftswachstum jährlich um schätzungsweise 1,3 %.[65, 184] Weltweit wurden zur Bekämpfung der Endemie 2013 zusätzlich 2,7 Mrd. US \$ investiert.[211]

Zur Eindämmung bzw. Ausrottung der Erkrankung wird eine dreiteilige Ausrottungsstrategie aus (1) aggressiver Kontrolle in hochendemischen Gebieten zur Reduktion der Transmission und Sterblichkeit; (2) progressiver Elimination in den niedrigendemischen Randgebieten; und (3) Erforschung möglicher Medikamente, Impfstoffe, Diagnoseverfahren, Insektizide und anderer Interventionen verfolgt.[62] Dazu zählen die primäre Vektorkontrolle durch Insektizid-imprägnierte Moskitonetze (ITN) und Innenraum-Insektizide, diagnosebasierte Therapien mithilfe von Schnelltests und effektiven Artemisinin-Kombinationstherapeutika (ACT) und die Entwicklung effektiver Impfstoffe. Insbesondere bezüglich Punkt (1) konnten in den letzten zwei Jahrzehnten Erfolge verzeichnet werden: die um das Bevölkerungswachstum bereinigte Malariainzidenz sank laut der WHO zwischen 2000 und 2015 um 37 %, die Malariasterblichkeit im gleichen Zeitraum über alle Altersgruppen um 66 % und um über 70 % bei Kindern unter fünf Jahren.[212]

Doch ist anzuzweifeln, ob die internationale Gemeinschaft ihre Ziele zur Malariaeliminierung erreicht. In einigen Regionen sind trotz des positiven WHO-Resümees aus 2010 Steigerungen der Inzidenz erfasst worden.[139, 23] Die oft schlechten infrastrukturellen Voraussetzungen der Gesundheitssektoren in endemischen Regionen erschweren es, oben genannte präventive Maßnahmen allgemein zugänglich zu machen. Es werden darüber hinaus zunehmend Resistenzentwicklungen von Mücken gegen die meisten eingesetzten Insektizide bzw. von Plasmodien gegen Malariatheapeutika der ersten Wahl verzeichnet.[130, 45] Trotz aller Bemühungen sind auch aufgrund des derzeit verzeichneten Bevölkerungswachstums in tropischen Weltregionen zunehmend mehr Menschen dem Malariarisiko ausgesetzt.[75]

Es bedarf zusätzlicher Strategien der Infektions- bzw. Morbiditätsreduzierung, z. B. im Bereich der Impfstoffentwicklung, um Malaria nachhaltig kontrollieren und gegebenenfalls ausrotten zu können.[125]

1.2 Malaria tropica und ihr Erreger *Plasmodium falciparum*

1.2.1 Erreger

Malariainfektionen werden durch parasitäre Plasmodien hervorgerufen. Plasmodien sind einzellige, obligat intrazelluläre Protozoen. Zu den insgesamt vier humanpathogenen Erregern zählen *Plasmodium* (*P.*) *falciparum* (s. Abb. 1.2), *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*. [143] Auch das vornehmlich Affen befallende *P. knowlesi* kann Infektionen im Menschen verursachen. [159] *P. falciparum* verursacht 91 % aller Malariafälle weltweit, davon 86 % in afrikanischen Endemiegebieten. *P. falciparum* verursacht darüber hinaus die mit Abstand höchsten Komplikations- und Mortalitätsraten und zeigt das höchste Resistenzprofil aller humanpathogenen Varianten. [143, 211]

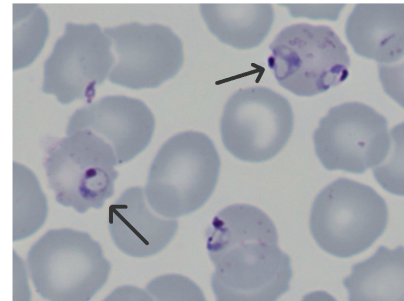


Abb. 1.2: Pf-Malaria – Blutausstrich. [3]

Vektoren des *Plasmodium falciparum*

P. falciparum kann den Menschen über einen Vektor oder in seltenen Fällen über parenterale Verabreichung (z. B. Bluttransfusionen) infizieren. In den meisten Fällen wird er über den Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke übertragen. Sie gehört zur Familie der Stechmücken (*Culicidae*). [209]

Die Eier der *Anopheles*-Mücke entwickeln sich unter feucht-warmen Bedingungen innerhalb von 5-14 Tagen zu ausgereiften Mücken. Sie sind nachtaktiv (v. a. dämmerungsaktiv) und ernähren sich überwiegend von Pflanzensäften. Nur die weibliche Mücke benötigt tierisches bzw. menschliches Blut zur Proteinaufnahmen für ihre Ovarreifeung. [26] Ein in Afrika häufig vorkommender Malariavektor ist *Anopheles gambiae*. Sie überträgt überwiegend *P. falciparum* und ist aufgrund ihrer langen Lebensdauer, ihrer bevorzugten Ernährung von menschlichem Blut und aufgrund ihres Lebensraums nahe menschlicher Behausungen einer der effizientesten und damit für den Menschen gefährlichsten Malariavektoren. [78] In Lambaréné und Umgebung sind *Anopheles gambiae*, *Anopheles moucheti* und *Anopheles funestus* häufig anzutreffende Vektoren. [180]

Lebenszyklus des *Plasmodium falciparum*

P. falciparum durchläuft während seiner Entwicklung einen komplexen Lebenszyklus mit zehn morphologischen Übergängen in fünf verschiedenen Geweben: eine ungeschlechtliche (asexuelle) Reproduktion in einem Wirbeltier (Zwischenwirt, in unserer

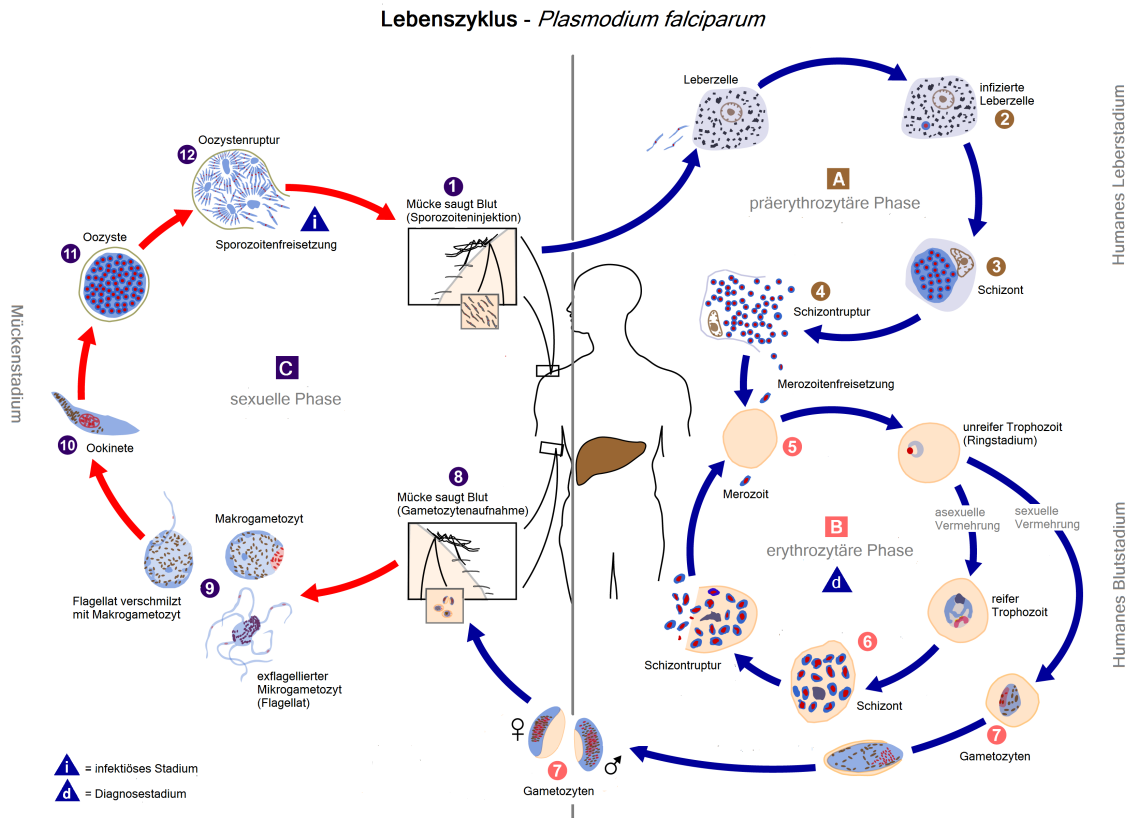


Abb. 1.3: Lebenszyklus – (1) Anopheles-Mücke inokuliert Sporozoiten; (2) Sporozoit infiziert Leberzelle; (3) Sporozoit reift zu Schizont; (4) Schizont rupturiert, setzt Merozoiten in Blutkreislauf frei. Übergang vom Leberstadium (A) zum Blutstadium (B). (5) Merozoit infiziert Erythrozyt; (6) ringförmiger Trophozoit reift zu asexuellem reifem Trophozoiten, vermehrt sich zu Schizont, rupturiert und setzt Merozoiten in Blutstrom frei; (7) einzelne Trophozoiten entwickeln sich parallel zu Keimzellen. Wechsel vom Blutstadium zum Mückenstadium (sexuelle sporogonische Phase) (C). (8) Mikrogametozyt (männlich) und Makrogametozyt (weiblich) werden von Mücke aufgenommen; (9) Mikrogametozyt verschmilzt mit Makrogametozyten zur Zygote; (10) Zygote entwickelt sich zu Ookinete, wandert in Wand des Mitteldarms, entwickelt sich zur Oozyste; (11) Oozyste wächst, rupturiert und setzt Sporozoiten frei; (12) Sporozoiten wandern in Speicheldrüse der Mücke. Bearbeitete Abbildung aus [27]

Betrachtung dem Menschen) wechselt sich dabei mit einer obligaten geschlechtlichen (sexuellen) Reproduktion in der *Anopheles*-Mücke (Endwirt) ab.[27] Nachfolgenden werden die verschiedenen Entwicklungsstadien und -phasen, angelehnt an Abbildung 1.3, näher erläutert, um ein Grundverständnis für mögliche Angriffspunkte des menschlichen Immunsystems gegen *P. falciparum* zu vermitteln.

Asexuelle Phase im Menschen (Schizogonie) Eine Mücke injiziert während eines Blutmahls asexuelle Sporozoiten in oberflächliche Kapillaren und die menschliche Haut (1), wo die Sporozoiten bis zu 6 Stunden verbleiben können.[218] Ca. ein Drittel der Sporozoiten gelangt über die Lymphe in lokale Lymphknoten. Dort degradiert ein Großteil. Einige Sporozoiten können bis zu 24 Stunden in den Lymphknoten überleben und sich dort zu Merozoiten entwickeln, ein Prozess der in nicht zueinander adaptierten Modellen auch für Sporozoiten in der Dermis, Epidermis und in Haarfollikeln beschrieben wurde.[5, 72] Der Großteil der Sporozoiten gelangt jedoch über den Blutstrom in die Leber und invadiert dort Hepatozyten (2).[153] Nach mehreren Zellteilungen reifen die Parasiten zu Leber-Schizonten, die intrazellulär durchschnittlich 30.000 Vorläufer-Merozoiten enthalten (3).[123] Dieses sogenannte präerythrozytäre Leberstadium (A) wird nach 5,5-7 Tagen durch eine Ruptur der Schizonten vom erythrozytären Stadium (B) abgelöst. Dabei werden Merozoiten in sogenannten Merosomen, mit Parasiten gefüllten Vesikeln mit körpereigener Zellmembran, in den Blutstrom freigesetzt (4), um dort das Merosom zu verlassen und Erythrozyten zu befallen.[177]

Die nun im Blutstrom zirkulierenden Merozoiten (5) invadieren über eine spezifische Interaktion zwischen Liganden auf der Merozoitenoberfläche und Rezeptoren auf der Erythrozytenmembran innerhalb kürzester Zeit (ca. 60 s) Erythrozyten.[73] Intraerythrozytär entwickeln sich die Parasiten in parasitophoren Vakuolen über ein unreifes Ringstadium zu Trophozoiten und schließlich zu Schizonten (6).[105] Jeder Schizont produziert durch mitotische Teilungen jeweils ca. 20-30 Merozoiten. Nach Abschluss eines erythrozytären Zyklus (jeweils 43-48 h) rupturieren die mit Schizonten infizierten Erythrozyten und setzen dadurch Merozoiten in den Blutstrom frei. Ein weiterer erythrozytärer Zyklus (s. o.) schließt sich an.[37]

Die Dichte *Pf*-infizierter Erythrozyten im Blut, die sogenannte Parasitämie, variiert im individuellen Vergleich stark über den zeitlichen Verlauf. Über die oben beschriebenen wiederkehrenden Vermehrungszyklen entsteht ein exponentielles Wachstum der *Pf*-Biomasse im menschlichen Organismus. In der Regel steigt die Biomasse logarithmisch an, bis sie auf Tage bis Wochen einem Plateau verweilt und dann allmählich wieder abnimmt.[46] Mikroskopisch sind *Pf*-Infektionen erst ab einer Bio-

masse von etwa 10^8 *Pf*-infizierten Erythrozyten im Blut nachweisbar, was einer Parasitämie von 10-20 Parasiten pro μl entspricht.[165, 46]

Sexuelle Phase im Menschen Die *Pf*-Transmission in den Mückenvektor beginnt im menschlichen Vektor durch die Heranreifung sexueller Parasitenstadien, den sogenannten Gametozyten. Sie sind das Ausgangsstadium der sexuellen genetischen Rekombination und dienen als Transmissionsform in den Mückenorganismus. Schon während des Beginns des asexuellen Blutstadiums differenziert ein kleiner Anteil intraerythrozytärer asexueller Merozoiten zu Gametozyten; es wird angenommen, dass auch vereinzelte Merozoiten aus Leberschizonten zu Gametozyten heranreifen können. Der Zyklus der Gametozytenreifung ähnelt mit Zyklen aus intraerythrozytärer Reifung, Schizontenruptur und Invasion freier Erythrozyten den asexuellen Blutstadienzyklen, ist mit ca. acht Tagen jedoch länger. Ein erythrozytärer Schizont differenziert in der sexuellen Reifung entweder in männliche (Mikro-) oder weibliche (Makro-) Gametozyten. Vom asexuellen Parasitenstadium bis zum reifen Gametozyten werden fünf morphologische Substadien durchlaufen (7).[13]

7-15 nach Tage nach dem ersten erythrozytären Zyklus zirkulieren reife Gametozyten im Verhältnis von ca. 1:159 zu asexuellen Stadien für einige Tage bis zu wenigen Wochen im peripheren Blut. Mücken können diese aufnehmen (C) und nach einer plasmodialen sexuellen Reifung erneut in die menschliche Haut injizieren.[56].

Sexuelle Phase in der Mücke (Sporogonie) Die Mücke nimmt Plasmodien auf, indem sie Blut eines infizierten Menschen saugt (C). Der Wirtswechsel der Parasiten zur Mücke ist nur in intraerythrozytär-gametozytärer Form möglich. Sie werden mit der Blutmahlzeit in den Mitteldarm der Mücke aufgenommen (8), wo sie durch das veränderte Außenmedium aktiviert werden. Die Gametozyten verlassen nun die Erythrozyten und reifen zu weiblichen Makrogameten und männlichen Mikrogameten heran. Die Mikrogameten verschmelzen mit den Makrogameten zu Zygoten (9), die zu beweglichen Ookineten (10) heranreifen. Die sexuelle Reifung der Plasmodien ist hiermit abgeschlossen. Die ausgereiften Ookineten wandern in die Wand des Mitteldarms der Mücke ein, wo sie zur Oozysten heranreifen und schließlich rupturieren (12). Dabei werden intrazellulär gebildete Sporozoiten freigesetzt, die nun in die Speicheldrüse der Mücke einwandern. Ein neuer Zyklus beginnt mit der Beimpfung eines neuen oder desselben Zwischenwirtes während eines Blutmahls. [95]

Adaptationsmechanismen des *Plasmodium falciparum* an den humanen Wirt

Das Genom von *P. falciparum* hat sich über Jahrtausende evolutionsbiologisch an das menschliche Immunsystem, den Mückenvektor und Umweltfaktoren angepasst. *P. falciparum* hat dabei Adaptationsmechanismen entwickelt, die ihm ermöglichen das menschliche Immunsystem auf hochkomplexe Weise zu umgehen bzw. auszuschalten und Resistenzen gegen einen hohen Anteil an verfügbaren Medikamenten und Insektiziden hervorzubringen.[161, 103]

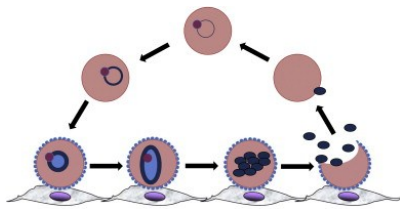


Abb. 1.4: Erythrozytäre Phase mit Erythrozytensequestration.[61]

Plasmodien halten sich jeweils nur kurzweilig als Sporozoiten oder Merozoiten außerhalb von Hepatozyten oder Erythrozyten auf.[34] Intraerythrozytäre Plasmodien im Trophozoitenstadium können sequenziell Oberflächenmoleküle exprimieren, die in die Außenmembran *Pf*-infizierter Erythrozyten integriert werden, um an andere Zellen (Zytoadhärenz) oder Endothelzellen (Sequestration) adhärieren zu können.[105, 117] Intrazelluläre Plasmodien sind dadurch deutlich besser vor der Immunabwehr des Wirtes geschützt. Vom Immunsystem erkannte und opsonierte *Pf*-infizierte Erythrozyten gelangen erst über den Blutstrom in die Milz, wo sie ausgesondert und phagozytiert werden. Durch die Sequestration kann sich *P. falciparum* in der zweiten Hälfte eines erythrozytären Zyklus (24-43 h), wenn die befallenen Erythrozyten morphologisch und biochemisch stark modifiziert sind und so vom Immunsystem leichter erkannt werden, dem Blutfluss und damit den zirkulierenden Immunzellen und der phagozytären Clearance in der Milz entziehen.[103]

Antigenvariation des *Plasmodium falciparum* Die parasitär exprimierten Oberflächenmoleküle werden über variante Genfamilien kodiert, wodurch ein großer Pool an morphologisch unterschiedlichen Oberflächenstrukturen *Pf*-infizierter Erythrozyten entsteht. Es sind bislang die *var*-, *rif*-, *stevor* und *Pfmc-2TM*-Genfamilien mit respektive 60, 149, 28 und elf Genen erforscht. Erste kodieren für Varianten des *Plasmodium falciparum*-Erythrozytenmembranprotein 1 (PfEMP1). PfEMP1-Proteine dienen der Sequestration über Adhäsion an Rezeptoren mikrovaskulärer Endothelien in Kapillaren und postkapillären Venolen (s. Abb. 1.5).[25, 105, 104, 197]



Abb. 1.5: Sequestration an Endothelien; Schizontenruptur mit Freisetzung von Merozoiten.[73]

Die Sequestration bzw. die Zytoadhärenz sind, neben dem Mechanismus der Immunevasion, lokal bedeutende pathogene Faktoren der schweren Malaria.[161] *P. falciparum* reagiert auf Veränderungen in der Wirtsimmunität mit Modulation der oben genannten Oberflächenproteine und kann somit in jedem Zyklus morphologisch neue *Pf*-Varianten hervorbringen. Neue Klone können vom Immunsystem unzureichend erkannt zunächst relativ widerstandslos expandieren und eine neue Parasitämiewelle induzieren.[161, 103] *P. falciparum* kann folglich eine lang andauernde chronische Infektion mit sukzessiven Parasitämiewellen etablieren oder ein Individuum wiederholt infizieren.[161]

1.2.2 Pathogenese

Das Leberstadium, erstes Stadium einer *Pf*-Infektion, verläuft klinisch stumm. Erst eine Vermehrung der Parasiten im Blut führt besonders bei nicht-immunen Individuen zum klinischen Bild der Malaria.[46]

Durch die Schizontenruptur hämolysieren Millionen infizierter Erythrozyten und schwemmen wirtseigene und parasitäre Stoffe in den Blutkreislauf aus, die eine Freisetzung körpereigener proinflammatorischer Zytokine und damit ein unspezifisches Fiebersyndrom induzieren.[104, 156]

Nur ein Teil der Infektionen geht in eine einer Sepsis ähnelnden Multisystemerkrankung über.[104] Letztere ist hochkomplex und bis heute nicht vollständig verstanden.[117] Die Zytoadhärenz und Sequestration der infizierten Erythrozyten können eine verstärkte Endothelaktivierung, Ko-Sequestration von Blutelementen, endotheliale Dysfunktion und mikrovaskuläre Zirkulationsstörungen mit hämostatischer Dysfunktion und lokaler Hypoxämie auslösen.[61] Die Hämolysen führt zwar zur direkten Zerstörung von Erythrozyten, doch sind parallel ablaufende Prozesse wie die intra- und extravasale Hämolysen nicht infizierter Erythrozyten wesentlich an der Entstehung einer schweren Malariaanämie beteiligt.[104, 217, 219] Letztendlich wird ein schwerer Verlauf durch eine hämostatische Dysfunktion (mechanisch) und eine dysregulierte oder überschießende Entzündungsantwort mit Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen (immunologisch) verursacht.[40, 97] Eine schwere Anämie, zerebrale Malaria, metabolische Azidose, Hypoglykämie, disseminierte intravasale Gerinnung, Nierenfunktionsstörung, Ikterus und andere Organkomplikationen können die Folge sein.[33, 73, 117, 145, 174]

1.2.3 Klinik

Die Klinik der Malaria *tropica* ist sehr heterogen. Die mangelnde Spezifität der Symptomatik führt häufig zu einer “Überbehandlung” von nicht-Malariafällen in hoch-

endemischen Gebieten und zu Komplikationen durch zu späte Diagnosestellung in niedrigendemischen Gebieten.[100] Bei typischen Infektionen beginnen die klinischen Symptome frühestens neun Tage nach Inokulation.[193] Die klinische Ausprägung und Prognose der Erkrankung hängen vom Patientenalter (v. a. Kleinkinder), einer möglichen Schwangerschaft, dem Immunstatuts, der Wirts- und Erregergenetik, einer möglichen Organbeteiligung und von dem Beginn einer wirksamen pharmakologischen Therapie ab.[205] Es wird zwischen folgenden Ausprägungen unterschieden.

Akute unkomplizierte Malaria Die akute unkomplizierte *Pf*-Malaria entsteht durch die exponentielle Expansion der Parasitenpopulation im Blutstadium bis zu etwa 100.000 Parasiten/ μ l Blut und verursacht ein Fiebersyndrom, das dem eines systemischen viralen Infektes ähnelt. Häufige Symptome sind Fieber und eines oder mehrere der folgenden Symptome: Schüttelfrost und Schwitzen, Kopfschmerzen, Gelenk- oder Muskelschmerzen, Übelkeit oder Erbrechen, wässrige Diarrhö, Anämie, leichtgradiger Ikterus und eventuell eine Hepatosplenomegalie bei Kindern. Ein klassisches Malariasyndrom mit einer schubweisen Periodik von zwei bis drei Tagen ist bei der *Pf*-Malaria selten zu beobachten, da sie durch multiple asynchrone Parasitenkohorten überlagert ist.[46, 71, 205] Anämien werden bei Kleinkindern aufgrund sich wiederholender Reinfizierungen in endemischen Regionen häufig auch im beschwerdefreien Intervall beobachtet.[73]

Akute komplizierte Malaria Wird bei nicht-immunen Individuen nicht unverzüglich oder nicht effektiv pharmakologisch interveniert, kann die Erkrankung in eine akute komplizierte Malaria mit schweren bis letalen sepsisähnlichen Verläufen übergehen. Schwere Malariaanämien, zerebrale Malaria und Atemnotsyndrome verursachen dabei die höchste Morbidität und Mortalität.[205]

Chronische Malaria Eine chronische Malaria ist durch niedrige, fluktuierende Parasitämien gekennzeichnet und tritt hauptsächlich in Personen mit partieller Immunität auf. Symptomfreie Intervalle wechseln sich mit intermittierenden in ihrer Frequenz regredienten Fieberepisoden ab, bis die *Pf*-Infektion, wahrscheinlich meist erst nach einigen Monaten, vom Körper eliminiert werden kann. Chronische Infektionen gehen oft mit Anämie und Splenomegalie einher.[205]

Asymptomatische *Pf*-Infektionen Insbesondere in Gebieten ganzjähriger Transmission weisen viele sogenannte semi-immune Individuen häufig asymptomatische *Pf*-Infektionen mit sehr niedrigen Parasitämien auf. Auch wenn klinisch stumme Infektionen keine Gefahr für das Individuum darstellen, haben sie als Erregerpool

einen Einfluss auf die Transmissionsdynamik in der jeweiligen Region. Weit verbreitete Diagnosekriterien einer asymptomatischen Malaria sind ein mikroskopischer Parasitennachweis (s. 1.2.4) bei Fieberfreiheit und Abwesenheit anderer Malariasymptome. Problematisch sind dabei mikroskopisch oft nicht nachweisbare subpatente Parasitämien und primär asymptomatische Verläufe, die erst verzögert Symptome provozieren.[39, 96]

1.2.4 Diagnostik

In der Routine-*Pf*-Diagnostik werden Plasmodien bzw. ihre Antigene im peripheren Blut nachgewiesen.

Verfahren Goldstandard ist der lichtmikroskopische Nachweis von Parasiten im dicken Blut tropfen (*Plasmodium*-Nachweis) und dünn ausgestrichenen Blut tropfen (Spezies-Nachweis) mit Giemsa-Färbung. Sie erlauben eine verlässliche Quantifizierung der Parasiten im Blut (Plasmodien/ μ l). Nachteilig ist die relativ geringe Sensitivität bei sehr niedrigen Parasitenraten, z. B. asymptomatischer Individuen, und die Abhängigkeit von der Expertise des Untersuchers.[141, 136] Eine neues mikroskopische Verfahren ist die bei Tageslicht durchführbare LED-Fluoreszenzmikroskopie. Sie ist schnell, präzise und kostengünstig, allerdings sind gemischte Plasmodieninfektionen schlechter zu diagnostizieren und Präparate müssen in der Regel direkt nach der Färbung untersucht werden.[99]

Schnelltests *Rapid Diagnostic Tests* (RDT) sind schnell (< 15 min) und ohne große Expertise durchführbar. Immuno-chromatographische Banden mit fixierten Antikörpern (Ak) binden *Pf*-Antigene aus einem Tropfen Patientenblut.[215] Meist werden Ak gegen *Histidine-Rich Protein 2* (HRP-2)- oder Parasitäre Laktatdehydrogenase (pLDH)-Antigene eingesetzt. HRP-2-Ak-Tests sind sensitiver, als pLDH-Ak-Tests, allerdings weniger spezifisch, da sie bis zu einigen Wochen nach einer behandelten Infektion positiv ausfallen können. RDT können daher keine validen Rückschlüsse über einen Behandlungserfolg oder Reinfektionen liefern, sind teurer, als mikroskopische Verfahren und ermöglichen darüber hinaus keine exakte Quantifizierung der Parasitämie. Zudem verfügen sie nur über eine eingeschränkte Haltbarkeit und müssen trocken gelagert werden, was in tropischen Regionen durchaus ein Problem darstellen kann.[1]

Molekularbiologische Verfahren *Polymerase Chain Reaction* (PCR) basierte Verfahren haben die höchste Spezifität und Sensitivität und sind besonders bei niedrigen

Parasitämien ($\leq 0,0001$ % *Pf*-infizierte Erythrozyten) asymptomatischer Träger und bei gemischten Plasmodieninfektionen im Vorteil.[119] Studien konnten zeigen, dass zum Teil zwei Drittel mikroskopisch negativer Proben in der PCR positiv getestet werden konnten.[96] Für die Detektion und Therapie asymptomatischer Individuen wären daher standardisierte PCR-basierte Diagnoseverfahren mit longitudinalem klinischen Follow-up sinnvoll. Die Nachteile der PCR liegen jedoch in der Komplexität der Durchführung, ihren hohen Anschaffungs- und Verfahrenskosten sowie des längeren Zeitintervalls zwischen Probenentnahme und Ergebnis.[39, 96]

Eine Alternative bietet das Verfahren der *Loop Mediated Isothermal Amplification*. Es weist das 18S-Ribosomen-RNA-Gen von *Pf* nach und ist einfacher und kostengünstiger durchführbar, als die PCR und dennoch hochsensitiv. In der Forschung angewandte Verfahren, wie das *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), Immunfluoreszenz-Antikörper-Verfahren und *Quantitative Buffy Coat*, werden in der Regel nicht in der Routinediagnostik angewandt.[151]

1.2.5 Therapie

Die Auswahl an Malariamedikamenten ist begrenzt. ACT sind erste Wahl bei der Therapie der unkomplizierten Malaria in Endemiegebieten.[209] Artemisinine greifen Frühstadien der erythrozytären Phase an, bevor diese heranreifen und sequestrieren können. Sie werden aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit mit länger wirksamen Quinolinen oder Antifolaten kombiniert.[47] ACT haben einen schnellen Wirkungseintritt, müssen nur wenige Tage eingenommen werden und bringen relative wenig plasmodiäre Resistenzen hervor.[206] Dihydroartemisinin-Piperaquin, Artesunat-Amodiaquin und Artemether-Lumefantrin sind in der klinischen Anwendung hochwirksame ACT, wobei die letzteren beiden Kombinationspräparate am häufigsten eingesetzt werden. [7] Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin werden mittlerweile aufgrund weit verbreiteter Resistenzen nur bei sehr wenigen Indikationen verwendet.[206]

Erste Wahl bei der Therapie der komplizierten Malaria ist laut *The Cochrane Library* Artesunat i. v., alternativ kann auch Chinin i.v. verabreicht werden.[166] Zusätzlich müssen Komplikationen jeweils supportiv symptomatisch behandelt werden.[42]

Es existieren mittlerweile in der klinischen Anwendung insbesondere durch Monotherapien induzierte Resistenzen gegen jedes zugelassene Malariamedikament, auch gegen die Artemisinin-Derivate. Laut WHO sollten daher keine reinen Artemisinin-Medikamente mehr produziert werden.[209] Westkambodscha ist die erste Region, in der auch die Effektivität der ACT deutlich abgenommen hat. Es ist unklar welche Faktoren hierzu geführt haben und inwieweit Artemisinin-Resistenzen und Resistenzen gegen Kombinationspräparate eine Rolle spielen.[47]

1.3 Das menschliche Immunsystem

Der menschliche Körper reagiert auf eine Infektion durch Pathogene mit einer Immunantwort, die von Funktionsträgern des Immunsystems gebildet wird. Letztere sind in der Lage Pathogene zu erkennen und zu zerstören, sich selbst zu regulieren und ein immunologisches Gedächtnis (Memory) zu generieren. Es wird dabei zwischen unspezifischer angeborener und spezifischer adaptiver Immunität unterschieden.[91] Die Arbeit legt den Fokus auf ausgewählte adaptive immunologische Prozesse, die im Folgenden im Kontext anderer immunologischer Mechanismen näher erläutert werden.

1.3.1 Angeborene (unspezifische) Immunantwort

Die angeborene Immunantwort ist bei Pathogenkontakt unmittelbar verfügbar und kann Pathogene an bestimmten molekularen Mustern (den sog. *Pathogen-Associated Molecular Pattern* - PAMP) abwehren und wird von Immunzellen (Leukozyten) und dem Komplementsystem gebildet. Sie ist fundamental für eine verzögert einsetzende adaptive Immunantwort, erkennt jedoch nicht alle Pathogene als solche und generiert kein immunologisches Memory, das vor Reinfektionen schützen würde (s. 1.3.2). Zu den Leukozyten der angeborenen Immunantwort zählen Phagozyten (Monozyten bzw. Makrophagen), Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile), dendritische Zellen, proinflammatorische Mastzellen und Natürliche Killerzellen (NK). Sie erkennen molekulare Muster auf Pathogenen bzw. von zerstörten körpereigenen Zellen freigesetzte Moleküle über *Pattern Recognition Receptors*. Makrophagen und dendritische Zellen nehmen dabei unter anderem Proteine und andere Pathomoleküle, sogenannte Antigen (Ag) am Infektionsherd auf und migrieren über den Blutfluss in sekundäre lymphatische Organe (u. a. Milz, Lymphknoten). Dort aktivieren sie als Antigenpräsentierende Zellen (APC) Zellen der adaptiven Immunantwort durch Zytokine und auf der Oberfläche präsentierte Antigenpeptide im sogenannten *Major Histocompatibility Complex* (MHC).[91]

1.3.2 Adaptive (spezifische) Immunantwort

Die adaptive Immunantwort wird lebenslang als Anpassung des Körpers an Infektionen mit Pathogenen entwickelt. Sie wird durch Lymphozyten und ihre Produkte (s. humorale Immunantwort) generiert und setzt typischerweise ca. 4-5 Tagen nach Erstinfektion ein.

Grundprinzip der adaptiven Immunantwort ist die lymphozytäre klonale Selektion: jeder Lymphozyt bringt nur einen Antigenrezeptortyp mit einer einzigartigen Spe-

zifität hervor; eine hochaffine Bindung des Rezeptors mit Antigenen bzw. -peptiden führt zu einer Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten zu voll funktionsfähigen Effektorzellen; Lymphozyten, die ineffektiv oder autoreaktiv sind, werden schon in frühem lymphoiden Entwicklungsstadium eliminiert. Einige Lymphozyten differenzieren zu Gedächtnisklonen (sog. Memory-Zellen). Sie ermöglichen eine schnellere und effektivere Abwehr bei Reinfektionen und somit eine lang andauernde, bis zu lebenslange protektive Immunität gegen ein spezifisches Pathogen.

Lymphozyten werden in B- und T-Zellen eingeteilt. B-Zellen sind auf extrazelluläre Antigene spezialisiert. Sie erzeugen eine spezifische humorale Immunantwort, indem sie nach Differenzierung Antikörper in extrazelluläre Flüssigkeiten sezernieren. T-Zellen haben diverse Funktionen. Ein Großteil ist darauf spezialisiert intrazelluläre Antigene zu erkennen und die adaptive Immunantwort zu regulieren. Sie vermitteln eine direkte zelluläre Immunantwort und stimulieren B-Zellen. Darüber hinaus spielen einige T-Zellpopulationen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität. Beide Lymphozytentypen verfügen über mannigfaltige spezifische Membranrezeptoren, mit denen die Immunreaktion im Detail gesteuert werden kann, wobei jede einzelne Zelle nur eine Antigenrezeptorspezifität aufweist.[91]

1.3.3 Die humorale Immunantwort durch B-Zellen und Antikörper

1.3.4 Antikörper

Antikörper, sogenannte Immunglobuline (Ig), repräsentieren den humoralen Arm der adaptiven Immunantwort. Es handelt sich dabei um extrem variable Proteine, die an dreidimensionale Strukturen (Epitope) freier Antigene binden können. Ein großes Repertoire an unterschiedlichen B-Zellrezeptoren ist nötig, um effektiv die große Bandbreite an möglichen infektiösen Antigenen abwehren zu können. B-Zellrezeptoren dienen (1) der Signaltransduktion in die B-Zelle; (2) dem Transport des Antigens in die B-Zelle; und (3) als freies Ig der Eliminierung extrazellulärer Antigene.[91]

Ig sind in einer flexiblen Y-Struktur aufgebaut und setzen sich aus jeweils zwei identischen leichten (L) und schweren (H) Polypeptid-Ketten zusammen. Jede Kette besteht aus konstanten (C) und variablen (V) Domänen (s. Abb. 1.6). Der Ig-Stamm (Fc-Fragment) besteht nur aus C-Domänen der H-Kette (C_H), die beiden Arme (Fab-Fragmente) aus C- und V-Domänen beider Ketten (C_H und C_L , V_H und V_L). Die V-Domänen liegen endständig und bilden zwei identische variable Regionen. Sie bestehen je nach Ig aus unterschiedlich kombinierten Aminosäu-

ren und fungieren als Ig-Antigenbindungsstellen. Ihre doppelte und flexibel gekoppelte Ausführung ermöglicht zwischen verschiedenen Antigenen quervernetzen. B-Zellen können die fünf Ig-Hauptklassen Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin E (IgE) exprimieren, die teilweise noch in Unterklassen (IgG 1-4 und IgA 1-2) eingeteilt werden (s. Tab. 1.1). Ig-Klassen einer reifen B-Zelle unterscheiden sich bei gleicher Spezifität nur in den C_H -Domänen (μ , δ , γ , α , ϵ). IgD entsteht bei naiven B-Zellen durch einen Spleißvorgang der IgM-mRNA; IgG, IgA und IgE entstehen erst bei aktivierten B-Zellen über eine DNA-Rekombination der C_H -Gensequenzen. Die Ig-Klassen unterscheiden in ihren Fc-Fragmenten, die jeweils in hydrophober Form membranständig (mIg) oder in hydrophiler sezernierbarer Form (Ig) exprimiert werden können. An Antigen gebunden dient das Fc-Fragment, je nach Klasse der Effektorfunktion des Ig, der (1) direkten Neutralisierung von Pathogenen oder ihren Produkten (z. B. Toxine); (2) Opsonisierung von Pathogenen für Phagozyten; (3) Stimulation von Leukozyten zur Freisetzung von Mediatoren; (4) Komplementaktivierung; (5) Aktivierung von natürlichen Killerzellen; und (5) Quervernetzung von Pathogenen. Ig können durch biochemische Methoden im Serum untersucht werden.[91]

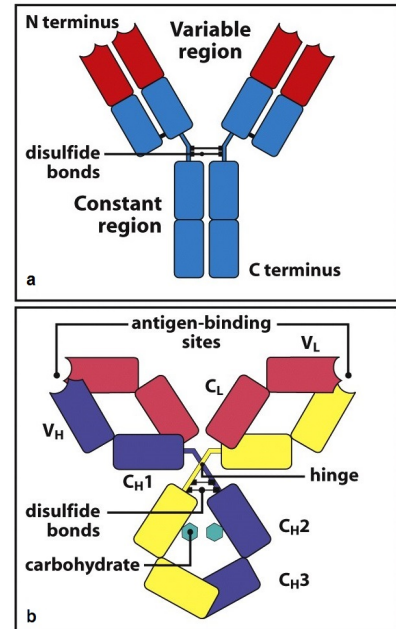


Figure 3-1 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abb. 1.6: Antikörperstruktur. a: Konstante und variable Region; b: Leichte und schwere Kettendomänen.[91]

1.3.5 B-Zellentwicklung und daraus hervorgehende B-Zellklassen

Entwicklung und Reifung naiver B-Zellen im Knochenmark

B-Zellen und ihre Subtypen können, wie auch andere körpereigene Zellen, durch immunphänotypische Oberflächenmerkmale, sogenannte *Cluster of Differentiation* (CD), differenziert werden. Je nach Entwicklungsschritt verändern sich die Oberflächenmerkmale der B-Zellen, sie werden im Folgenden jeweils zusätzlich aufgeführt. B-Zellen entstehen und vollziehen ihren ersten Reifungsprozess im Knochenmark. Unter Einfluss von Stromazellen entsteht auf ihrer Oberfläche ein initiales membranständiges Immunglobulin-Repertoire (mIg): (1) die V-Domänen beider Ketten werden durch V(D)J-Gensegmente kodiert, die jeweils im Genom in vielen unterschiedlichen Kopien vorliegen. V(D)J-Segmente werden durch somatische Rekombi-

Tabelle 1.1: Ig-Hauptklassen – Verteilung und Funktionen.[91]

Ig-Klasse	Verteilung und Funktionen
IgM	10 % der Serum-Ig; niedrigaffin → Kompensation durch Bildung großer Pentamere, daher Vorkommen insbesondere im Blut; erstes mIg → dominiert Frühstadium der Infektion.
IgD	Nur in geringen Mengen exprimiert; Funktion nicht vollständig geklärt.
IgG	Höchste Konzentration aller Ig im Serum; hochaffines Monomer; Ig mit der höchsten Halbwertszeit; als einziges Ig plazentagängig; ausgeprägte Neutralisierung, Opsonisierung, Komplement- und NK-Aktivierung; dominiert Spätstadium der Infektion.
IgA	Höchste Konzentration aller Ig in Sekreten und (Drüsen-)Epithelien; Monomer im Blut, Dimer in Sekreten; ausgeprägte Neutralisierung; dominiert Spätstadium der Infektion.
IgE	Geringe Serumkonzentration; Vorkommen v. a. in mikrovaskularisierten Geweben in Epithelnähe; bindet über Quervernetzung multivalente Ags; aktiviert Mastzellen; spezialisiert auf Parasitenabwehr.

nation (Gen-Rearrangement) zufällig zu einem V-Exon kombiniert (*Kombinationsdiversität I*); (2) Bei der Verbindung der Gensegmente werden einzelne Nukleotide addiert und bzw. oder substrahiert (*Junktionsdiversität*); (3) Die so entstehenden V_L - und V_H -Ketten werden nach dem Zufallsprinzip miteinander kombiniert (*Kombinationsdiversität II*). Durch diese Mechanismen können unreife naive B-Zellen ($CD19^+CD20^+IgM^+$) mit bis zu 10^{11} unterschiedlichen mIg-Spezifitäten entstehen. Unreife naive B-Zellen unterliegen einer negativen Selektion, das bedeutet bei ineffektiver Antigenbindung oder Bindung an körpereigene Moleküle werden die Zellen ausgesondert. Funktionsfähige B-Zellen werden bis zu ihrem ersten Antigenkontakt als naiv bezeichnet.

Transitorische naive B-Zellen ($CD19^+CD20^+CD38^-IgM/D^+$) diffundieren aus dem Knochenmark über den venösen Blutstrom in den Körper und zirkulieren kontinuierlich über Blut und Lymphe. Sie ersetzen täglich 5-10 % des peripheren B-Zellpools (sog. *turn-over* des mIg-Repertoires). Ein Teil migriert kompetitiv in sekundäre lymphatische Organe. Frei zirkulierende naive B-Zellen ohne Antigenkontakt sind relativ kurzlebig. 50 % dieser Zellen sterben alle drei Tage, das entspricht 1-2 % des gesamten peripheren B-Zellpools.[91] Naive B-Zellen können in der Peripherie nur durch tonische mIg-Stimulation und Stimulation durch den *B-cell activating factor*-Rezeptor länger überleben.[114]

B-Zellaktivierung und -differenzierung in den sekundären lymphatischen Organen

Antigen diffundiert frei über die Lymphe oder APC in die sekundären lymphatischen Organe.[12] Naive B-Zellen werden in den sekundären lymphatischen Organen durch antigenspezifischen Kontakt aktiviert und zur klonalen Expansion angeregt, auch ein extra-lymphatischer Antigenkontakt ist möglich.

Ein Teil der antigenaktivierten B-Zellen differenziert außerhalb der Lymphfollikel nach klonaler Expansion in der Frühphase der Infektion zu Ig-sezernierenden Plasmazellen. Diese sogenannten extrafollikulären Plasmazellen und ihre Ig sind aufgrund der schnellen Differenzierung rasch verfügbar, jedoch in der Regel niedrigaffin, kurzlebig und meist zwei Wochen nach Infektion histologisch nicht mehr nachweisbar.[114, 196]

Der Großteil der antigenaktivierten B-Zellen wandert jedoch in den Lymphfollikel, wo sie mit follikulären dendritische Zellen und kognaten T_{FH} -Zellen sogenannten Keimzentren (*germinal center*) bilden. Keimzentren sind spezialisierte lymphoide Strukturen, die 4-5 Tage nach Infektionsbeginn entstehen. Im Keimzentrum durchlaufen B-Zellen einen komplexen durch kognate T_{FH} -Zellen regulierten Zyklus. Dabei werden (1) antigenspezifische B-Zellen aktiviert und stimuliert klonal zu expandieren und einen Sekundärfollikel zu bilden; (2) es findet eine mIg-Diversifizierung statt (s. u.) aus der hochaffine mIg hervorgehen; und (6) autoreaktive mIg werden ausgesondert und hochaffine mIg positiv selektiert. Die mIg-Diversifizierung erfolgt in folgenden Etappen: (1) somatische Hypermutationen der V-Exons führen zu subtilen Veränderungen in den mIg mit erhöhter Antigenaffinität oder teilweise abweichender Spezifität von der Mutterzelle (*Affinitätsreifung*); (2) ein Ig-Klassenwechsel von IgM zu anderen Ig-Klassen anderer Funktion erfolgt unter Zytokineinfluss.[91, 114]

Die Differenzierung von B-Zellen in Keimzentrum-Reaktionen ist grundlegend für die Entstehung eines suffizienten serologischen Memorys (s. 1.3.6).[91]

1.3.6 Entwicklung des serologischen Memorys

Das immunologische Memory ist für die einer Krankheitsepisode bzw. einer Impfung folgenden lang anhaltenden (semi-)protektiven Immunität verantwortlich. Seine Biologie ist bis heute nicht im Detail verstanden.[114] Das B-Zell-Memory setzt sich aus dem Keimzentrum hervorgehenden, langlebigen und hochaffinen Ig-sezernierenden Plasmazellen und Memory-B-Zellen zusammen.[114, 182]

Memory-Plasmazellkompartiment

Ausgesprochen hochaffine B-Zellen, die relativ schnell aus der Keimzentrumsreaktionen hervorgehen (post-GC), differenzieren präferenziell in das Memory-Plasmazellkompartiment. Sie verlassen das Keimzentrum und reifen in parakortikalen lymphatischen Arealen. Von dort migrieren post-GC-Plasmazellen in Überlebensnischen des Knochenmark zurück. Stromazellen und CD93 scheinen ihr langes Überleben zu begünstigen. Sie exprimieren weiterhin mIg und MCH-Moleküle und können somit mit T_{FH} -Zellen interagieren, um die Ig-Produktion zu regulieren. Post-GC-Plasmazellen sezernieren aus dem Knochenmark kontinuierlich Ig in das periphere Blut, lange über den Zeitpunkt der Antigen-*Clearance* hinaus. So produzieren sie ein Minimallevel an zirkulierenden Ig, die Reinfektionen schon in der Frühphase abwehren können.[114, 182] Plasmazellen, die nicht migrieren und in den sekundären lymphatischen Organen verbleiben, sind entsprechend kurzlebig.[91]

Memory-B-Zellen und ihre Subtypen

Memory-B-Zellen (MBC) sind für die zweite Phase der immunologischen Reaktion einer Reinfektion mit einem bereits bekannten Antigen verantwortlich. Sie sind langlebige, große, meist $CD27^+CD86^+$ B-Zellen mit einer niedrigen Teilungsfrequenz. Sie exprimieren klassenspezifische (IgD^-) und meist affinitätsgeriffte mIg. Es gibt verschiedene Subtypen von post-GC-Memory-B-Zellen (MBC).

$CD80^-$ MBC entstehen scheinbar früh außerhalb des Keimzentrums. Ihre Funktion ist noch weitgehend ungeklärt. $CD80^+$ MBC sind meist IgG^+ , seltener IgA^+ in Sekreten, oder IgM^+ . Es sind zwei $CD27^-$ Subtypen bekannt (IgG^+ oder IgA^+).

Sogenannte **atypische MBC** sind $CD27^-$ und werden durch die Expression des inhibitorischen *Fc Receptor-Like Protein* (FcRL)-4 charakterisiert und wurden erstmalig in Tonsillen gesunder Individuen detektiert.[54, 55] Später wurde ihr Vorkommen in *Mucosa Associated Lymphoid Tissue* (MALT) und mesenterialen Lymphknoten bestätigt.[182] In einer *in vitro* Studie über die Rolle atypischer MBC in chronischen HIV-Infektionen zeigten sie Zeichen funktioneller Ermüdung und Hyperreagibilität, woraus man folgerte, dass ihre Funktion gestört ist und sie ein disfunktionales MBC-Kompartiment darstellen.[118] Vor Studienbeginn war ungeklärt, ob atypische MBC bei *Pf*-Infektionen Ig ins Blut sezernieren.

Post-GC- $CD27^+IgM^+$ MBC gehen wahrscheinlich aus verzögerten Keimzentrumsreaktionen hervor. Studien haben gezeigt, dass einige Antigene persistierende Keim-

zentrumreaktionen auslösen, aus denen weit über die Aktivierungsphase hinaus (bis zu 1,5 Jahre) kontinuierlich neue IgM⁺ MBC hervorgehen. post-GC-CD27⁺IgM⁺ MBC scheinen schon bei sehr niedrigen Antigenkonzentrationen mit fehlender Aktivierung der angeborenen Immunantwort oder auch bei fehlenden zirkulierenden Ig zu reagieren und eine sekundäre Keimzentrumsreaktion zu triggern.

Demgegenüber stehen post-GC-IgG⁺ oder -IgA⁺ MBC, den sogenannten **klassische MBC**. Sie können bei Reinfektion direkt ohne sekundäre Keimzentrumsreaktion zu Plasmazellen differenzieren und schnell große Mengen an IgG bzw. IgA sezernieren.[18, 114]

Memory-B-Zellüberleben

MBC unterscheiden sich von naiven B-Zellen in ihrer Langlebigkeit und beschleunigten Reaktionsfähigkeit. Der Höhepunkt der B-Zellaktivität ist typischerweise vier Wochen nach initialer Antigenexposition erreicht. Anschließend nimmt die MBC-Frequenz ab, bis es sich auf ein Minimallevel einpendelt, das zum Teil über 50 Jahre überdauern kann.[182] MBC benötigen keine kontinuierliche Exposition mit ihrem spezifischen Antigen, um zu überleben.[110] Ihr langes Überleben wird wahrscheinlich intrinsisch durch eine Hochregulierung anti-apoptotischer Schlüsselgene (Bcl-2, A1, Mcl-1) in Überlebensnischen der Milz und des Knochenmarks und eine reduzierte Expression negativer Regulatorgene des Zellzyklus und weniger durch die erhöhte Expression pro-proliferativer Gene getriggert. Des Weiteren scheinen extrinsische Faktoren beteiligt zu sein.[182]

Memory-B-Zellreaktivierung

MBC können bei niedrigen Antigenkonzentrationen, die noch keine messbare angeborene Immunantwort auslösen würden, hochsensitiv reaktiviert werden. Ein Kontakt der MBC mit spezifischem Antigen führt zur klonalen Expansion und schnellen Differenzierung in hochaffine Plasmazellen. Man geht von unterschiedlichen Faktoren aus, die ihre schnelle Differenzierung auch bei niederschweligen Reinfektionen im Vergleich zu naiven B-Zellen begünstigen: (1) Die Frequenz antigenspezifischer MBC ist höher, als die naiver B-Zellen; (2) MBC sind in Antigen-drainagearealen der sekundären lymphatischen Organe (v. a. Milz) strategisch besser lokalisiert; (3) sie besitzen affinere mIg, bilden schneller Immunkomplexe und stimulieren dadurch früher kognate T_{FH}-Zellen; (4) sie exprimieren zusätzliche kostimulierende Moleküle (z. B. CD80 und CD86) für die Stimulation von T-Zellen bzw. reagieren sensitiver auf deren Zytokine (v. a. IL-21); (5) sie können T_{FH}-Zellen quantitativ

mehr Antigen präsentieren; (6) MBC besitzen nach einem Ig-Klassenwechsel (IgG⁺ und IgA⁺) veränderte biochemische Eigenschaften mit verstärkten, länger andauernden intrazellulären mIg-Signalkaskaden, die die Ig-Produktion bis zu 100-fach erhöhen.[114, 182]

Man geht davon aus, dass IgG⁺- und IgA⁺-MBC bei Reaktivierung vornehmlich direkt zu Plasmazellen differenzieren und IgM⁺-MBC eher sekundäre Keimzentrumsreaktionen initiieren. Es ist fraglich, ob letztere dabei eine weitere mIg-Rediversifizierung durchlaufen und Klone mit noch affineren mIg hervorbringen, was für die Entwicklung verbesserter Impfschemata interessant wäre.[114, 182]

1.4 Natürliche Immunantwort des Menschen auf *Plasmodium falciparum*

1.4.1 Epidemiologie der natürlich erworbenen *Pf*-Immunität

Natürliche Entwicklung einer *Pf*-Immunität

Die menschliche Immunantwort auf eine *Pf*-Infektion ist ein hochkomplexes Zusammenspiel aus angeborener und adaptiver Immunantwort, das bis heute nur unvollständig aufgeklärt ist.[97, 171] Eine natürlich erworbene *Pf*-Immunität ist in der Regel nicht-steril und wird daher als Semi-Immunität oder auch klinische Immunität bezeichnet. Sie schützt vor hoher Parasitämie (94 %) sowie vor Morbidität und Mortalität (annähernd 100 %).[48] Sie entwickelt sich langsam, ist relativ effektiv und nimmt ohne kontinuierliche Antigenexposition schnell ab, bleibt dabei allerdings meist über dem Ausgangsniveau; ein Indiz dafür, dass eine kontinuierlich Antigenexposition nicht nur für die Generierung, sondern auch für die Persistenz eines immunologischen Memorys notwendig sein kann.[20, 97]

In Endemiegebieten kann die Bevölkerung eine klinische *Pf*-Immunität gegen unterschiedliche *Pf*-Varianten generieren.[51] Schon 1949 fand man heraus, dass sich eine protektive, den klinischen Ausprägungsgrad kontrollierende Immunität gegen Blutstadien einer *Pf*-Infektion über Jahre entwickelt und wiederholter Reinfektionen bedarf.[67]

Es existieren zwei grundlegende Hypothesen zur verzögerten Entwicklung einer klinischen Immunität: (1) In holoendemischen Gebieten entsteht ein heterogenes Varianten-spezifisches immunologischen Memory extrinsisch getriggert durch kumulative sukzessive Malariainfektionen mit verschiedenen *Pf*-Varianten über die Zeit (10-15 Jahre mit ca. fünf Infektionen jährlich); (2) eine natürlich erworbene *Pf*-Immunität wird durch intrinsische Faktoren bedingt. So zeigte eine Studie mit erwachsenen

Transmigranten in Papua (West-Neuguinea), dass bei starker Exposition schon nach ein bis zwei Infektionen eine wahrscheinlich variantenübergreifende Semi-Immunität erlangt werden konnte.[74] Auch andere Studien beobachteten, dass Erwachsene, wenn sie abrupt einer hohen Transmissionsintensität ausgesetzt sind, innerhalb von zwölf bis 24 Monaten mit insgesamt nur drei bis vier Infektionen eine natürlich erworbene Semi-Immunität entwickeln könnten.[48]

Eine natürlich erworbene *Pf*-Immunität kann sich darüber hinaus auch in Gebieten saisonaler oder niedriger Transmissionsraten entwickeln. Wahrscheinlich wirken sich dort die Abwesenheit sich überlappender *Pf*-Infektionen und eine niedrige Antigen-diversität positiv auf deren Entstehung aus.[96] Eine immunologische Vulnerabilität bzw. Resistenz gegen *P. falciparum* wird folglich wahrscheinlich von extrinsischen Faktoren (Antigendiversität) und intrinsischen Faktoren (Ausreifung des Immunsystems mit dem Alter oder Schwächung des Immunsystems durch Schwangerschaft bzw. Koinfektionen) beeinflusst.[48, 97]

Extrinsische (expositionbedingte) *Pf*-Immunität

Die *Pf*-Morbidität und -Mortalität innerhalb einer Bevölkerungsgruppe steht in direktem Zusammenhang mit der Transmissionsintensität. Letztere kann durch die Entomologische Inokulationsrate (EIR) quantifiziert werden und beschreibt die Anzahl an infektiösen Mückenstichen pro Person während eines bestimmten Zeitintervalls. Eine EIR unter 10 spricht für eine niedrige bis mittlere Intensität, über 10 für eine hohe Intensität, jeweils bei stabiler Transmission.[48] Die EIR korreliert signifikant mit der *Pf*-Inzidenz und -Dichte, nicht aber mit deren Prävalenz, in Kindern zwischen einem halben und sechs Jahren. Wird eine untere Transmissionsintensitätsschwelle unterschritten, kann dies zu einem Verlust der natürlich erworbene *Pf*-Immunität und einem konsekutiv erhöhten Morbiditätsrisiko führen. Eine Überschreitung einer oberen Transmissionsintensitätsschwelle kann durch erhöhte Infektionsfrequenz ebenfalls zu einem erhöhten Morbiditätsrisiko führen (s. 1.7).[48]

Eine klinische Immunität scheint mit angegebenen Halbwertszeiten von ca. fünf Jahren relativ kurzlebig zu sein. Eine antiparasitäre Immunität ist hingegen langlebiger mit einer Halbwertszeit von über 20 Jahren.[48] Wie bereits beschrieben, geht eine natürlich erworbene *Pf*-Immunität mit verlassen des Endemiegebietes binnen weniger Jahre stark zurück.[97] Eine prospektive Studie zeigte, dass erwachsene Afrikaner aus Endemiegebieten, die seit langer Zeit in Europa leben, nicht weniger anfällig für schwere Morbidität sind, als zuvor malaria-naive Patienten.[87] Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren, da in anderen Studien nachgewiesen werden konnte, dass ehemals semi-immune Immigranten aus hochendemischen Gebieten

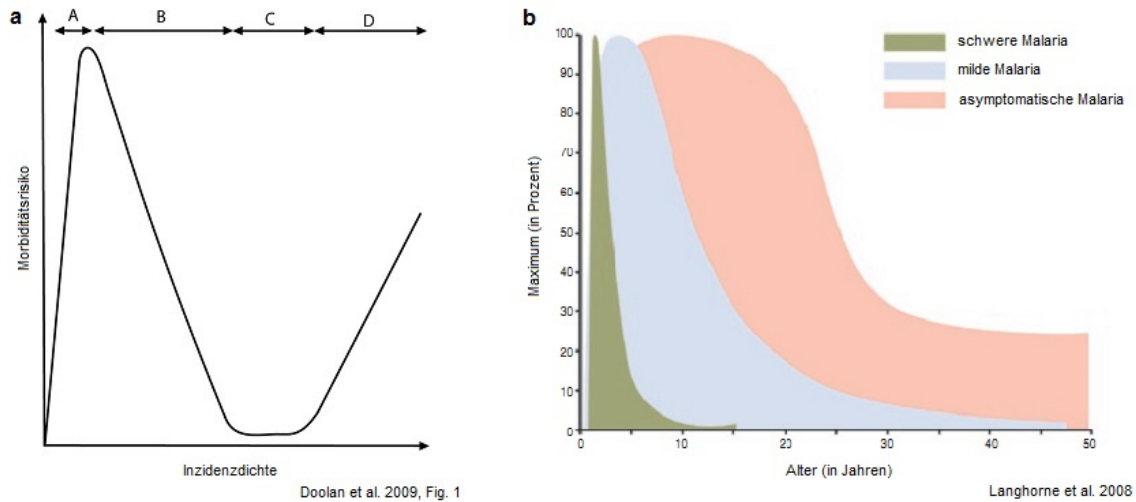


Abb. 1.7: a) *Hypothetische Immunitäts-Expositionskurve* – Segment A = erhöhtes Mortalitätsrisiko, Segment B = Senkung des Mortalitätsrisiko durch suffiziente Pf-Exposition und Entwicklung einer natürlich erworbenen Pf-Immunität, Segment C = Natürlich erworbene Pf-Immunität-erhaltende Pf-Infektionsschwelle, Segment D = veranschaulicht eine Expositionintensität, die die natürlich erworbene Pf-Immunität überfordert und z. B. zu schweren Anämien führt.[48] b) *Pf-Immunität nach Populationsalter in endemischen Gebieten* – rosa = asymptomatische Malaria, blau = unkomplizierte (milde) Malaria, grün = komplizierte (schwere) Malaria.[97]

auch nach einer Aufenthaltsdauer von über vier Jahren in Europa über eine höhere klinische Pf-Immunität verfügten, als malaria-naive Patienten.[20] Als in einem früher hyperendemischen Gebiet in Madagaskar nach über 20jähriger Malariafreiheit eine neue Malariaepidemie aufkam, waren über 40 Jahre alte Erwachsene resistenter gegen klinische Symptome, als jüngere, nicht-immune Individuen. Daraus könnte man schließen, dass Teilfaktoren der natürlich erworbenen Pf-Immunität ohne Antigenexposition dennoch langlebig sein können.[41, 97]

Intrinsische (altersbedingte) Pf-Immunität

In naiven Individuen aller Altersstufen führt eine erstmalige Infektion mit *P. falciparum* auch bei niedrigen Parasitämien so gut wie immer zu Malariasymptomen. In Gebieten hoher Transmissionsraten werden Säuglinge (0-6 Monate) wahrscheinlich durch maternales Ig (plazentäres IgG des dritten Trimenons), Hämoglobin F und ihren Metabolismus geschützt. Kleinkinder (0,5-5 Jahre) mit naivem Immunsystem erkranken hingegen häufig schwer. Wenige Malariaepisoden können ausreichen, um eine Pf-variantenübergreifende klinische Teilimmunität zu entwickeln, die vor schwerer Morbidität und Mortalität schützt.

Bei älteren Kindern (5-10 Jahre) sinkt die Morbiditätsfrequenz und -ausprägung. Es

prädominieren akute milde und chronische Verläufe. Es entwickelt sich sehr langsam über Jahre eine heterogene klinische Immunität gegen *P. falciparum*. Bei Eintritt in die Pubertät besteht meist eine hocheffektive, natürlich erworbene Semi-Immunität, was eventuell ebenfalls auf eine Ausreifung des Immunsystems zurückgeführt werden kann. Im Erwachsenenalter ist schließlich ein asymptomatischer Trägerstatus typisch.[48, 71, 74, 97, 109]

Es wird spekuliert, dass intrinsische altersbedingte Faktoren dabei nicht allein für die Entstehung der natürlich erworbenen Semi-Immunität, sondern vielmehr für deren Persistenz entscheidend zu sein scheinen. Die Immunität von Kleinkindern ist oft extrem kurzlebig und kann häufig auch bei initial guter Immunantwort nicht “geboostet” werden. Auch stellt sich die Frage, warum semi-immune Erwachsene ihre natürlich erworbene *Pf*-Immunität zumindest temporär so schnell verlieren, obwohl sie wahrscheinlich eine protektive Immunität gegen *Pf*-Varianten, denen sie Jahre zuvor in ihrer frühen Kindheit ausgesetzt waren, lange aufrecht erhalten können.[48]

1.4.2 Mechanismen der adaptiven Immunantwort gegen prä-erythrozytäre Infektionsstadien

Bei akkumulierter *Pf*-Exposition kann sich unter natürlichen Bedingungen mit steigendem Alter eine humorale Immunantwort gegen Sporozoiten (v. a. IgG) ausbilden. [52, 116, 126] Es ist nicht geklärt, welche Rolle T-Zellen dabei spielen. Es lag lange keine Evidenz für eine natürliche prä-erythrozytäre Immunantwort vor, die für sich genommen effektiv vor Reinfektion schützen kann.[135]

1.4.3 Mechanismen der zellulären Immunantwort gegen prä-erythrozytäre Infektionsstadien

T-Zellen, Makrophagen und weitere Zellen scheinen über parasitozide Stoffe (INF- γ , IL-12, endogenes Stickstoffmonoxid) direkt intrazelluläre Plasmodien eliminieren zu können.[49, 97] In HIV-positiven Patienten, die mit Malaria infiziert waren, konnte eine Beziehung zwischen CD4⁺-T-Zellverlust und einer Erniedrigung von Malaria-spezifischen Ig nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass T-Helferzellen nötig sind, um protektive Ig zu erhalten, wobei dieser Effekt meist nicht messbar ist.[97] Leukozyten produzieren zur Regulation überschießender Entzündungsreaktionen auf eine *Pf*-Infektion anti-inflammatorische Zytokine (IL-10, TGF- β).[49, 162, 171] Die für die Arbeit zentralen Mechanismen der humoralen Immunabwehr erythrozytärer *Pf*-Stadien werden im nächsten Abschnitt erläutert.

1.4.4 Mechanismen der humoralen Immunantwort gegen erythrozytäre Infektionsstadien

Passive Transferexperimente der 1960er Jahre zeigten mit hoher Evidenz, dass humane Serum-IgG-Antikörper effektiv vor Blutstadienparasitämie und Malariasymptomen schützen.[32, 97] Parasitämie und klinische Symptome von *Pf*-Malariapatienten in Ostafrika bzw. Thailand konnten auch in anderen Studien durch Transfer hyperimmuner Seren mit gereinigtem IgG z. B. semi-immuner erwachsener Westafrikaner beseitigt werden.[53, 113, 160] Dies legt, neben der in endemischen Regionen verbreiteten niederschweligen *Pf*-Persistenz in asymptomatischen Individuen, nahe, dass eine natürlich erworbene *Pf*-Immunität vor allem gegen *Pf*-Parasiten der erythrozytären Phase gerichtet ist.

Die Rolle von Antikörpern in der Blutstadienimmunität

Antikörper, insbesondere IgG, sind funktioneller Hauptbestandteil der Blutstadienimmunität. Bis heute ist nicht endgültig geklärt, welche Spezifität (gegen > 5.000 mögliche *Pf*-Antigene), Affinität und Effektorfunktion protektive Ig besitzen.[97] Zur effektiven bzw. effizienten Abwehr einer *Pf*-Infektion sind hohe Titer aktiver Ig während einer Infektion nötig.[51, 63] (1) Neutralisierende Ig blockieren die Invasion von Erythrozyten durch Merozoiten; (2) zytophile Ig fördern die direkte Ig-abhängige Parasiteneliminierung; und (3) opsonisierende Ig gegen *Pf*-infizierte Erythrozyten fördern deren Beseitigung in den sekundären lymphatischen Organen.[51, 97, 109] Verschiedene IgG-Unterklassen korrelieren jeweils positiv mit einer Immunität gegen erythrozytäre *Pf*-Stadien und üben je nach Antigen verschiedene Effektorfunktionen aus.[169] Die effektivsten Funktionen besitzen IgG, die gegen Oberflächenantigene auf Merozoiten oder auf *Pf*-infizierte Erythrozyten oder gegen apikale Organellen während der Erythrozyteninvasion gerichtet sind.[48, 97] Viele Studien konnten die Hypothese stützen, dass IgG gegen variante Oberflächenantigene eine variantenspezifische protektive antiparasitäre Immunität und eine variantenübergreifende Immunität gegen schwere Krankheit bieten.[22] Anti-Oberflächenantigen-IgG korrelierten insbesondere in Studien in Ghana, Kenia, Gabun und Tansania positiv mit protektiver klinischer Immunität.[43, 93, 220, 106] Eine weitere Studie wies nach, dass *Pf*-naive Individuen nach *Pf*-Infektion IgG produzierten, die mit bis zu sechs *Pf*-Linien unterschiedlicher PfEMP1-Varianten reagierten.[57]

Die Rolle von Memory-B-Zellen in der Blutstadienimmunität

Eine Reinfektion mit *Pf*-Antigenen führt zu einem Wiederanstieg, dem sogenannten *boosting*, von antigenspezifischen IgG im Serum, weshalb man davon ausgeht, dass der Körper MBC auf eine *Pf*-Infektion generiert.[97] Serum-IgG Titer und eine entsprechende klinische *Pf*-Immunität nehmen allerdings, wie zuvor beschrieben, in Abwesenheit konstanter Reinfektionen schnell ab. Man nimmt daher an, dass ein protektives humorales Memory entweder nur ineffektiv gebildet wird oder eine funktionale Beeinträchtigung aufweist.[50, 97, 176]

1.4.5 Impfstoffentwicklung

Aufgrund sich entwickelnder Resistenzen gegen Malariamedikamente, wäre ein effektiver Malariaimpfstoff gegen *P. falciparum* eine erstrebenswerte präventive Strategie, um Malaria zu kontrollieren.[121] Potentielle Malariaimpfstoffe können gegen parasitäre prä-erythrozytäre oder erythrozytäre Stadien gerichtet sein. In den letzten Jahren wurden über 40 Impfstoffkandidaten zum Teil erfolgreich in präklinischen und Phase I- bis II-Studien getestet. Blutstadienvakzine zeigten in größeren klinischen Studien jedoch keine ausreichende Effektivität.[181]

Der prä-erythrozytäre Impfstoffkandidat RTS,S/AS01 konnte hingegen in den abschließenden Ergebnissen der Phase III-Studie einen moderaten Schutz gegen klinische Malaria erreichen. RTS,S/AS01 kombiniert das sogenannte Circumsporozoitenprotein mit einem Hepatitis B-Protein und verhindert die Infektion von Hepatozyten durch Sporozoiten. In der oben genannten Studie wurde eine Effektivität von 36,3 % (95 % CI 31,8-40,5 %) und ein signifikanter Schutz vor schwerer Malaria und Krankenhauseinweisung nach vier Impfdosen innerhalb des Nachverfolgungszeitraums von 48 Monaten nachgewiesen.[189] Eine Studie verglich Malaria-Transmissionsmodelle und ihre Prädiktoren, um die Kosteneffektivität und Auswirkung einer klinischen Implementierung von RTS,S/AS01 zu berechnen. Sie zeigten positive Auswirkungen und Kosteneffektivität bei der klinischen Anwendung in Regionen ab einer *Pf*-Prävalenz von mindestens 5-10 %.[142] Das *European Medicines Agency's Committee for Medicinal Products for Human Use* haben kürzlich eine positive wissenschaftliche Stellungnahme für den klinischen Einsatz des RTS,S-Impfstoff Mosquirix außerhalb der Europäischen Union herausgegeben.[60]

1.4.6 Antigenespezifität protektiver IgG und das Fusionsprotein GMZ2

In dieser Arbeit wurde der Malariaimpfstoffkandidaten GMZ2, ein rekombinantes Fusionsprotein, als *Pf*-Antigen eingesetzt.

Nur wenige der über 5.000 verschiedenen *Pf*-Proteine konnten mit einer protektiven humoralen *Pf*-Blutstadienimmunität in Verbindung gesetzt werden, darunter die in GMZ2 im Merozoitenstadium nachweisbaren fusionierten Proteine *Glutamate-Rich Protein* (GLURP) (220 kDa) und das *Merozoite Surface Protein 3* (MSP3) (48 kDa).[63, 66]

Der Malariaimpfstoffkandidat GMZ2 besteht aus konservierten Fragmenten beider oben genannter Proteine und wird in *Lactococcus lactis* exprimiert. Die N-terminale Region des GLURP (GLURP₂₇₋₅₀₀) ist dabei mit der C-terminalen Region des MSP3 (MSP3₂₁₂₋₃₈₀) fusioniert.[89] GLURP wird über alle *Pf*-Stadien im menschlichen Vektor exprimiert, auch bei kürzlich freigesetzten Merozoiten nach der Schizontenruptur.[19] MSP3 ist in Großteilen hochpolymorph und wird auf der Merozoitenoberfläche exprimiert.

Die beiden in GMZ2 fusionierten Subregionen GLURP₂₇₋₅₀₀ und MSP3₂₁₂₋₂₈₀ sind jeweils über verschiedene *Pf*-Linien aus unterschiedlichen Regionen hochgradig konservierte und bedeutsame B-Zellepitope.[112, 133, 175, 80, 111]

Auch wenn eine direkte Antikörper-Reaktion gegen die Invasion von Erythrozyten durch Merozoiten möglich ist, zeigt eine zellulär gestützte Antikörperreaktion in endemischen Regionen *in vivo* die effizienteste *Pf*-Abwehr.[92] Dies konnte 1990 durch Bouharoun-Tayoun et al. über passive IgG-Transferexperimente in Thailand dargestellt werden. Dabei wurden *Pf*-infizierte Individuen mit Serum-IgG-Isolaten semi-immuner afrikanischer Erwachsener behandelt.[21] Die dabei entdeckte, das Parasitenwachstum hemmende Zusammenarbeit von Monozyten und Parasiten-spezifischen zytophilen Antikörpern wird als *Antibody-Dependent Cellular Inhibition* (ADCI) bezeichnet. Sie kann in funktionellen *in vitro*-Modellen getestet und als Marker für natürliche Antikörperreaktionen gegen *Pf* herangezogen werden.[101]. In der Folge wurde mithilfe des ADCI-Mechanismus MSP3 als Hauptziel der ADCI-abhängigen *Pf*-Abwehr entdeckt.[133] Damit wurde MSP3, anders als die meisten Malariaimpfstoffkandidaten, die meist in experimentellen Malariamodellen identifiziert wurden, initial durch klinische Transferexperimente im Menschen entdeckt.

GLURP und MSP3 sind zwei *Pf*-Antigene, die über den Mechanismus der ADCI sehr wirksam durch die körpereigene Immunabwehr bekämpft werden können.[133, 186] Studien konnten wiederholt zeigen, dass spezifische IgG-Antikörper semi-immuner afrikanischer Erwachsener gegen Epitope und Fragmente von GLURP und MSP3

das *Pf*-Wachstum durch ADCI hemmen. Es konnte in verschiedenen Studien, unabhängig von Region, Studiendesign und statistischen Analysemethoden, gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen an zytophilen Antikörpern gegen GLURP und MSP3 einen hohen prädiktiven Wert für einen natürlich erworbenen Schutz gegen klinische Malaria besitzen.[44, 134, 187, 11, 35]

Soe und Theisen et al. beobachteten 2004 einen synergistischen Effekt von GLURP und MSP3 beim Schutz gegen klinische Malaria. Dabei ließ sich bei Individuen, die nicht auf eines der beiden Antigene reagierten, eine starke Immunabwehr gegen das jeweils andere Antigen darstellen, was jeweils mit klinischem Schutz assoziiert war. Damit wurde der Grundstein gelegt, dass die kombinierte Induktion von Antikörpern gegen GLURP und MSP3 einen möglichen Schutz vor Malaria und damit Grundlage für einen möglichen Impfstoffkandidaten darstellen könnte.[167].

GMZ2 zeigte in der Folge in Verbindung mit dem Adjuvanz Aluminiumhydroxid in Deutschland und in Afrika in klinischen Phase I und II Impfstoffstudien eine hohe Sicherheit, Verträglichkeit und Immunogenität. Es konnte gezeigt werden, dass die Höhe der durch GMZ2-Impfung erreichten IgG-Level unabhängig von ethnischer Herkunft und zeitlicher Malariaexpositionsspanne waren und dass GMZ2 die Bildung von hohen Konzentrationen funktionell aktiver IgG triggert. Malaria-naive Erwachsene und Kleinkinder aus endemischen Regionen zeigten nach der Impfung GMZ2-spezifische Antikörper mit einer breiten inhibitorischen Aktivität gegen *Pf*-Isolate aus verschiedenen geographischen Regionen. Folglich kann angenommen werden, dass GMZ2 mit Aluminiumhydroxid die Bildung hoher Mengen an spezifischen und funktionalen Antikörper hervorruft, die in der Lage sind, eine parasitäre Expansion zu kontrollieren.[59, 89, 122]

Auch in Gebieten mit niedrigen Inzidenzraten in Lateinamerika konnten, mithilfe von GMZ2 als serologischem Marker, hochaffine Antikörper gegen *P. falciparum* ermittelt werden.[14]

Unabhängig von dieser Arbeit war die Autorin während ihres Aufenthaltes intensiv an der praktischen Durchführung der GMZ2-Phase-II-Baseline und -Phase-IIb-Studie in Lambaréné, Gabun, beteiligt.

1.5 Fragestellung

Die Vereinten Nationen haben in ihren Millenniumszielen das Ziel einer vollständigen Malariaeradikation formuliert. Ein wesentlicher Fokus liegt dabei, neben epidemiologischen Faktoren, auf der Entwicklung eines effektiven Malariaimpfstoffes.[212] Dafür ist ein weiterführendes, umfassendes Verständnis der natürlich erworbenen

adaptiven Immunantwort gegen *P. falciparum* auf individueller Ebene und unter Berücksichtigung epidemiologischer Einflussfaktoren notwendig.

In der Studie werden Antikörper und Memory-B-Zellen klinisch gesunder, lebenslang malariaexponierter Erwachsener gegen Blutstadien von *Plasmodium falciparum* untersucht, um einen Beitrag zum Verständnis der natürlich erworbenen Semiimmunität zu leisten. Als stellvertretendes *Pf*-Antigen wird der Malariaimpfstoffkandidat GMZ2 eingesetzt.[186, 89] Natürlich gebildete Antikörper auf die darin fusionierten Proteine GLURP und MSP3 sind bedeutsame B-Zellepitope und mit einem Schutz vor Malaria assoziiert (s. 1.4.6).[134, 187, 11, 35] Die Verwendung ausgewählter immunodominanter *Pf*-Antigene ist gegenüber einer Verwendung vollständiger Plasmodien von Vorteil, da nur mit klinischem Schutz assoziierte Antikörper und B-Zellen erfasst werden. Die natürlich erworbene Immunantwort ist allerdings nicht allein auf diese beiden Proteine beschränkt.

Die Untersuchung der 60 Probanden dient darüber hinaus als Grundlage für eine Folgestudie. Einige Probanden mit hohen Antikörperspiegeln und Memory-B-Zellfrequenzen gegen GMZ2 werden aus diesem Studienkollektiv ausgewählt, um die Bedeutung verschiedener B-Zellkompartimente für die Malariaimmunität bei Individuen in Endemiegebieten mithilfe einer *single-cell reverse cloning strategy* zu untersuchen und herauszufinden, inwiefern durch sie produzierte Antikörper *Pf*-Oberflächenproteine erkennen und sie sich konsekutiv als immunologische Oberflächenmarker für vor schwerer Malaria geschützte Individuen eignen.

Es wird erhofft, daraus neue Erkenntnisse über Antikörperspezifitäten und über relevante immunologische Kompartimente semi-immuner Individuen zu gewinnen. Neue Erkenntnisse könnten zu neuen Behandlungsmethoden und zur Entwicklung neuer Malariaimpfstoffe mit erhöhter Effektivität führen.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Es handelte sich um eine prospektive Querschnittsstudie mit experimentell-immunologischem und epidemiologischem Design, die vom 19. Juli bis 12. September 2010 durchgeführt wurde. Sie wurde in Kooperation mit der *Medical Research Unit* (Medizinische Forschungseinrichtung) (MRU) am Albert-Schweitzer-Hospital Lambaréné, Gabun, dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen und der Abteilung für Molekulare Immunologie des Max-Planck Institut für Infektionsbiologie Berlin (MPI) für Infektionsbiologie Berlin durchgeführt.

Die Studienhypothese war, dass GMZ2-spezifische IgG und IgM lebenslang malaria-exponierter Erwachsener gegenüber einer *Pf*-naiven Referenzprobe deutlich erhöht sind. Zudem wurde angenommen, dass GMZ2-spezifische IgM niedrigere Reaktivitäten zeigen, als IgG. Es wurde darüber hinaus angenommen, dass jeweils klassische und atypische Memory-B-Zellen (MemBC) gegen GMZ2 nachweisbar sind und deutlich über den Frequenzen der *Pf*-naiven Referenzprobe liegen und klassische MemBC-Zellen gegenüber atypischen MemBC erhöht sind. Hinsichtlich des Vergleiches regionaler Subpopulationen wird die Hypothese aufgestellt, dass Probanden aus ländlichen Regionen eine höhere GMZ2-spezifische IgM- sowie IgG-Reaktivität und respektive höhere GMZ2-spezifische Memory-B-Zell-Frequenzen gegenüber Probanden aus urbanen Regionen aufweisen.

Um die Studienhypothese zu beantworten, wurden (1) typische und atypische MemBC und zirkulierende Plasmablasten aus peripheren mononuklearen Blutzellen von Individuen aus dem Studiengebiet gewonnen und auf ihre Reaktivität und Spezifität gegen das *Pf*-Fusionsprotein GMZ2 untersucht; des weiteren wurden (2) IgG- und IgM-Profile aus dem Serum derselben Individuen gegen GMZ2 untersucht, zusätzlich wurden (3) hämatologische und parasitologische und (4) GPS-Daten der Wohnorte der Individuen ermittelt.

Die Studie wurde in Einklang mit der *Good Clinical Practice* und der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Sie wurde am 12. Juni 2010 vom unabhängigen regionalen Ethikkomitee Lambaréné (CERIL) genehmigt.

2.2 Studienort

Geographie und Epidemiologie

Die an Bodenschätzen reiche Republik Gabun liegt in äquatorialer Lage in Zentralafrika. Sie grenzt im Westen an den Golf von Guinea, im Norden an Äquatorialguinea und Kamerun und im Osten und Süden an die Republik Kongo. Mit einer Fläche von 267.667 km² (75 % des Bundesgebiets der Bundesrepublik Deutschland) und 1.640.286 Einwohnern gehört Gabun zu den am dünnsten besiedelten Ländern Afrikas.[28] Der wichtigste Fluss ist der 1.200 km lange Ougououé mit seinen zahlreichen Nebenarmen. Ca. 82 % der Fläche sind von tropischem Regenwald bedeckt.[144] Es herrscht ein ganzjährig äquatoriales heiß-feuchtes Regenwaldklima, mit einem Wechsel von jeweils zwei Trockenperioden (Juni-September und Dezember-März) und Regenperioden (September-Dezember und März-Juni) im Jahresverlauf. Die Jahresmitteltemperatur liegt bei 26,6 °C, die Gesamtregenmenge bei ca. 2.570 mm mit einer relativen Luftfeuchtigkeit im Jahresmittel von 83 %.[8]

Mit einem Bruttoinlandsprodukt von 10.787 Millionen US-Dollar gehört es zu den reichsten Ländern Zentralafrikas, doch zeigen soziale Indikatoren eine ungleiche Verteilung der Reichtümer des Landes. Die Bevölkerung teilt sich in über 50 verschiedene ethnische Gruppen auf, darunter 26 % Fang, 24 % Punu, 11 % Nyebi, 8 % Teke, 7 % Myene und 1 % Pygmäen. Neben der Amtssprache Französisch werden insbesondere diverse Bantusprachen gesprochen. 70 % der Einwohner sind Christen, 20 % Anhänger von Naturreligionen und 8 % Muslime.[8] Die durchschnittliche Lebenserwartung bei Geburt liegt bei 62 Jahren. 35 % der Bevölkerung sind unter 15 Jahre alt, das Durchschnittsalter beträgt 22 Jahre. Die Mortalitätsrate von Kindern unter fünf Jahren beträgt 66 auf 1.000 Lebendgeburten, davon werden 15 % durch Malariainfektion verursacht (im Vergleich nur 8 % durch Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)). Die Inzidenzrate von Malaria liegt bei 23.150, ihre Prävalenz bei 3.005 auf jeweils 100.000 Einwohner.[210]



Abb. 2.1: Gabun - topographische Karte.[64]

Medical Research Unit Lambaréné

Die Studie wurde am MRU des Albert-Schweitzer-Krankenhauses in der gabunischen Provinzhauptstadt Lambaréné, Zentrum der Provinz Moyen-Ogooué, durchgeführt.

Tabelle 2.1: Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Alter 18-60 Jahre	Bekannte HIV-Infektion Bekannte Hepatitis B- oder C-Infektion Sichelzellanämie (HbSS oder HbSC) Schwergradige Anämie (Hb < 9 g/dl) Vorausgegangene Studienteilnahme

Die 26.257 Einwohner zählende Stadt und damit fünftgrößte des Landes liegt im Landesinneren wenige Kilometer südlich des Äquators. Namensgebend für die Provinz ist der Fluss Ogowe, der sich in Lambaréné in zwei Flussarme aufspaltet und die Stadt in eine Insel und zwei Flussseiten teilt.

Das MRU wurde 1981 als neue Einrichtung des Albert-Schweitzer-Krankenhauses gegründet. Unter der Leitung von Prof. Dr. Kreamer (Direktor des Tropeninstituts der Universität Tübingen) hat es sich zu einem der führenden Forschungszentren Afrikas entwickelt. Forschungsschwerpunkte des MRU sind die Pathophysiologie und Therapie der Malaria sowie weiterer hochprävalenter Infektionskrankheiten des Subsahra-Afrikas.

In der Region um Lambaréné herrscht eine ganzjährig hochendemische *Pf*-Transmission mit geringer Schwankungsbreite. Die Plasmodienindices wurden auf 64,9 % und die durchschnittliche EIR auf ca. 50 infektiöse Stiche pro Jahr ermittelt.[154, 214, 180] Es herrscht eine hohe Prävalenz semi-immuner asymptomatischer *P. falciparum*-Träger, Studien ergaben 7,2-12 % positive Trägern im dicken Tropfen und 52 % in der *stevor* PCR.[39, 131]

2.3 Studienpopulation

Screening

Es wurden 60 Individuen in die Studie eingeschlossen. Nach Analyse der peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) und Antikörper auf Parasitenlysate und rekombinante Antigene wurden fünf gesunde Probanden aus dem Kollektiv für weitere Folgestudien ausgewählt. Die Ein- und Ausschlusskriterien sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Probengewinnung

Die Individuen wurden jeweils an ihrem Wohnort im Stadtgebiet Lambaréné und Dörfern der Provinz Moyen-Ogooué bis Ndjolé (110 km von Lambaréné) und im Nordwestens der Provinz Ngounié bis Fougamou (88 km von Lambaréné) rekrutiert (s. Abb. 2.2). Am Folgetag der Rekrutierung wurden sie ein zweites Mal aufgesucht, um ihnen die Ergebnisse der diagnostischen Analysen und bei pathologischen Befunden eine entsprechende pharmakologische Therapie zukommen zu lassen. Der Einschluss der Individuen in die Studie erfolgte nach mündlicher Aufklärung und Einverständniserklärung durch Unterschrift im Sinne eines *Informed Consent*. Anschließend wurden alle Studienteilnehmer eingehend anamnestisch und körperlich untersucht.

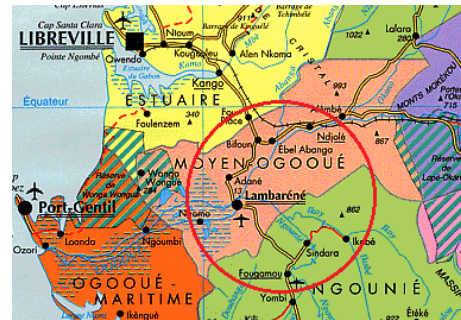


Abb. 2.2: Gabun - Studiengebiet [64]

Für jedes Individuum wurde ein *Case Report Form* erhoben, beinhaltend:

Demographische Daten:

- Alter
- Geschlecht
- Geburtsort
- Aktueller Wohnort mit GPS-Koordinaten

Epidemiologische Daten:

- Fieber in den letzten 48 Stunden
- Verwendung präventiver Maßnahmen gegen Malaria (ITN, Insektizide, etc.)

Nach eingehender körperlicher Untersuchung wurde den Patienten an ihrem Wohnort durch periphere Venenpunktion 2 x 9 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blut (S-Monovette mit 1,6 mg EDTA/ml Blut) entnommen. Alle Proben wurden mithilfe einer Screening-Nummer pseudonymisiert und umgehend in Kühlboxen bei ca. 4 °C mit einer Transportzeit von unter zwei Stunden in das Labor des MRU transportiert und analysiert.

Fünf Individuen wurden aus der Studienkohorte ausgewählt. Von diesen wurden zu einem späteren Zeitpunkt direkt am MRU weitere 100 ml venöses EDTA Vollblut entnommen, um es wie in Abschnitt 2.6 erläutert weiterzuverarbeiten und für weitere Studien an das MPI nach Berlin zu transportieren.[124]

Tabelle 2.2: Hardware und Software

Bezeichnung	Hersteller
PC FACS	Macintosh
FACS Calibur Software Cell Quest 3.3	BD
Excel 2010	Microsoft
R	CRAN

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Eppendorf Safe-Lock Gefäße 1,5 ml	Eppendorf, Deutschland
Falcon Röhrchen	BD Biosciences, USA
Cryo Tubes 1 ml	Thermo Scientific, USA
Pasteur-Pipette	MPI, Deutschland
S-Monovette	Sarstedt, Deutschland

2.4 Material

Die für die Versuchsreihen und Auswertung beziehungsweise Darstellung verwendete Hardware und Software wird in Tabelle 2.2 dargestellt. Die für die Versuchsreihen verwendeten Chemikalien, Lösungen, Nährmedien, Puffer und Reagenzien werden in Tabelle 2.4; das verwendete Verbrauchsmaterial in Tabelle 2.3; und die verwendeten Geräte in Tabelle 2.5 aufgeführt. Material, das dort nicht beschrieben wird, wird jeweils unter den entsprechenden Methoden aufgeführt.

2.5 Diagnostik

Hämatologische Diagnostik

Aus < 0,5 ml des gewonnenen EDTA-Blutes wurde für jeden Probanden maschinell ein kleines Blutbild und Differentialblutbild in einer einzigen Messung mit dem vollautomatischen Hämatologie-Flowzytometriesystem Cell Dyn erstellt.

Parasitologische Diagnostik

Aus dem EDTA-Blut wurden je Individuum zwei Dicke Tropfen angefertigt – einer diente der direkten Diagnostik, der zweite als *Backup* zur Probensicherung. Es wurde die "Lambaréné-Methode" nach Planche et al. 2001 *et al.* verwendet.[147] Bei dieser werden 10 μ l Kapillar- oder EDTA-Blut mit einer Pipette rechteckig (1,8 x 1

Tabelle 2.4: Chemikalien, Lösungen, Nährmedien, Puffer, Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Spezifizierungen
Accustain Stain	GIEMSA Sigma, USA	pH 6,9
Alexa Fluor 647	Life Technologies, USA	
anti-APC-H7	BD Bioscience, USA	
anti-CD19-PE-Cy7	BD Bioscience, USA	
anti-CD21-PE	eBioscience, USA	
anti-CD27-FITC	BD Bioscience, USA	
anti-CD38-PE	eBioscience, USA	
anti-CD138-PE	eBioscience, USA	
DMSO	Sigma, USA	Dimethyl Sulphoxide Hybri-Max
FCS	Biochrom AG, DE	Fetales Kälberserum
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, SWE	Dichte $1.077 \pm 0,001$ g/ml (+ 20 °C)
Glycerolyte 57 Solution	Fenwall Inc., USA	57 g Glycerin 1,6 g, 30 mg Kalium chlorid gepuffert mit 51,7 mg einbasischem Natriumphosphat und 124,2 mg zweibasischem Natriumphosphat, annähernd pH 6,8 angepasst mit Natriumlaktat (je auf 100 ml)
Paracheck Pf	Orchid, Indien	
PBS	BD Bioscience, USA	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)
RPMI-1640	Sigma, USA	
Titrisol Triphosphatpuffer	Merck, Deutschland	pH 7,2
Strep-HRP 6 (Roche)	Sigma, USA	
Tryptanblau	Sigma, USA	

Tabelle 2.5: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Cell Dyn	Abbott, Deutschland
Zentrifuge EBA 12	Hettich, Deutschland
FACSCalibur	BD Biosciences, USA
Lab Gard NU-425-600 Class II, Type A2	Nuaire, USA
Lauda 12 T	Lauda, Deutschland
Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Scientific, USA
Multiskan Ex	Thermo Electron Cooperation, USA
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik, Deutschland
Nikon Eclipse E 200	Nikon Instruments Inc., USA
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Deutschland
Pipetten Labmate L20, L200, L1000	Abimed, Deutschland
Präzisionswaage	Kern, Deutschland
Rotanta 460 R	Hettich, Deutschland
Ultra Low Temperatur Freezer MDF - 1156	Sanyo, Electric Co., Japan

cm) auf einen Objektträger aufgetragen und bei 40 °C luftgetrocknet. Anschließend wird der Objektträger mit 20 %iger Giemsa-Lösung (20 ml Accustain GIEMSA Stain pH 6,9 mit 80 ml Titrisol Triphosphatpuffer pH 7,2) 20 min eingefärbt, um dann kurz in sauberem Wasser gewaschen und im Inkubator luftgetrocknet zu werden. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch in Ölimmersion mit 100facher Vergrößerung untersucht. Es wurden jeweils mindestens 30 Gesichtsfelder, für eine negative Bewertung mindestens 100 Gesichtsfelder, ausgezählt. Die Parasitämie wurde nach folgender Formel quantitativ bestimmt: Parasitenanzahl / Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder x Mikroskopfaktor = Parasiten/ μ l.[94, 147]

Im Verlauf der Studie wurde zusätzlich zum retrospektiv durch qualifiziertes Labpersonal ausgelesenen Dicken Tropfen ein *Pf*-RDT (paracheck *Pf*) mit jeweils 5 μ l EDTA-Blut routinemäßig durchgeführt, um zeitgleich zur Zellanalyse in der Durchflusszytometrie eine Aussage über eine mögliche *Pf*-Infektion zu erhalten und Probanden bei positiven Testergebnissen schnellstmöglich eine adäquate Therapie zukommen lassen zu können.

Weiterführende Diagnostik

Teilproben wurden nach Weitertransport an das MPI in Berlin auf HIV- und Hepatitis B- oder C-Infektionen und per Elektrophorese auf Sichelzellgene getestet.

2.6 Fraktionierung in mononukleäre Zellen (PBMC), Plasma und Erythrozyten

Das restliche auf 4 °C gekühlte venöse Vollblut (je 17,5 ml) wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank (Lab Gard NU-425-600 Class II, Type A2) wie folgt weiter verarbeitet:

Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Das venöse Vollblut wurde mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert, um das Plasma und die Periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) zu gewinnen.[102] Dazu wurde es im Verhältnis 1:1 mit dem im Wasserbad (Lauda 12 T) vorgewärmtem Zellkulturmedium RPMI-1640 verdünnt. Für 18 ml Blutproben wurde ein 50 ml BD Falcon Röhrchen mit 20 ml Ficoll-Paque Plus gefüllt und darauf vorsichtig das Blut-Zellkulturmedium für Leukozyten (RPMI)-Gemisch geschichtet. Das Röhrchen wurde anschließend für 40 min bei 1410 U/min (= 400 x g) mit niedrigster Anlaufzeit (Stufe 1) und ungebremsten Auslauf bei 21 °C zentrifugiert (Rotanta 460 R).

PBMC-Isolierung

Nach Ficoll-Separation wurde der PBMC-Ring vorsichtig, ohne zytotoxische Ficoll-Durchmischung, mithilfe einer Pasteur-Pipette abpipettiert und in ein 50 ml BD Falcon-Röhrchen mit 20 ml RPMI gegeben. Um die PBMC herauszuwaschen, wurde das PBMC-RPMI-Gemisch anschließend für 10 min bei 1250 U/min (= 320 x g) zentrifugiert (Rotanta 460 R). Das am Boden des Falcon-Röhrchen entstandene PBMC-Pellet wurde mit 1 ml unverdünntem fetalem Kälberserum (FCS) resuspendiert. Ab diesem Schritt wurden die Zellen durchgehend auf Eis gekühlt. 10 µl der Suspension wurden in 1:10 facher Verdünnung mit 10 µl Trypanblau-Lösung 0,4 % gemischt und für drei Minuten inkubiert. Mithilfe der Neubauer-Zellkammer wurden die lebenden Zellen unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse E 200) bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt (s. Bedienungsanleitung des Herstellers).

4 x 10⁶ Zellen wurden zur direkten Analyse im BD FACSCalibur in ein 1,5 ml Eppen-

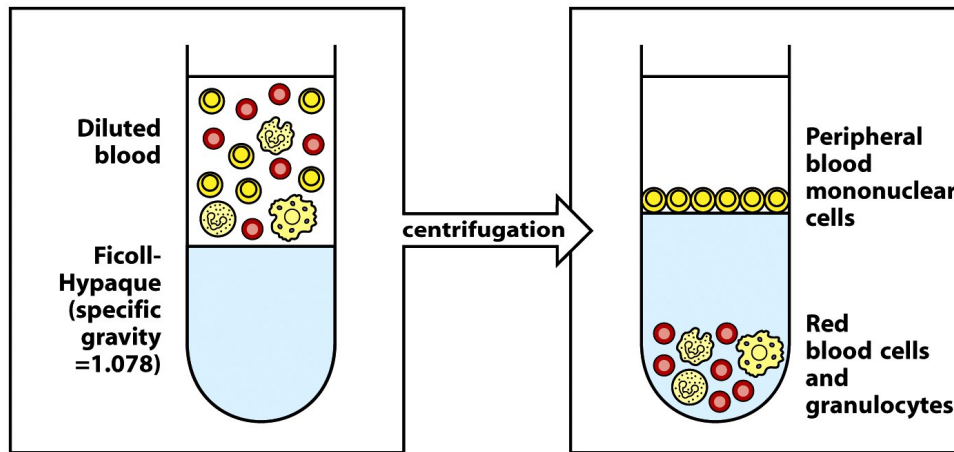


Figure A-24 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abb. 2.3: Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation. Die unterschiedliche Migration während der Zentrifugation bedingt eine Separierung der Blutzelltypen in verschiedene Schichten (PBMC = peripheral blood mononuclear cells, RBC = red blood cells, Gran. = granulocytes).[91]

dorf Safe-Lock Gefäß (Eppendorf-Röhrchen) separiert und auf Eis gelegt. Die restliche Zellsuspension wurden bis zu einer Konzentration von 5×10^6 /ml Zellen mit einem Gefriermedium, bestehend aus 10 % Dimethyl Sulphoxide Hybri-Max (DMSO) 90 % fetalem Kälberserum (FCS), aufgefüllt. Dabei wurde, zur Vermeidung von Zellschäden, schnell gearbeitet und nur sparsam pipettiert. Die Suspension wurde auf mit den Probandennummern identifizierten 1 ml Cryo Tubes (jeweils 1 ml) aufgeteilt und in einen Mr. Frosty Freezing Container überführt, um anschließend in einer Tiefkühltruhe (Ultra Low Temperatur Freezer MDF -1156) linear ($-1^\circ\text{C}/\text{min}$) auf auf -150°C herunter zu kühlen. Die eingefrorenen Proben wurden später für weitere Analysen in das MPI nach Berlin transportiert.

Plasma-Isolierung

Die Plasmaphase wurde, nach Isolierung der PBMC, vorsichtig in ein mit der Probandennummer beschriftetes 15 ml BD Falcon-Röhrchen abpipettiert und in der oben genannten Tiefkühltruhe bei -150°C gelagert.

Erythrozyten-Isolierung

Die Erythrozytenphase wurde vorsichtig in ein mit der Probandennummer beschriftetes 15 ml BD Falcon-Röhrchen abpipettiert und für 5 min bei 1250 U/min (= $320 \times g$) zentrifugiert. Der Plasma-Ficoll-Überstand wurde verworfen und die verbleibenden Erythrozyten im Verhältnis 1:3 mit Glycerolyte 57 aufgefüllt. Nach drei

Minuten Wartezeit bei Raumtemperatur wurden die Proben in der oben genannten Tiefkühltruhe bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.7 B-Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die verschiedenen lymphozytären Subpopulationen wurden mithilfe eines Durchflusszytometers (BD FACSCalibur) typisiert. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass verschiedene Zellen oder antikörpergekoppelte Mikropartikel (*beads*) anhand ihrer Größe, Struktur und Fluoreszenzeigenschaften unterschieden werden können. Dabei können insbesondere die absolute Zellzahl bestimmt und Lymphozyten typisiert werden. Letzteres setzt eine Markierung der Zellen mit Antikörpern voraus, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind (direkte Markierung), oder von einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen werden können (indirekte Markierung).

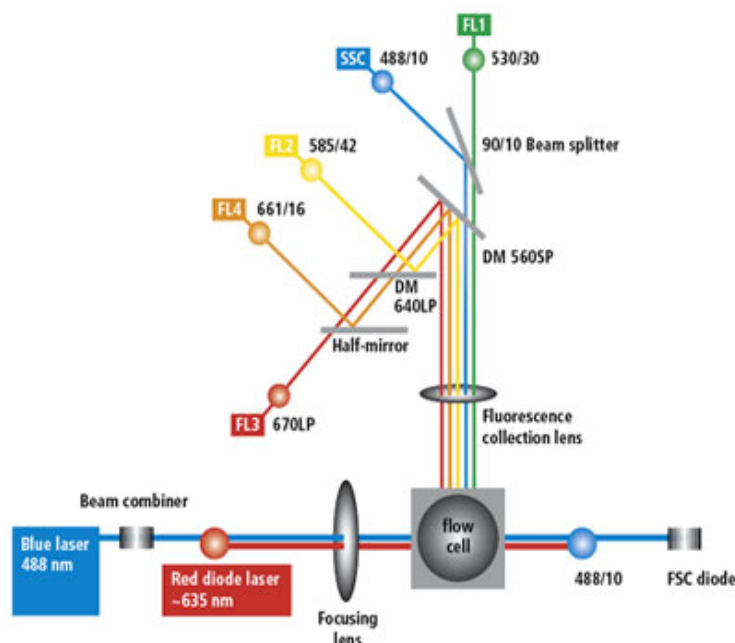


Abb. 2.4: *Optisches System des BD FACSCalibur.* [15]

Licht der Wellenlänge 488 nm wird ausgesandt, fokussiert und trifft in der Messküvette auf den Probenstrom. Das Licht wird gestreut, reflektiert, Fluoreszenzfarbstoffe emittieren Licht verschiedener Wellenlängen. Ein System aus Spiegeln und Filtern trennt die abgehende Strahlung nach ihren Wellenlängenbereichen.

Der jeweilige Anteil wird über Detektoren registriert. FL1-4: detektierbare Fluoreszenzfarbstoffe; 488/10, 530/30, 585/42, 661/16: Bandpassfilter; 670LP: Longpassfilter. [102]

Die Messung beruht darauf, dass innerhalb kürzester Zeit tausende derart markierter Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbei geleitet werden. Dabei kommt es zur Lichtstreuung und Anregung der gekoppelten

Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses Licht kann durch ein System aus Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer (FACS) gebündelt und zerlegt werden. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff erhält man entsprechend ein spezifisches Signal. Die nach vorne abgelenkten Strahlen des Lasers sind ein Maß für die relative Größe der gemessenen Zellen und Partikel, sie werden als Vorwärtsstreulicht (*Forwardscatter* (FSC)) bezeichnet. Das in einem 90°-Winkel abgestrahlte Licht, das sogenannte Seitwärtsstreulicht (*Sidescatter* (SSC)), stellt ein indirektes Maß für die Zellgranularität dar. Optische Filter, die zur spezifischen Detektion der einzelnen Fluoreszenzen dienen, reduzieren die notwendige Kompensation bei der Messung einzelner Signale. Bandpassfilter lassen nur Wellenlängen eines bestimmten Wellenlängenbereichs durch. Ein Bandpassfilter von 530/30 lässt beispielsweise nur Licht der Wellenlänge 515-545 nm passieren, ein Longpassfilter nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge.[102] Die Methode wird ausführlich von Shapiro et al. 2003 beschrieben.[163]

Es wurde das Modell BD FACSCalibur mit einem Argonionenlaser der Wellenlängen 488 nm und 635 nm eingesetzt, mit dem bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt werden können (s. Abb. 2.4).[91]

Probenvorbereitung

Zur Darstellung der verschiedenen B-Zellsubpopulationen wurden Oberflächenantigene verschiedener Reifestadien der B-Zellentwicklung markiert (s. Tab. 2.6). GMZ2 wurde von M. Theisen zur Verfügung gestellt.[185] GMZ2 wurde basierend auf den Angaben des Herstellers (Life Technologies) an Alexa fluoreszenzgekoppelte Mausantikörper gekoppelt: anti-humanes CD19-PE-Cy7, anti-APC-H7, anti-humanes CD27-FITC (alle von BD), anti-humanes CD21-PE, anti-humanes CD138-PE und anti-humanes CD38-PE (alle von eBioscience)(s. Abb. 2.5). Die verwendeten fluoreszenzgekoppelten Antigen- und Antikörpermischungen (s. Tab. 2.7) wurden im Vorfeld der Studie am MPI in Berlin hergestellt.

Zur Zellmarkierung wurden jeweils ca. $1,3 \times 10^6$ Zellen der in 2.6 zur direkten FACS-Analyse separierten PBMC (4×10^6 Zellen) auf drei 2 ml Eppendorf-Röhrchen aliquotiert. Die im Folgenden aufgeführten Färbeschritte waren, mit Ausnahme der jeweilig unterschiedlichen Antikörpermischungen A-C (s. Tab. 2.7), für alle drei Röhrchen identisch. Während des gesamten Färbeprozesses wurden die Zellen durchgehend auf Eis gelagert.

(1) Zunächst wurden die Zellen mit 2 ml auf 4 °C gekühlter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit 2 % FCS (500 ml PBS mit 10 ml FCS = PBS-F) gewaschen und für 4 min bei 4.300 U/min (= 2.000 x g) zentrifugiert (Zentrifuge EBA 12).

(2) Nach dem Waschvorgang wurde der Überstand vorsichtig entnommen und verworfen. Die PBMC verblieben als Pellet am Boden des Röhrchens. (3) In einem ersten Färbeschritt wurden die belassenen PBMC mit insg. 50 μ l Antigengemisch nach dem Schema in Tabelle 2.7 (3. Zeile) für 30 min abgedunkelt inkubiert. (4) Nach Ablauf der Zeit wurden sie erneut mit 2 ml Phosphatgepufferte Salzlösung mit 2 % fetalem Kälberserum (PBS-F) für 4 min bei 4.300 U/min (= 2.000 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. (5) In einem zweiten Färbeschritt wurden die Zellen mit insg. 50 μ l Antikörpermischung nach dem Schema in Tabelle 2.7 (4. Zeile) resuspendiert und für weitere 30 min abgedunkelt mit Antikörpern inkubiert. (6) In einem letzten Waschschrift wurden die Zellsuspension wiederum mit 2 ml PBS-F verdünnt und für 4 min bei 4.300 U/min (= 2.000 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. (7) Zum Schluss wurde das PBMC-Pellet mit 300 μ l PBS-F resuspendiert und durch ein Zellsieb in ein FACS-Röhrchen transferiert.

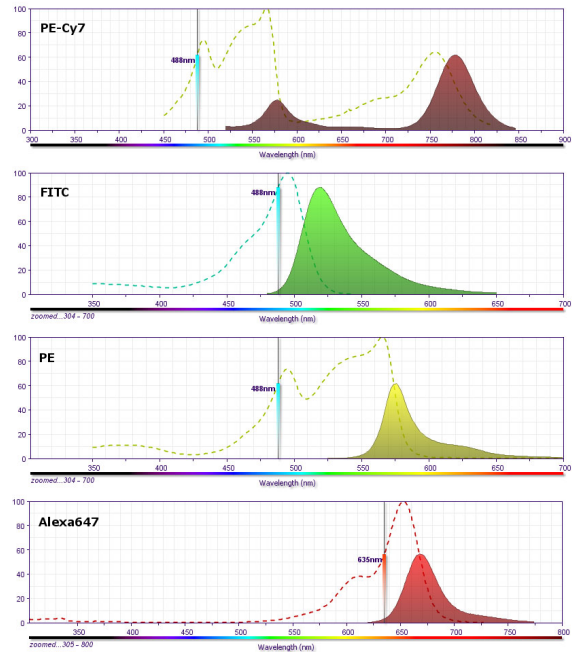


Abb. 2.5: Spektren der verwendeten Fluorochrome[16]

Tabelle 2.6: Schematische Darstellung der untersuchten Zellpopulationen[91]

Zelltyp	Immunophenotyp
Unreife B-Zelle	CD19 ⁺
Reife B-Zelle (nicht-aktiviert)	CD19 ⁺ CD21 ⁺ CD38 ⁻
Keimzentrums-B-Zelle (aktiviert)	CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺
Plasmazelle	CD19 ^{+/-} CD38 ⁺ CD138 ⁺
Memory B-Zelle	CD19 ⁺ CD27 ⁺

Inbetriebnahme des FACS, Kompensation und Messung der Proben

Während des Färbeprozesses wurde das FACSCalibur der Herstellerempfehlung entsprechend gestartet. Die Dateien bezüglich der Maschineneinstellung wurden geladen und ihre Korrektheit mit Fluoreszenz-Beads kontrolliert. Die durchflusszy-

Tabelle 2.7: Zellmarkierungen A-C

Markierung A		Markierung B		Markierung C	
Antigen	Vol. (μl)	Antigen	Vol. (μl)	Antigen	Vol. (μl)
GMZ2 (Alexa647)	5	CD19 (Pe-Cy7)	2,5	GMZ2 (Alexa647)	5
PBS-F*	45	CD27 (FITC)	10	PBS-F*	45
		CD138 (PE)	2,5		
		Anti-IgG-Bio	0,5		
		PBS-F*	35		
CD19 (Pe-Cy7)	2,5	Strep-APC	0,5	CD19 (Pe-Cy7)	2,5
CD27 (FITC)	10	PBS-F*	49,5	CD27 (FITC)	10
CD21 (PE)	2,5			CD38 (PE)	2,5
PBS-F*	35			PBS-F*	35

tometrische Analyse wurde mit der CellQuest (Version 3.3) Datenverarbeitungs-Software (BD Biosciences) durchgeführt. Ein Kompensationsvorgang wurde im Vorfeld der Studie am MPI in Berlin unter Verwendung der gleichen fluoreszenzgekoppelten Antikörper durchgeführt, um falsch positive Signale durch sich überlappende Emissionswellenlängenbereiche der Fluorochrome zu vermeiden, s. Stewart *et al.* (1999).[172] Die Analyse (Markierung A-C) wurde schließlich mit jeweils einem Minimum von 10^6 Lymphozyten nach am MPI voreingestellter FlowJo Analysemaske analysiert. Lymphozyten, Granulozyten, NK und Monozyten wurden anhand ihres FSC und SSC charakterisiert, die B-Zellsubpopulationen anhand der antikörpermarkierten Oberflächenantigene.



Abb. 2.6: Das BD FACSCalibur am MRU Lambaréne

Auswertung

Die einzelnen Zellpopulationen wurden im zweidimensionalen Dotplot dargestellt. Dabei wurden jeweils die Signale zweier Fluoreszenzkanäle (FL) einander gegenüber gestellt (FL1 gegen FL2, FL3 gegen FL4, usw.). Die Achsen, die die Fluoreszenz darstellen, wurden logarithmisch aufgetragen. Da Zellen, die exakt die gleichen Eigenschaften zeigen, auf dem gleichen Punkt abgebildet werden, wurden mehrfach überlagerte Punkte mithilfe eines Dichteplots verschiedenfarbig sichtbar gemacht.

2.8 Quantitative IgG- und IgM-Bestimmung mittels ELISA

Das ELISA ist das zurzeit am häufigsten angewendete quantitative Immunoassay und wurde erstmals von Avrameas *et al.*, 1971 und Engvall *et al.*, 1971 beschrieben. [9, 58] Eine nähere Beschreibung der Methode findet sich in einschlägiger Fachliteratur.[91, 188]

Beschichten der ELISA-Platten

Zunächst wurden die lyophilisierten GMZ2-Antigene mit 1 ml sterilem Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) in eine Lösung mit einer Konzentration von 123 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gebracht. Diese wurde bei 4 °C zwischengelagert. Um die GMZ2-Antigene an die feste Phase der ELISA-Mikrotiterplatten zu binden (Beschichtung) wurden zunächst 40 μl der oben genannten GMZ2-Lösung mit 10 ml PBS verdünnt. Davon wurde jedes Well mit jeweils 100 μl benetzt. Die Platten wurden anschließend über Nacht (10-18 h) bei 4 °C inkubiert.

Blocken

Die benetzten Platten wurden aus dem Kühlschrank genommen und jeweils dreimal mit PBS gewaschen und trocken geklopft. Anschließend wurden die Platten für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Abblockpuffer (PBS mit 0,01 % Tween 20 und 3 % einfachem Milchpulver) inkubiert.

Inkubation mit Probe

Für die Inkubation der ELISA-Platten mit den Proben wurden folgende Verdünnungsreihen angelegt: initial 1:100, dann jeweils verdünnt mit 1:4 – Die Reihe A der Verdünnungsplatte wurde hierzu mit 99 μl PBS pro Well befüllt, die Reihen B bis H mit jeweils 75 μl PBS pro Well. In die Reihe A wurden jeweils 1 μl des unter Abschnitt 2.6 separiertem Serum der Individuen hinzugefügt (1:100). Nun wurden

nach gründlicher Durchmischung von der Reihe A jeweils 25 μl Lösung in die Reihe B transferiert, von der Reihe B 25 μl Lösung in die Reihe C, für die Reihen D bis H wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren.

Nach dem Abblocken wurden die Platten jeweils dreimal mit PBS gewaschen und trocken geklopft. Daraufhin wurden jeweils 75 μl /Well der verdünnten Proben auf die gecoateten Platten übertragen. Die Platten wurden nun für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Inkubation mit Detektionsantikörper

Die Detektionsantikörper wurde wie folgt vorbereitet: Standardantikörper wurden bei Raumtemperatur im Verhältnis 1:250 verdünnt. Dafür wurden jeweils 20 μl anti-IgG-Strep und anti-IgM-Strep-Antikörper mit je 5 ml Abblockpuffer (PBS mit 0,01 % Tween 20) vermischt. Anschließend wurden die Platten jeweils dreimal mit PBS gewaschen und trocken geklopft. 50 μl des entsprechenden Antikörpers wurden in die entsprechende Reihe transferiert und für 1 Stunde inkubiert.

Farbreaktion

Die Antikörper für die Farbreaktion wurden im Verhältnis 1:500 verdünnt (10 μl Strep-HRP Mischung auf 5 ml PBS). Die Antikörperlösungen wurden dunkel zwischengelagert. Nach Inkubation mit den Detektionsantikörpern wurden die Platten jeweils dreimal mit PBS gewaschen und trocken geklopft. Anschließend wurden 50 μl /Well Strep-HRP-Lösung (Roche) auf die ELISA-Platte transferiert und für 1 Stunde inkubiert.

Zum Schluss wurden die Platten wiederum jeweils dreimal mit PBS gewaschen und trocken geklopft. Nun wurden die Platten kurz mit Abblockpuffer befüllt, das umgehend wieder verworfen wurde. Es wurden erneut drei Waschschrte wie oben beschrieben angeschlossen und anschließend die Platten trocken geklopft und gelagert.

Messung im Photometer

Der ELISA-Reader wurde im Vorfeld gestartet und auf 37 °C Raumtemperatur gebracht. Die trocken geklopften und gelagerten Platten wurden anschließend im Thermo Multiskan Ex mit einem Wellenlängenbereich von 400-750 nm analysiert. Es wurde die im Gerät integrierte Thermo Scientific Ascent Software genutzt. Jede Platte wurde 3-4 mal bei einem Wellenlängenfilter von 450 nm ($\text{CV} \leq 1,0\%$ (1,5 – 2,0 OD) bei 405 nm) ausgelesen bis das stärkste gemessene Signal eine optische

Dichte von ca. 4.0 erreichte.

Aufgrund einer passageren Störung des Gerätes wurden alle Proben ein zweites Mal nach dem gleichen Prozedere ausgelesen. Zur Auswertung wurden nur die Ergebnisse der zweiten Messung herangezogen. Die Daten wurden auf Excel exportiert und auf einem lokalen Server gespeichert.

2.9 Statistische Auswertung

Die Daten wurden in Microsoft Excel Version 2010 übertragen und auf Vollständigkeit und Korrektheit überprüft. Statistische parametrische und nicht parametrische Analysen und Grafiken wurden mithilfe von R Version 3.0.2 für Windows des *Comprehensive R Archive Network* (CRAN) durchgeführt.

Das Ergebnis eines statistischen Tests wurde bei einem beidseitigem $p < 0.05$ als signifikant gewertet. Wenn möglich wurde der Schätzer und das zugehörige 95 % Konfidenzintervall dargestellt.[198]

Die Studienpopulation wurde nach Alter, Geschlecht und Malariapräventionsmaßnahmen, und die Hämoglobin-, Leukozyten- und eosinophilen Granulozytenkonzentrationen im Vergleich zwischen *Pf*-positiven und -negativen Probanden explorativ im Boxplot dargestellt.

Assoziationen zwischen Blutbildparametern, *Pf*-Infektion und Malariasymptomen wurden explorativ im Boxplot dargestellt. Die eosinophile Granulozytenkonzentration (abhängige Variable, X-Achse) der einzelnen Probanden wurde in einer linearen Regressionsanalyse in Beziehung jeweils zur IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität (unabhängige Variable) gesetzt. Zur Berechnungsgrundlage wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet. Ein Zusammenhang zwischen *Pf*-Infektionsstatus und Anämie sowie Fieberangaben wurde mithilfe *odds ratios* und *pearson residuals* in Kontingenztabellen als Mosaikplots untersucht.

Die photometrischen Ergebnisse des ELISA wurden in non-parametrischen, deskriptiven Verfahren ausgewertet. Die Studienpopulation wurde in Subpopulationen nach Wohnorten eingeteilt und anschließend in städtische und ländliche Regionen aufgeteilt. Einzelne Individuen wurden aufgrund der Annahme einer besonders hohen *Pf*-Exposition als eigene Subgruppe erfasst. Die IgG- bzw. IgM-GMZ2- Reaktivitäten der Gesamtpopulation im Vergleich zur *Pf*-naiven Kontrollprobe sowie nach Subpopulationen wurden im Logit-Logplot, jeweils mit Angabe der Mittelwerte und Mediane der Studienpopulation als Referenz, dargestellt. Die IgG- bzw. IgM-GMZ2- Reaktivitäten (Verdünnung 0,01) wurden darüber hinaus anhand des *Pf*-Infektionsstatus sowie nach regionalen Subpopulationen explorativ im Boxplot miteinander vergli-

chen. Die IgG- sowie IgM-GMZ2-Reaktivitäten (Verdünnung 0,01) wurden mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis-Test statistisch nach in Dörfern lebenden Subpopulation und städtischen Subpopulationen in Beziehung gesetzt. Die IgG- und IgM-GMZ2 sowie *Pf*-naiven Proben wurden miteinander jeweils nach Mittelwerten und Medianen mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests untersucht. Im FACS ermittelte Zellfrequenzen wurden von der mitgelieferten Gerätesoftware BD CellQuest des BD FACS Calibur grafisch im Dichte-Dotplot dargestellt. Die Ergebnisse durchflusszytometrisch ermittelter Lymphozyten und B-Zell-Populationen wurden in non-parametrischen, deskriptiven Verfahren ausgewertet. Klassische und atypische IgG⁺ GMZ2⁺ MBC und IgG⁺ GMZ2⁺ naive Vorläufer-B-Zellen wurden im Boxplot gegenübergestellt. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von GMZ2-reaktiven klassischen und atypischen MBC im venösen Blut der Probanden MP036, MP070 und MP071 wurden auszugsweise im Vergleich zu einer *Pf*-naiven Referenzprobe im Dotplot dargestellt. Die B-Zellpopulationen gegen GMZ2 wurden um den Ausreißer MP041 bereinigt und nach *Pf*-Exposition, *Pf*-Infektionsstatus sowie regionalen Subpopulationen im explorativ Histogramm dargestellt. Die Arbeit wurde mit dem Softwarepaket LaTeX von Prof D. E. Knuth erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Es wurden insgesamt 60 Probanden im Alter von 19 bis 51 Jahren eingeschlossen, die zwischen Ndjolé im Norden, Lambaréné im Zentrum und Fougamou im Süden des über 2.000 km² großen Studiengebietes und in einem Fall in Libreville wohnhaft waren (s. Abb. 3.2). Alle Studienteilnehmer hielten sich im Vorfeld und während der Probenerhebung über mindestens mehrere Wochen im Studiengebiet auf und lebten seit der Geburt in hochendemischen Gebieten (Gabun und Burkina Faso) und waren damit zeitlebens der Infektion mit *P. falciparum* ausgesetzt.[127] Es wurden auch Probanden mit Malariaparasiten im Dicken Tropfen eingeschlossen, sofern sie symptomlos waren. 43,3 % (n = 26) der eingeschlossenen Probanden waren weiblich, 56,7 % (n = 34) männlich. Von den weiblichen Probandinnen nutzen 76,9 % (n = 20) Malariapräventionsmaßnahmen (MPM), von den männlichen Probanden waren es 47,1 % (n = 16) (s. Abb. 3.1).

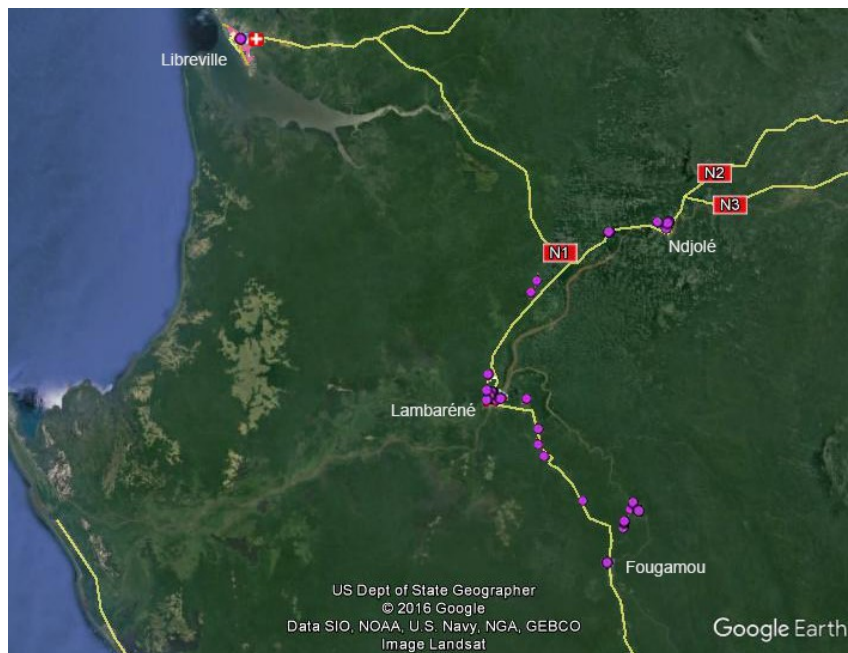


Abb. 3.2: Geografische Verteilung der Studienpopulation – aktuelle Wohnorte aller eingeschlossenen Probanden nach GPS-Koordinaten.

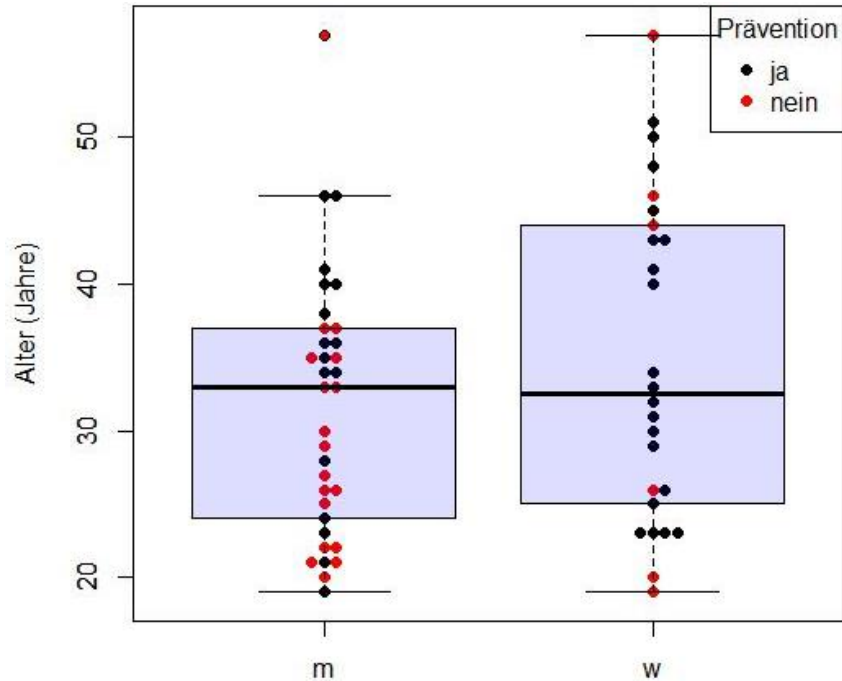


Abb. 3.1: Studienpopulation im Boxplot nach Alter und Geschlecht mit Angabe von verwendeten Malariapräventionsmaßnahmen (Prävention = Malariapräventionsmaßnahmen vorhanden, *m* = männlich, *w* = weiblich).

Der Probandenfluss wird in Abbildung 3.3 dargestellt. Eine Aufführung der gesamten Studienpopulation mit Geschlecht, Alter, Geburts- und Wohnort findet sich in Tabelle 3.1. Von einer Angabe der GPS-Koordinaten der Wohnorte wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen abgesehen.

Tabelle 3.1: Gesamtübersicht über die Studienpopulation – Demographische und epidemiologische Daten (*ID* = Identifikationsnummer, *Sex* = Geschlecht, *w* = weiblich, *m* = männlich, *Rt.* = Bundesstraße, *PK* = point kilométrique)

	ID	Sex	Alter	Geburtsort	Wohnort
		(w/m)	(Jahre)		
1	MP011	m	25	Mouila	Lambaréné (Schweitzer)
2	MP012	m	22	Lambaréné	Lambaréné (Atongowanga)
3	MP013	m	34	Mouila	Lambaréné (Isaac)
4	MP015	w	32	Mouila	Lambaréné (Isaac)
5	MP017	m	29	Mouila	Lambaréné (Schweitzer)
6	MP018	w	23	Nyanga	Lambaréné (Schweitzer)
7	MP019	w	26	Ndende	Siat Zilé
8	MP020	m	23	Lambaréné	Lambaréné (Schweitzer)

Tabelle 3.1: Studienpopulation – Demographie und Epidemiologie (Fortsetzung)

	ID	Sex (w/m)	Alter (Jahre)	Geburtsort	Wohnort
9	MP021	m	22	Lambaréné	Lambaréné (Château)
10	MP022	m	57	Makoumbou	Petit Paris 3
11	MP023	m	34	Tchibanga	Lambaréné (Atongowanga)
12	MP024	w	33	Mimongo	Lambaréné (Château)
13	MP025	w	40	Mimongo	Mitoné
14	MP026	m	33	Fougamou	Rt. Fougamou (PK 33)
15	MP027	w	23	Libreville	Rt. Fougamou (PK 5)
16	MP028	m	33	Bitam	Rt. Fougamou (PK 27)
17	MP029	w	57	Minvoul	Rt. Fougamou (PK 27)
18	MP030	w	26	Lambaréné	Benguié 4
19	MP033	w	25	Mimongo	Rt. Fougamou (PK 37)
20	MP034	w	23	Lambaréné	Lambaréné (Fangui)
21	MP035	w	29	Ndjolé	Paris Bifoun
22	MP036	m	30	Sindara	Sindara
23	MP037	m	36	Schweitzer	Sindara
24	MP038	w	45	Sindara	Sindara
25	MP039	w	30	Port Gentil	Sindara
26	MP040	w	43	Fougamou	Sindara
27	MP041	m	38	Kango	Sindara (Ndougou)
28	MP042	w	50	Sindara	Sindara (Ndougou)
29	MP043	m	24	Kouagna	Kouagna
30	MP044	m	35	Mimongo	Kouagna
31	MP045	m	37	Tchibanga	Sindara (Ndougou)
32	MP046	w	43	Makona	Sindara (Song)
33	MP047	w	34	Lambaréné	Sindara (Song)
34	MP048	m	35	Sindara	Sindara
35	MP049	m	19	Sindara	Sindara
36	MP050	m	21	Sindara	Sindara
37	MP051	w	41	Sindara	Sindara
38	MP052	m	36	Sindara	Sindara
39	MP053	m	41	Matadi	Sindara (Ndougou)

Tabelle 3.1: Studienpopulation – Demographie und Epidemiologie (Fortsetzung)

ID	Sex	Alter	Geburtsort	Wohnort	
	(w/m)	(Jahre)			
40	MP054	m	40	Sindara	Sindara (Ndougou)
41	MP055	m	20	Fougamou	Mamiengué
42	MP056	m	21	Ndjolé	Libreville
43	MP057	w	20	Ndjolé	Ndjolé (Tepe)
44	MP058	m	26	Libreville	Ndjolé (Bordamure)
45	MP059	w	23	Ndjolé	Ndjolé (Tepe)
46	MP062	w	46	Ndjolé	Ndjolé (Mbilavion)
47	MP063	w	19	Ndjolé	Ndjolé (Mbilavion)
48	MP064	m	21	Ndjolé	Ndjolé (Mbilavion)
49	MP065	m	35	Bitam	Rt. Ndjolé (PK 1)
50	MP066	m	37	Oyem	Rt. Ndjolé (PK 1)
51	MP067	m	46	Mbigou	Rt. Ndjolé (Menguegne)
52	MP068	m	46	Lambaréné	Rt. Ndjolé (Menguegne)
53	MP069	m	26	Burkina Faso	Rt. Ndjolé (Menguegne)
54	MP070	m	28	Burkina Faso	Rt. Ndjolé (Menguegne)
55	MP071	m	40	Oyem	Rt. Ndjolé (Menguegne)
56	MP072	w	44	Boué	Rt. Ndjolé (Menguegne)
57	MP073	w	48	Lambaréné	Rt. Ndjolé (Menguegne)
58	MP074	m	27	Libreville	Rt. Ndjolé (Menguegne)
59	MP075	w	31	Lambaréné	Rt. Ndjolé (Menguegne)
60	MP076	w	51	Tchibanga	Fougamou

3.2 Klinische Diagnostik

3.2.1 Parasitologie

Bei 8,3 % ($n = 5$) aller Probanden war der Dicke Tropfen niedrigpositiv für *Pf*-Trophozoiten, bei 3,3 % ($n = 2$) für *Pf*-Gametozoyten. In 63,3 % ($n = 38$) der Fälle wurde zum Abgleich und zeitnahen Therapie positiver Fälle additiv einen HRP-2-Schnelltest (Paracheck) durchgeführt, der in zwei Fällen bei negativem Dicken Tropfen positiv ausgefallen ist. Umgekehrt ist in einem Fall der Paracheck-Schnelltest bei

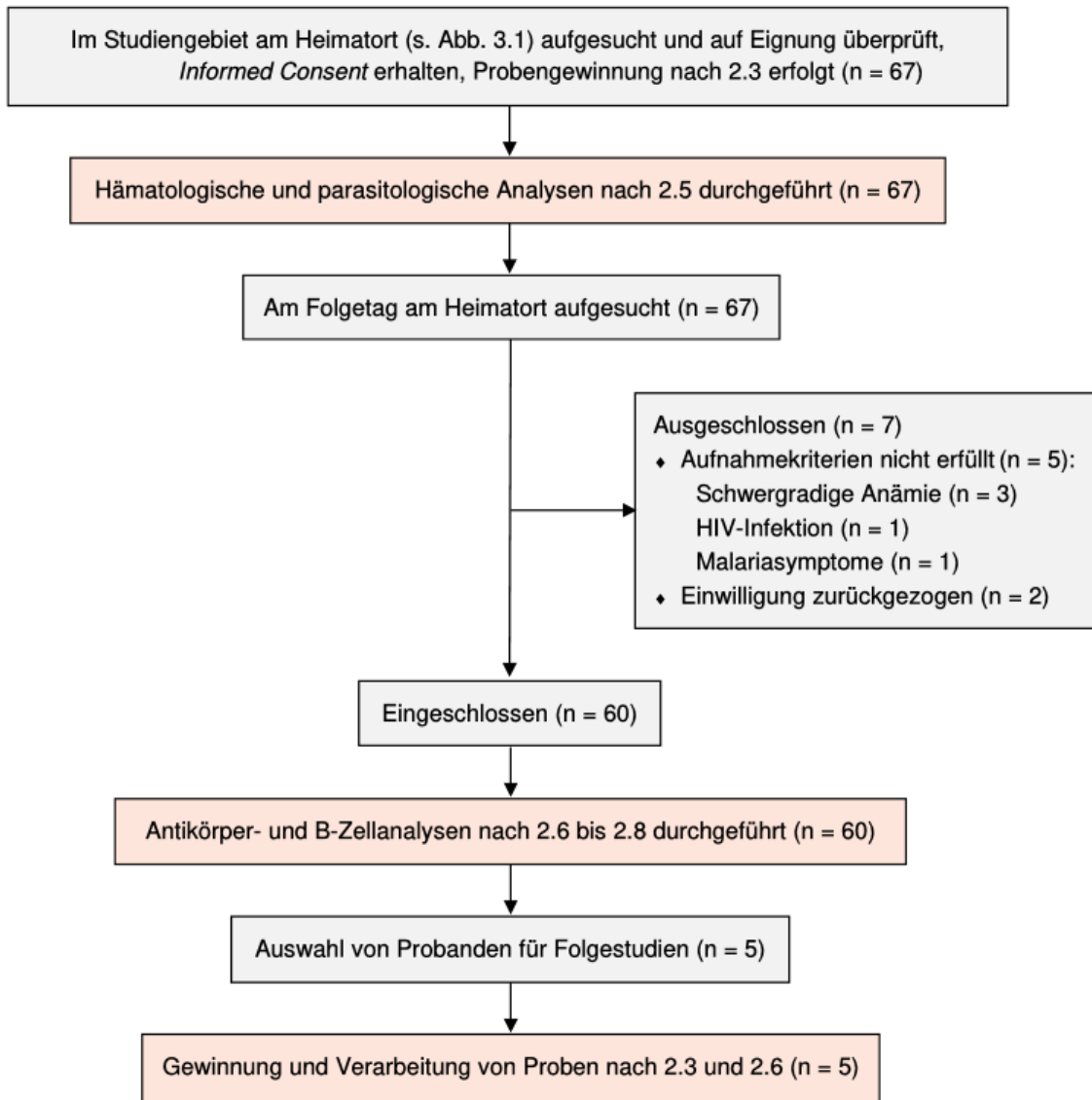


Abb. 3.3: Probandenfluss im Diagramm

Tabelle 3.2: Übersicht über positiv getestete Probanden – Pf-Parasitologie, Fieber und Malariapräventionsmaßnahmen (ID = Identifikationsnummer, MPM = Malariapräventionsmaßnahmen, nd = nicht durchgeführt). *Fieber in den letzten 48 h, **ITN oder Innenrauminsektizide, ***nicht durchgeführt.

	Dicker Tropfen		Schnelltest	Fieber*	MPM**
	Trophozoiten p/ μ l	Gametzoyten g/ μ l			
positiv	5	2	5	12	36
negativ	55	58	33	48	24
nd	0	0	22	0	0
MP020	138	12	***	nein	ja
MP028	0	6	***	ja	nein
MP036	78	0	pos.	nein	nein
MP042	0	0	pos.	ja	ja
MP049	690	0	pos.	nein	ja
MP057	365	0	pos.	nein	nein
MP059	0	0	pos.	nein	ja
MP072	11	0	neg.	nein	nein

positivem Dicken Tropfen negativ ausgefallen.

Eine zusammenfassende Übersicht zu allen positiven Befunden der parasitologischen Analyse findet sich in Tabelle 3.2. In Tabelle 3.3 sind die parasitologischen Ergebnisse aller Studienteilnehmer mit anamnestischen Angaben zu Fieber in den letzten 48 Stunden und Malariapräventionsmaßnahmen aufgeführt.

Tabelle 3.3: Gesamtübersicht über die parasitologische Diagnostik – Pf-Parasitologie, Fieber und MPM (ID = Identifikationsnummer, MPM = Malariapräventionsmaßnahmen). *Fieber \geq 38 °C in den letzten 48 h **ITN oder Innenrauminsektizide ***nicht durchgeführt

ID	Dicker Tropfen		Schnelltest	Fieber*	MPM**
	Trophozoiten p/ μ l	Gametzoyten g/ μ l			
MP011	0	0	***	nein	nein
MP012	0	0	***	nein	nein
MP013	0	0	***	nein	ja

Tabelle 3.3: Parasitologische Diagnostik – Pf-Parasitologie, Fieber und MPM (Fortsetzung)

ID	Dicker Tropfen		Schnelltest	Fieber*	MPM**
	Trophozoiten	Gametzoyten			
	p/ μ l	g/ μ l	Paracheck pos./neg.	ja/nein	ja/nein
MP015	0	0	***	nein	ja
MP017	0	0	***	nein	nein
MP018	0	0	***	nein	ja
MP019	0	0	***	nein	nein
MP020	138	12	***	nein	ja
MP021	0	0	***	nein	nein
MP022	0	0	***	nein	nein
MP023	0	0	***	nein	ja
MP024	0	0	***	nein	ja
MP025	0	0	***	nein	ja
MP026	0	0	***	nein	nein
MP027	0	0	***	nein	ja
MP028	0	6	***	ja	nein
MP029	0	0	***	ja	nein
MP030	0	0	***	nein	ja
MP033	0	0	***	nein	ja
MP034	0	0	***	ja	ja
MP035	0	0	neg.	nein	ja
MP036	78	0	pos.	nein	nein
MP037	0	0	***	nein	ja
MP038	0	0	neg.	ja	ja
MP039	0	0	neg.	nein	ja
MP040	0	0	neg.	nein	ja
MP041	0	0	neg.	nein	ja
MP042	0	0	pos.	ja	ja
MP043	0	0	neg.	nein	ja
MP044	0	0	neg.	nein	ja
MP045	0	0	neg.	ja	nein
MP046	0	0	neg.	nein	ja
MP047	0	0	neg.	nein	ja

Tabelle 3.3: Parasitologische Diagnostik – Pf-Parasitologie, Fieber und MPM (Fortsetzung)

ID	Dicker Tropfen		Schnelltest	Fieber*	MPM**
	Trophozoiten	Gametzoyten			
	p/ μ l	g/ μ l	Paracheck pos./neg.	ja/nein	ja/nein
MP048	0	0	neg.	nein	nein
MP049	690	0	pos.	nein	ja
MP050	0	0	neg.	nein	ja
MP051	0	0	neg.	nein	ja
MP052	0	0	neg.	nein	ja
MP053	0	0	neg.	nein	ja
MP054	0	0	neg.	ja	ja
MP055	0	0	neg.	nein	nein
MP056	0	0	neg.	nein	nein
MP057	365	0	pos.	nein	nein
MP058	0	0	neg.	nein	nein
MP059	0	0	pos.	nein	ja
MP062	0	0	neg.	nein	nein
MP063	0	0	neg.	ja	nein
MP064	0	0	neg.	ja	nein
MP065	0	0	neg.	ja	nein
MP066	0	0	neg.	nein	nein
MP067	0	0	neg.	nein	ja
MP068	0	0	neg.	ja	ja
MP069	0	0	neg.	nein	nein
MP070	0	0	neg.	nein	ja
MP071	0	0	neg.	nein	ja
MP072	11	0	neg.	nein	nein
MP073	0	0	neg.	nein	ja
MP074	0	0	neg.	nein	nein
MP075	0	0	neg.	ja	ja
MP076	0	0	***	nein	ja

3.2.2 Hämatologie

Die Gesamtübersicht der Ergebnisse der hämatologischen Diagnostik wird in Tabelle 3.5 aufgeführt. Eine deskriptive Analyse der Ergebnisse des Blutbildes mit Differentialblutbild wird zusammenfassend in Tabelle 3.4 dargestellt, dabei werden die folgenden Variablen aufgeführt: Hämoglobin (Hb)-Konzentration, Lymphozyten (Zellen der adaptiven Immunabwehr) und neutrophile und eosinophile Granulozyten (Zellen der angeborenen Immunabwehr). Basophile Granulozyten werden nicht aufgeführt, da sie bei sehr niedrigen Konzentrationen eine sehr geringe Schwankungsbreite zwischen den Probanden in den Ergebnissen gezeigt haben und die Ergebnisse in der maschinellen Auswertung durch häufige Fehlermeldungen verzerrt wurden. Es fällt auf, dass die mittlere Hämoglobinkonzentration im niedrigen Normbereich liegt. Achtundvierzig Komma drei Prozent ($n = 29$) der eingeschlossenen Probanden wiesen eine Anämie ($w < 12$ g/dl, $m < 13$ g/dl) auf, davon waren 79,3 % weiblich ($n = 23$). Innerhalb der Anämien wiesen 65,6 % ($n = 19$) eine leichtgradige (11,0-11,9 g/dl) und 34,5 % ($n = 10$) eine mittelgradige Anämie, gemessen an Referenzwerten der WHO, auf.[208] Schwergradige Anämie traten in drei Fällen auf, waren jedoch ein Ausschlusskriterium der Studie und finden sich nicht in den Studienergebnissen wieder. Die Leukozyten-Konzentrationen lagen im Mittel im Normbereich, die Konzentrationen der eosinophilen Granulozyten lag in 75 % ($n = 45$) der Fälle deutlich über der oberen Grenze der laborspezifischen nicht-pathologischen Referenzwerte (Referenzwerte s. Abb. 3.5).

Tabelle 3.5: Gesamtübersicht über die hämatologische Diagnostik (ID = Identifikationsnummer, w = weiblich, m = männlich, Hb = Hämoglobin, Leuko = Leukozyten, Lympho = Lymphozyten, Neutro = neutrophile Granulozyten, Eosino = eosinophile Granulozyten). Referenzwerte: Hb $\geq 13,0$ g/dl [m] und $\geq 12,0$ g/dl [w], Leukozyten $4-10 \cdot 10^3/\text{mm}^3$, Lymphozyten $1,0-4,0 \cdot 10^3/\text{mm}^3$, Neutrophile Granulozyten $2,0-7,5 \cdot 10^3/\text{mm}^3$, Eosinophile Granulozyten $0,0-0,5 \cdot 10^3/\text{mm}^3$. (n) = erniedrigt, (h) = erhöht. *Ergebnis fehlt.

ID	Geschlecht	Hb g/dl	Leuko- zyten $10^3/\text{mm}^3$	Lympho- zyten %	Neutro- phile %	Eosino- phile %
	w/m					
MP011	m	12,8 (n)	5,0	41	21 (n)	27 (h)
MP012	m	14,2	8,4	34	44 (n)	21 (h)
MP013	m	14,1	6,9	40	36 (n)	22 (h)
MP015	w	10,9 (n)	5,9	59	39 (n)	1
MP017	m	13,7	10,0	37	44 (n)	11 (h)

Tabelle 3.5: Gesamtübersicht über die hämatologische Diagnostik (Fortsetzung)

ID	Geschlecht	Hb	Leuko- zyten	Lympho- zyten	Neutro- phile	Eosino- phile
MP018	w	10,9 (n)	3,4 (n)	36	48 (n)	9 (h)
MP019	w	13,0	8,2	37	32 (n)	24 (h)
MP020	m	16,4	7,0	30	54	8 (h)
MP021	m	11,7 (n)	2,9 (n)	45	41 (n)	4
MP022	m	11,6 (n)	5,7	28	*	*
MP023	m	16,5	7,1	31	31 (n)	23 (h)
MP024	w	11,9 (n)	5,0	43	32 (n)	12 (h)
MP025	w	11,1 (n)	5,6	33	38 (n)	22 (h)
MP026	m	14,2	7,9	40	39 (n)	19 (h)
MP027	w	11,9 (n)	6,7	49	48 (n)	2
MP028	m	13,6	9,7	24 (n)	74	0 (n)
MP029	w	12,1	6,5	36	50	5 (h)
MP030	w	10,2 (n)	6,1	23 (n)	46 (n)	20 (h)
MP033	w	10,8 (n)	6,3	41	26 (n)	24 (h)
MP034	w	11,3 (n)	5,0	39	47 (n)	5 (h)
MP035	w	10,2 (n)	8,2	37	43 (n)	10 (h)
MP036	m	13,0	13,7 (h)	42	30 (n)	26 (h)
MP037	m	13,1	10,9 (h)	35	35 (n)	21 (h)
MP038	w	11,9 (n)	8,9	43	*	*
MP039	w	11,2 (n)	6,0	42	*	*
MP040	w	11,1 (n)	10,4 (h)	33	33 (n)	28 (h)
MP041	m	14,3	8,6	40	20 (n)	30 (h)
MP042	w	10,9 (n)	12,9 (h)	29	44 (n)	18 (h)
MP043	m	14,7	7,8	29	31 (h)	33 (h)
MP044	m	13,6	12,0 (h)	41	22 (n)	31 (h)
MP045	m	13,5	9,0	39	31 (n)	20 (h)
MP046	w	10,6 (n)	8,7	34	36 (n)	25 (h)
MP047	w	11,5 (n)	7,1	39	*	*
MP048	m	13,2	10,3 (h)	45	42 (n)	7 (h)
MP049	m	13,2	9,8	49 (n)	*	*
MP050	m	13,3	13,2 (h)	40	20 (n)	32 (h)
MP051	w	13,2	8,1	38	39 (n)	15 (h)

Tabelle 3.5: Gesamtübersicht über die hämatologische Diagnostik (Fortsetzung)

ID	Geschlecht	Hb	Leuko- zyten	Lympho- zyten	Neutro- phile	Eosino- phile
MP052	m	13,1	10,4 (h)	36	*	*
MP053	m	12,9 (n)	8,9	39	40 (n)	11 (h)
MP054	m	12,1 (n)	16,1 (h)	30	*	*
MP055	m	13,1	8,5	26	35 (n)	31 (h)
MP056	m	14,1	6,5	66	14 (n)	3
MP057	w	11,3 (n)	6,8	45	33 (n)	9 (h)
MP058	m	13,1	12,8 (h)	37	22 (n)	31 (h)
MP059	w	10,3 (n)	7,6	40	35 (n)	16 (h)
MP062	w	11,0 (n)	11,1 (h)	31	46 (n)	13 (h)
MP063	w	11,8 (n)	28 (h)	32	22 (n)	17 (h)
MP064	m	21,4 (h)	7,9	30	29 (n)	21 (h)
MP065	m	13,9	50,4 (h)	18 (n)	31 (n)	11 (h)
MP066	m	15,4	7,0	30	39 (n)	24 (h)
MP067	m	14,3	5,5	30	38 (n)	18 (h)
MP068	m	12,2 (n)	6,5	42	33 (n)	15 (h)
MP069	m	22,0 (h)	8,5	22 (n)	27 (n)	25 (h)
MP070	m	13,2	38,0 (h)	51	19 (n)	21 (h)
MP071	m	15,1	30,8(h)	24 (n)	26 (n)	16 (h)
MP072	w	10,9 (n)	2,8 (n)	26	48 (n)	14 (h)
MP073	w	11,4 (n)	5,5	25	40 (n)	22 (h)
MP074	m	14,5	8,2	33	27 (n)	29 (h)
MP075	w	9,6 (n)	6,9	24	49 (n)	17 (h)
MP076	w	11,8 (n)	3,7 (n)	52	37 (n)	8 (h)

3.2.3 Assoziationen zwischen Blutbildparametern, *Pf*-Infektion und Malariasymptomen

Die Hb-, Leukozyten- und eosinophilen Granulozytenkonzentrationen werden in Abbildung 3.5 im Vergleich zwischen *Pf*-positiven und -negativen Probanden im Boxplot dargestellt. Dabei wurde zusätzlich der Grenznormwert des jeweiligen Blutbildparameters abgebildet (Hämoglobin: unterer Grenzwert = 12,0 g/dl, Leukozyten:

Tabelle 3.4: Blutbild mit Differentialblutbild - Deskriptive Analyse (Hb = Hämoglobin, SD = Standardabweichung, NV = Anzahl nicht-valider, nicht einbezogener Messungen)

	Probanden total				
	Hb	Leukozyten	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile
	g/dl	$10^3/\text{mm}^3$	%	%	%
Minimum	9,60	2,8	17,5	13,8	0,2
1. Quartile	11,3	6,4	30,0	30,2	10,2
Median	12,9	8,0	37,1	35,9	17,6
Mittelwert	12,9	9,8	36,6	36,5	17,1
3. Quartile	13,7	10,0	40,8	44,2	23,9
Maximum	22	50,4	66,2	74,2	33,1
SD	2,2	7,9	9,0	11,0	9,0
NV	1	1	1	8	8

oberer Grenzwert = $4 \cdot 10^3/\text{mm}^3$, eosinophile Granulozyten: $0,0\text{-}0,5 \cdot 10^3/\text{mm}^3$). Die Datenpunkte von Probanden, die in der Anamnese Fieber in den letzten 48 Stunden angegeben hatten, wurden rot markiert.

Von allen Blutparametern war dabei einzig bei den eosinophilen Granulozytenkonzentrationen eine Assoziation mit den entsprechenden IgG-GMZ2-Reaktivitäten im Serum zu beobachten (s. Abb. 3.5 D-E).

In dem untersuchten Kollektiv gesunder Probanden war kein statistischer Zusammenhang zwischen einer *Pf*-Infektion im Dicken Tropfen und/oder *Pf*-Schnelltest und einer Anämie bzw. Fieber in den letzten 48 Stunden vorhanden (s. Abb. 3.4). Die Angaben zu Fieber in den letzten 48 Stunden wurden jedoch subjektiv von den Probanden ohne Grundlagen von Messungen angegeben.

3.3 Analyse der IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität

Aus dem Serum der venösen Blutproben aller Probanden wurden mithilfe des ELISA IgG- und IgM-Konzentrationen gemessen, die eine Spezifität für GMZ2 aufwiesen. Als naive Kontrollprobe diente venöses Blut eines Mitteleuropäers, der sich bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme nie in einem Malariaendemiegebiet aufgehalten hatte.

Die photometrischen Ergebnisse werden in den Tabellen 3.6 und 3.7 mittels deskrip-

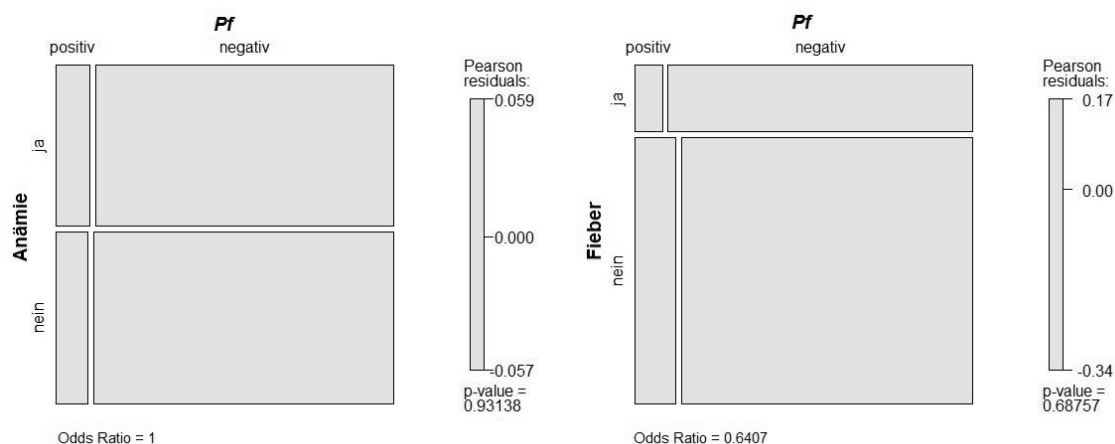


Abb. 3.4: *Pf-Infektion versus Anämie und Pf-Infektion versus Fieber. Kontingenztabelle als Mosaikplot mit Odds Ratio und Pearson residuals.*

tiver Analyse jeweils für die IgG- und IgM-GMZ2-Reaktivitäten aufgeführt. Die IgG- und IgM-GMZ2-Reaktivitäten jeweils in Subpopulationen nach Regionen innerhalb des Studienggebietes mit Bezug zu Median und Mittelwert des Probandenkollektivs werden in Abbildung 3.5 dargestellt.

Eine explorative Datenanalyse von *Pf*-positiven und negativen sowie regionaler Subpopulation wird unter 3.3.2 dargestellt. Anschließend werden Ergebnisse der statistischen Untersuchungen zwischen regionalen Subpopulationen aufgeführt.

3.3.1 Deskriptive Analyse der IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität

IgG-GMZ2-Serumreaktivität

Alle Proben zeigten Reaktionen im anti-GMZ2-IgG-ELISA, wobei die Probanden der Studienpopulation hohe Titer an Serum-IgG gegen GMZ2 zeigte. Unter der lebenslang malariaexponierten Studienpopulation war der Anteil der Serumisolate mit IgG-Reaktivitäten gegenüber GMZ2 (Mittelwert (MW) 3,343, Standardabweichung (SD) 0,309) um den Faktor 13 größer, als in der naiven Kontrollprobe. Die Standardabweichung um das Mittel war bei einer Verdünnung von 0,01 innerhalb der Studienpopulation mit 0,309 vergleichsweise klein.

Es zeigte sich auch hinsichtlich der IgM-GMZ2-Reaktivität im Serum eine statistisch signifikante Differenz ($p = 0,0281$) zwischen der Studienpopulation (MW) und der *Pf*-naiven Referenzprobe. Allerdings ist diese um ein ca. 47-faches geringer, als die Differenz der IgG-GMZ2-Reaktivität (s. Tab. 3.9). Eine Übersicht über die Ergebnisse der IgG-Serumreaktivität gegen GMZ2 wird in Tabelle 3.6 aufgeführt.

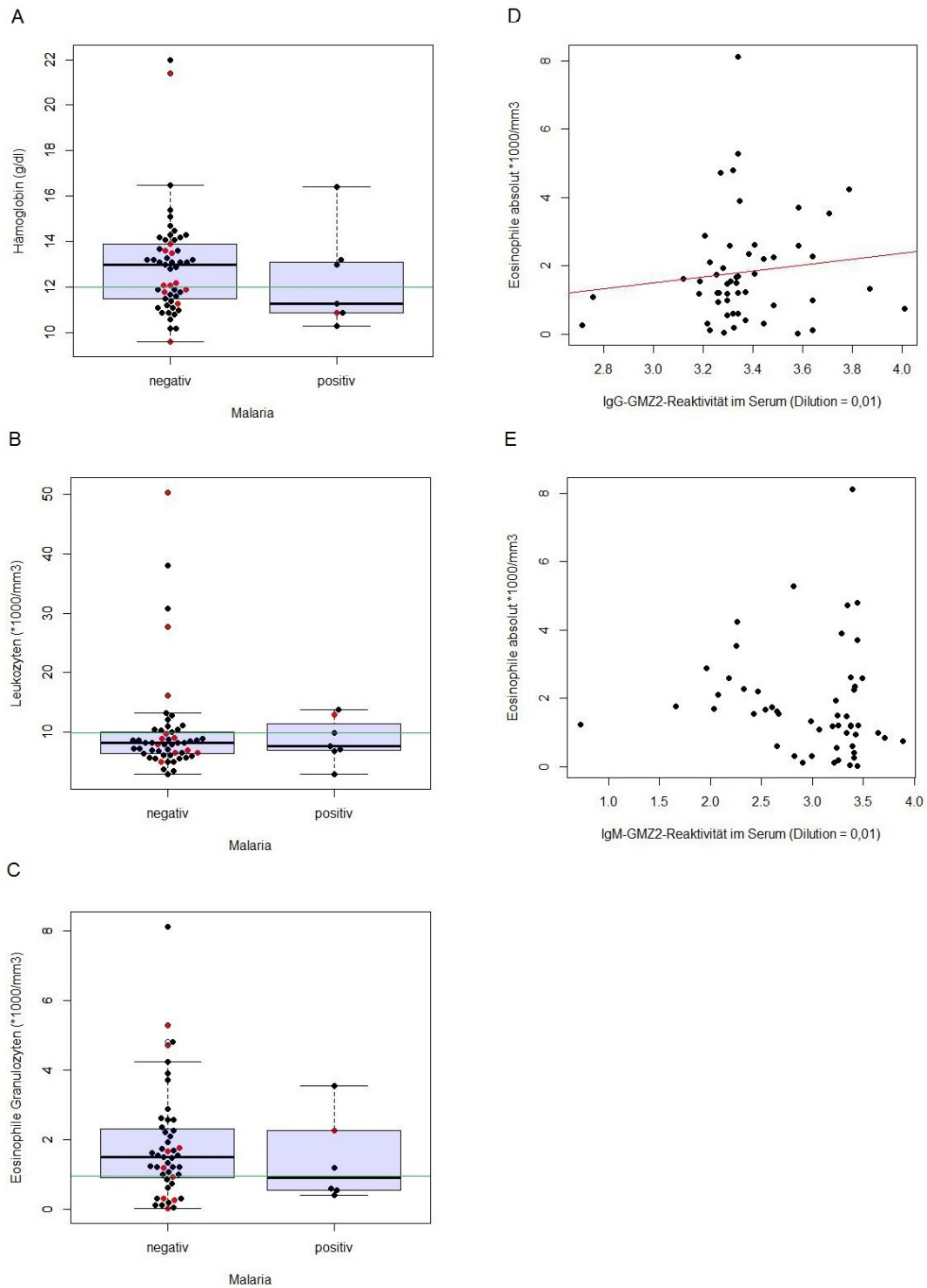


Abb. 3.5: A-C: Darstellung der Hb-, Leukozyten- und eosinophilen Granulozytenkonzentrationen nach Probanden im Boxplot mit Grenznormwert im Vergleich zwischen Pf-positiv und -negativ ('Malaria positiv' = Pf-Infektion im Dicken Topfen und/oder im Schnelltest, grüne Linie = unterer (Hb) bzw. oberer (Leukozyten, eosinophile Granulozyten) Grenznormwert für den jeweiligen Blutbildparameter, rote Punkte = anamnestische Angabe von Fieber ≥ 38 °C in den letzten 48 h). D-E: Eosinophile Granulozytenkonzentration in Relation zur GMZ2-IgG- bzw. -IgM-Serumreaktivitäten, jeweils mit Regressionsgerade.

Tabelle 3.6: IgG-GMZ2-Serumreaktivität – Deskriptive Analyse (*SD = Standardabweichung, Verdün. = Verdünnung, Quart. = Quartile, Min. = Minimum, MW = Mittelwert, Max. = Maximum*)

Pf-naives Referenzserum								
Verdün.	0,01	2,5e ⁻³	6,25e ⁻⁴	1,56e ⁻⁴	3,9e ⁻⁵	9,8e ⁻⁶	2,44e ⁻⁶	6e ⁻⁷
<i>Pf-naiv</i>	0,2563	0,215	0,1595	0,1556	0,1655	0,156	0,141	0,115
Probanden total								
Verdün.	0,01	2,5e ⁻³	6,25e ⁻⁴	1,56e ⁻⁴	3,9e ⁻⁵	9,8e ⁻⁶	2,44e ⁻⁶	6e ⁻⁷
Min.	2,015	1,750	1,916	1,357	0,7158	0,2554	0,1280	0,0930
1. Quart.	3,262	3,171	2,990	2,539	1,3590	0,5580	0,2117	0,1371
Median	3,334	3,278	3,380	2,857	1,5780	0,6621	0,2549	0,1742
MW	3,343	3,218	3,218	2,811	1,7948	0,7353	0,2845	0,1965
3. Quart.	3,444	3,320	3,440	3,248	2,3657	0,9145	0,3292	0,2424
Max.	4,008	3,652	3,577	3,366	3,2415	1,7775	0,6070	0,4713
SD	0,309	0,254	0,332	0,482	0,6516	0,2991	0,1007	0,0827
Varianz	0,095	0,065	0,110	0,233	0,4246	0,0894	0,0101	0,0068

Tabelle 3.7: IgM-GMZ2-Serumreaktivität im Serum – Deskriptive Analyse (*SD = Standardabweichung, Verdün. = Verdünnung, Quart. = Quartile, Min. = Minimum, MW = Mittelwert, Max. = Maximum*)

Pf-naives Referenzserum								
Verdün.	0,01	2,5e ⁻³	6,25e ⁻⁴	1,56e ⁻⁴	3,9e ⁻⁵	9,8e ⁻⁶	2,44e ⁻⁶	6e ⁻⁷
<i>Pf-naiv</i>	0,504	0,267	0,224	0,119	0,094	0,088	0,066	0,085
Probanden total								
Verdün.	0,01	2,5e ⁻³	6,25e ⁻⁴	1,56e ⁻⁴	3,9e ⁻⁵	9,8e ⁻⁶	2,44e ⁻⁶	6e ⁻⁷
Min.	0,7260	0,3320	0,2090	0,1630	0,1130	0,0840	0,0670	0,0720
1. Quart.	2,626	1,393	0,8004	0,3505	0,1951	0,1140	0,0820	0,0865
Median	3,2527	2,6980	1,6974	0,7790	0,3400	0,1614	0,1080	0,0973
MW	3,0033	2,3545	1,5923	0,8643	0,4149	0,1960	0,1243	0,1065
3. Quart.	3,4050	3,1890	2,1778	1,1531	0,5375	0,2248	0,1446	0,1100
Max.	3,8830	3,4180	3,5620	3,2540	1,5766	0,6716	0,3736	0,4230
SD	0,6180	0,9212	0,8498	0,6405	0,3096	0,1237	0,0588	0,0469
Varianz	0,3820	0,8486	0,7222	0,4102	0,0959	0,0153	0,0035	0,0022

IgM-GMZ2-Serumreaktivität

Alle untersuchten Serumisolate wiesen ebenfalls eine IgM-Spezifität für GMZ2 auf. Die IgM-Reaktivität der malariaexponierten Studienpopulationsisolate (MW 3,003, SD 0,618) wies eine um den Faktor sechs höhere IgM-Reaktivität gegenüber GMZ2 auf, als die naive Kontrolle. Die Differenz der IgM-Reaktivität war zwischen naiver Kontrolle und Studienisolaten dementsprechend deutlich niedriger, als für die der IgG-Reaktivität. Auch die Standardabweichung war innerhalb der Studienpopulation bei einer Verdünnung von 0,01 mit 0,618 deutlich größer. Eine Übersicht mit deskriptiver Analyse der Extinktionsergebnisse der IgM-Serumreaktivitäten für GMZ2 wird in Tabelle 3.7 dargestellt.

3.3.2 Explorative Analyse der IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität nach regionalen und individuellen Subpopulationen

Einteilung in Subpopulationen

Vor Beginn der praktischen Studienphase war geplant, die Studienpopulation aus dem Studienkollektiv des MRU und darüber hinaus innerhalb des Stadtgebietes Lambarénés zu rekrutieren. Da das MRU des Albert-Schweitzer-Krankenhauses auch von Eltern mit ihren Kindern aus weiter entfernten Dörfern aufgesucht wird, wurde erhofft, dadurch eine große Diversität an Wohnorten zu akkumulieren.

In den stets direkt nach Probengewinnung durchgeführten FACS-Analysen zeigten sich Tendenzen abweichender B-Zellfrequenzen gegen GMZ2 zwischen PBMC aus Lambaréné und weiter entfernten Dörfern. Daraufhin wurde die Hypothese einer differierende *Pf*-Immunität zwischen städtischen und ländlichen Regionen aufgestellt und die Rekrutierung auf Probanden aus entlegeneren Regionen, die zum Teil außerhalb des üblichen Einzugsgebietes des MRU liegen, ausgeweitet.

Das Studienkollektiv wurde nach dem in Abbildung 3.6 dargestellten Schema in regionale Subgruppen eingeteilt.

Zusätzlich zu den abgebildeten regionalen Subpopulationen werden einzelne Probanden hervorgehoben, bei denen aufgrund ihrer Lebensumgebung eine besonders hohe *Pf*-Exposition angenommen wurde. Die unter Abschnitt 3.4 hervorgehobenen Probanden mit hohen MBC-Frequenzen gegen GMZ2 MP036, MP070 und MP071, werden ebenfalls isoliert dargestellt.



Abb. 3.6: Geografische Verteilung der Studienpopulation – Einteilung in regionale Subpopulationen: bei den Subpopulationen “Lambaréné” und “Ndjolé” handelt es sich um städtische, bei allen weiteren Subpopulationen um dörfliche Regionen. Die von Lambaréné ausgehenden Bundesstraßen Route (Bundesstraße) (Rt.) Fougamou und die Rt. Libreville werden nach ihren Zielstädten benannt. Eingeschlossene Probanden aus den Dörfern entlang der ca. 88 km langen Rt. Fougamou und einer ca. 63 km langen Teilstrecke der Rt. Libreville wurden bei der Analyse jeweils zu einer Population zusammengefasst: “Rt. Fougamou” und “Rt. Libreville”. Entlang der, aufgrund ihrer engen, kurvenreichen Fahrspur auf bergigem Gelände als gefährlich geltenden, dünn besiedelten Rt. Ndjolé wurde das einzige Dorf und eine Behausung am PK1 eingeschlossen (“Rt. Ndjolé”). Die Stadt Ndjolé liegt 105 Straßenkilometer von Lambaréné entfernt.

Darstellung der IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität nach Subpopulationen

Die IgG- und IgM-GMZ2-Reaktivitäten der Gesamtpopulation im Vergleich zur nativen Kontrollprobe, sowie die der oben genannten Subpopulationen im Vergleich zum Mittelwert und Median der Studienpopulation, werden in Abbildung 3.7 dargestellt.

Explorative Analyse der IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität nach Pf-Status und regionalen Subpopulationen im *Boxplot*

In Abbildung 3.12 werden asymptomatische, im Dicken Tropfen *Pf*-positive Proben *Pf*-negativen Probanden gegenübergestellt. *Pf*-positive Probanden wiesen eine im Mittel höhere IgG- und IgM-GMZ2-Reaktivität (Verdünnung 0,01) auf. Die Streuung der Werte war bei *Pf*-negativen Probanden größer, als bei *Pf*-positiven. IgM-Reaktivitäten der *Pf*-negativen Probanden zeigten dabei die größte Streuung.

Alle nach dem Schema in Abbildung 3.6 gebildeten regionalen Gruppen wurden separat nach IgG- und IgM-GMZ2-Reaktivitäten (Verdünnung 0,01) im Boxplot gegeneinander dargestellt. Die IgG-Reaktivität (s. Abb. 3.10) aller Subpopulationen wies eine höhere Reaktivität im Vergleich zum Probandenkollektiv aus Lambaréné auf. Die entsprechenden Ergebnisse nach regionalen Subpopulationen aus den anderen Gemeinden stellten sich heterogen dar.

Die Vergleiche der IgM-GMZ2-Reaktivität der regionalen Subpopulationen sowie des Stadt-Land-Vergleichs zeigen im Boxplot vergleichsweise eine größere Heterogenität (s. Abb. 3.11). Die Mittelwerte der dörflichen und städtischen Subpopulationen unterscheiden sich kaum, allerdings lässt sich bei den in Dörfern lebenden Probanden eine sehr große Streuung der IgM-GMZ2-Reaktivität feststellen.

Statistische Analyse der IgG- und IgM-GMZ2-Serumreaktivität im Stadt-Land-Vergleich

Es werden die Ergebnisse der statistischen Analyse der IgG- sowie IgM-GMZ2-Reaktivität im Serum (Verdünnung 0,01) nach den dörflichen Regionen (“Dörfer”) und Städten (“Lambaréné” und “Ndjolé”) dargestellt.

Hinsichtlich der IgG-GMZ2-Reaktivität (s. Tab. 3.8) lagen die Werte der Subpopulation aus dörflichen Regionen signifikant über denen des Probandenkollektivs aus Lambaréné ($p = 0,0048$). Die Werte der Subpopulation aus der Stadt Ndjolé lagen ebenfalls signifikant über denen des Probandenkollektivs aus Lambaréné (p

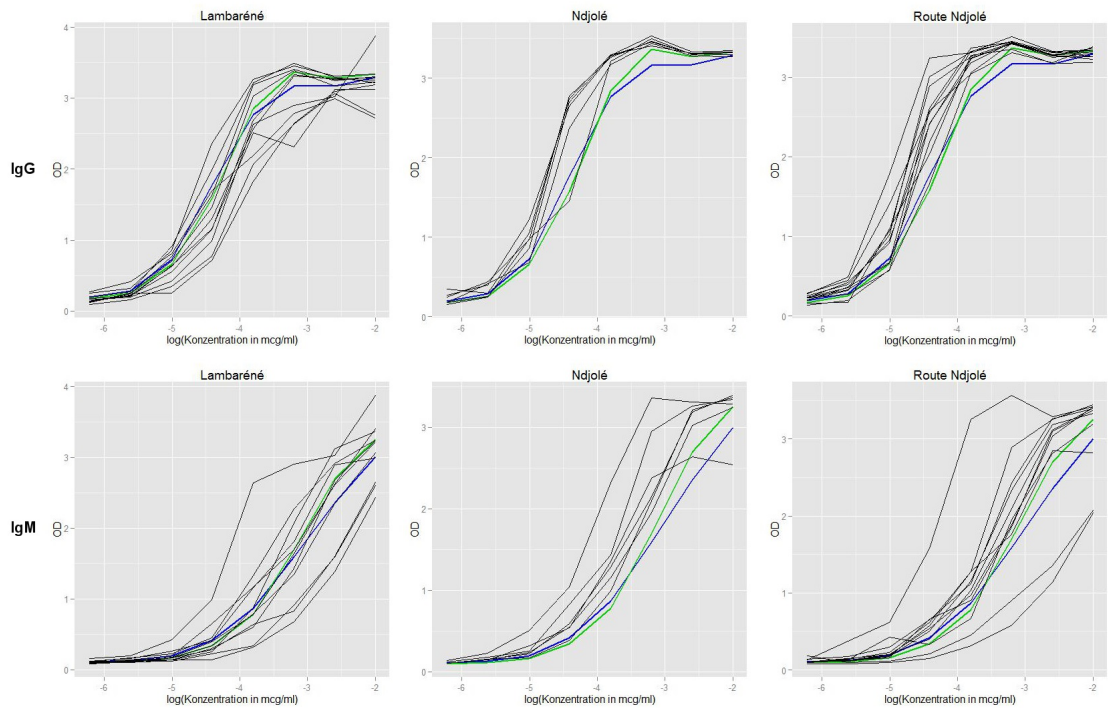
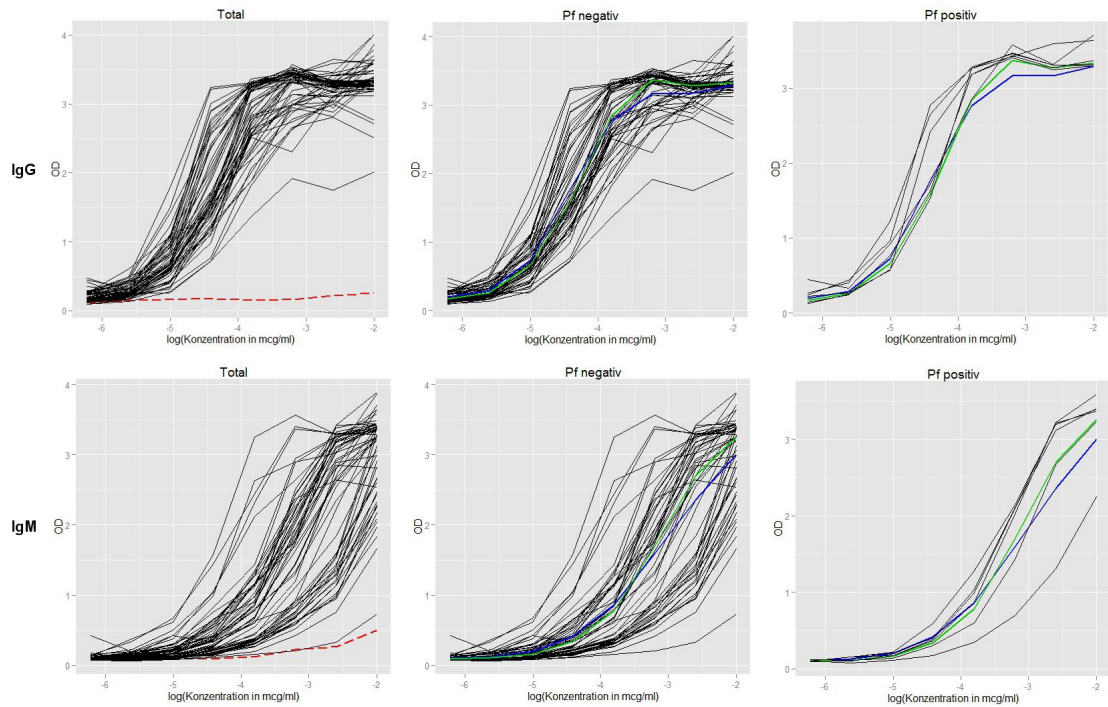


Abb. 3.7: IgG- und IgM-GMZ2-Reaktivitäten im Serum – Total und nach Subpopulationen Jeweils oben IgG-GMZ2-Reaktivität und unten IgM-GMZ2-Reaktivität im Serum als Logit-Log-Plot nach Subpopulationen (*x*-Achse = Logarithmus der Konzentration der Verdünnungsreihe, *y*-Achse = Optische Dichte der Ergebnisse im ELISA; rote Linie = Pf-naïve Referenzprobe, blaue Linie = Mittelwert, grüne Linie = Median, jeweils der gesamten Studienpopulation exkl. der Referenzprobe). Dargestellte Subpopulationen: Studienpopulation Total mit Pf-naïver Referenzprobe, Pf-negative Proben, Pf-positive Studienproben, “Lambaréné”, “Ndjolé”, “Rt. Ndjolé”.

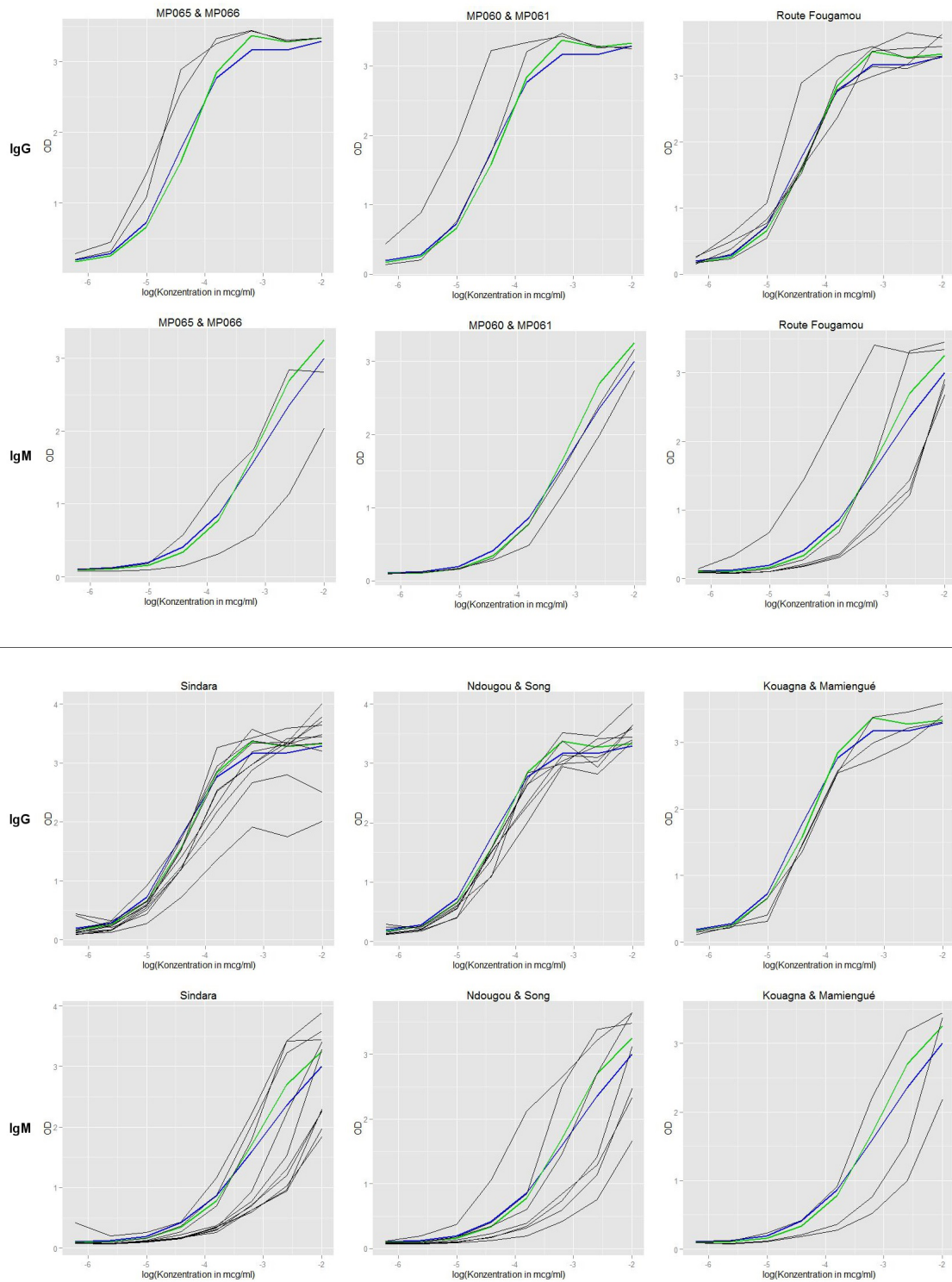


Abb. 3.8: Fortsetzung von Abb. 3.7. Dargestellte Subpopulationen: MP065 & MP066, MP060 & MP061, "Rt. Fougamou", "Sindara", "Ndougou & Song", "Kouagna & Mamiengué".

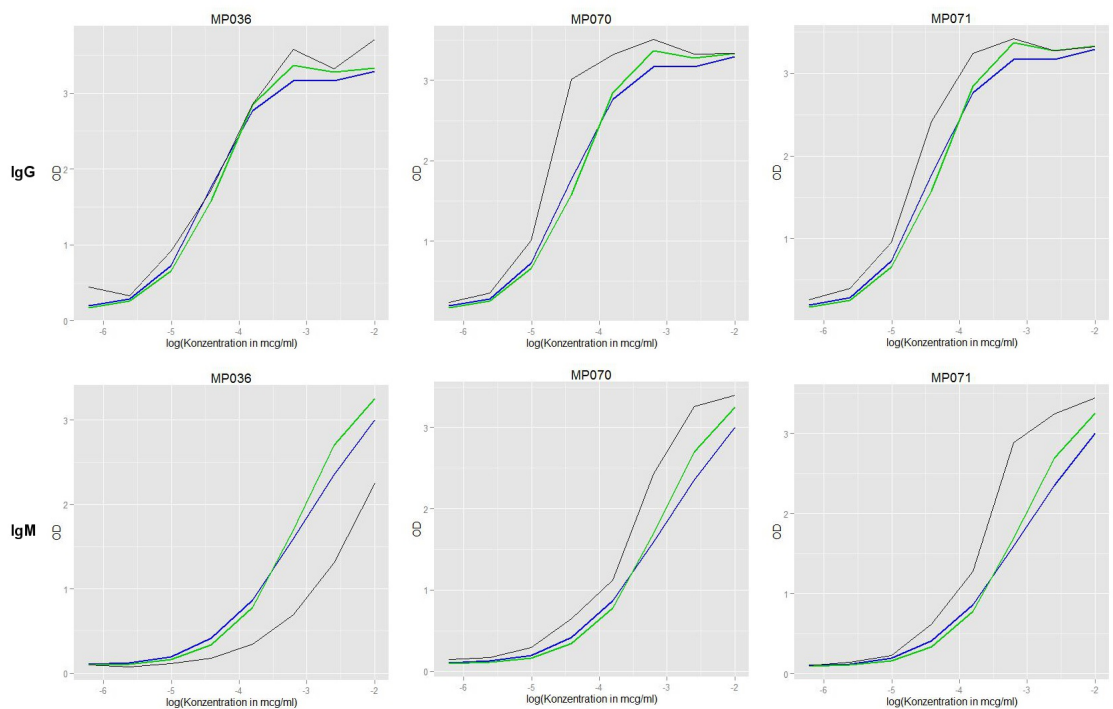
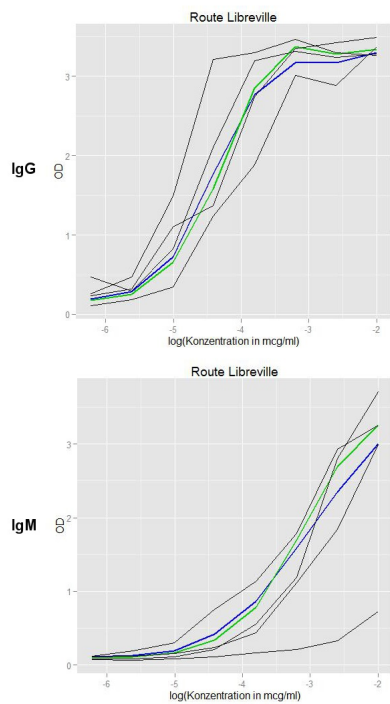


Abb. 3.9: Fortsetzung von Abb. 3.7. Dargestellte Subpopulationen: "Rt. Libreville", MP036, MP070, MP071.

IgG

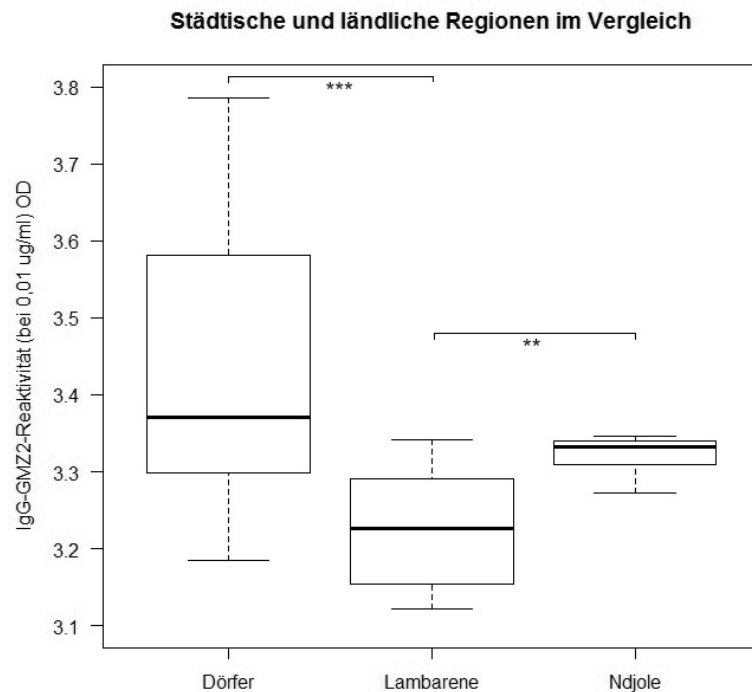
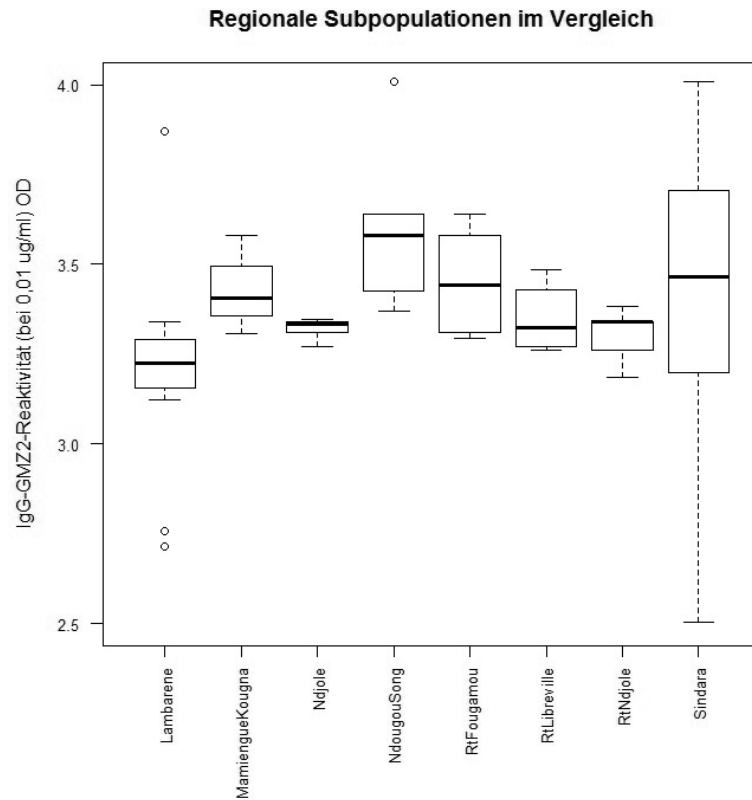


Abb. 3.10: IgG-Serumreaktivität nach Subpopulationen und im Stadt-Land-Vergleich – Vergleich der IgG-GMZ2-Reaktivität (Verdünnung 0,01) nach regionalen Subpopulationen und im Stadt-Land-Vergleich im Boxplot (* = Signifikanzniveau).

IgM

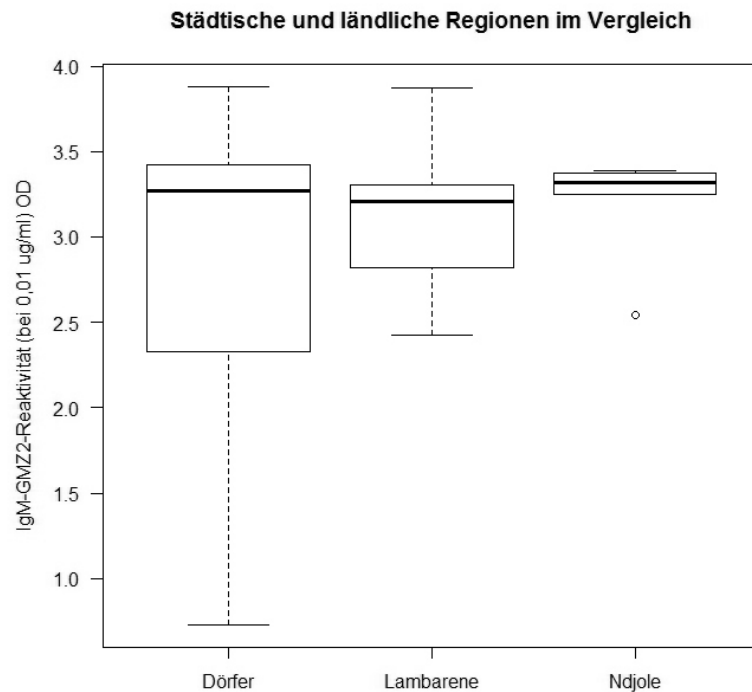
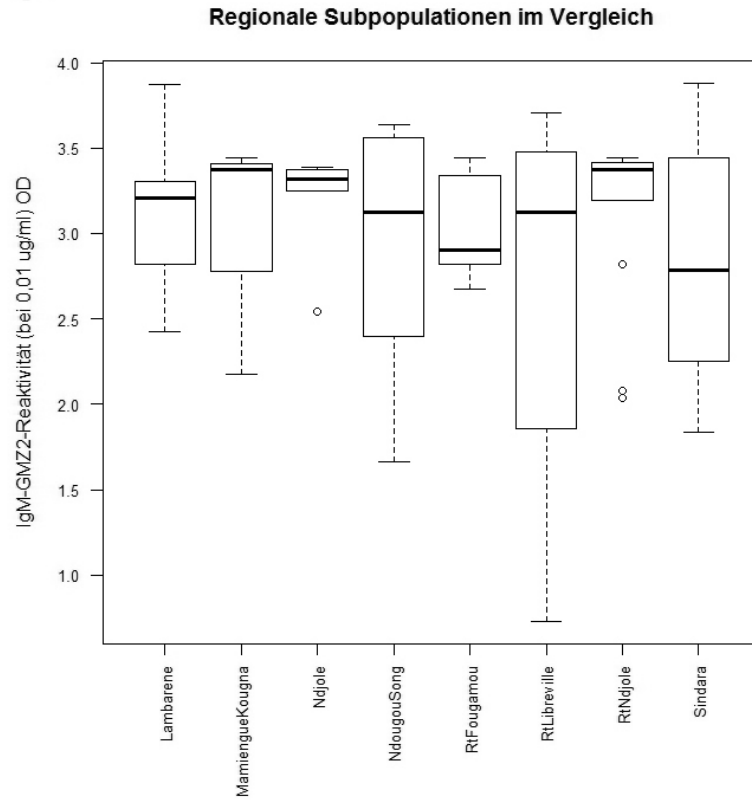


Abb. 3.11: IgM-Serumreaktivität nach Subpopulationen und im Stadt-Land-Vergleich – Vergleich der IgM-GMZ2-Reaktivitäten (Verdünnung 0,01) nach regionalen Subpopulationen und im Stadt-Land-Vergleich im Boxplot.

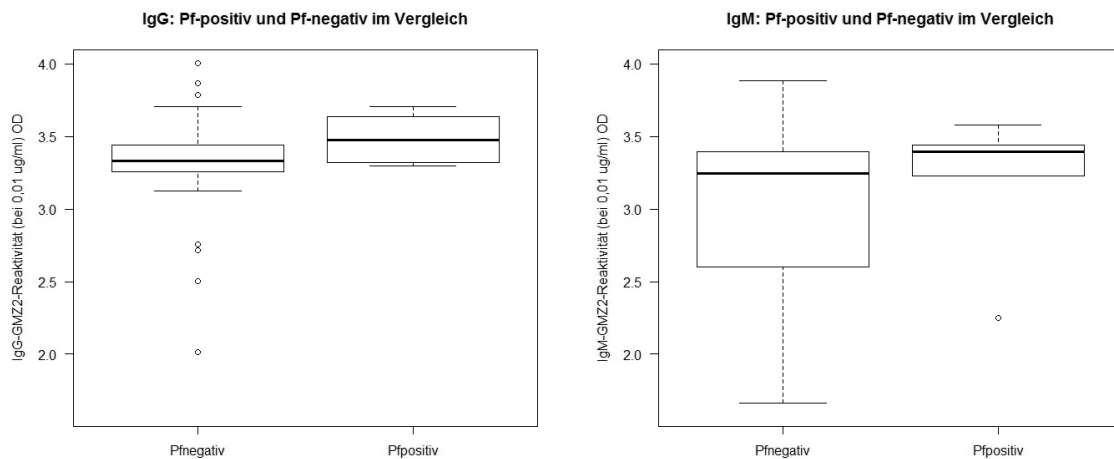


Abb. 3.12: Pf-positive und Pf-negative Subpopulationen im Vergleich – Vergleich der IgG- und IgM-GMZ2-Reaktivitäten (Verdünnung 0,01) des Pf-positiven und Pf-negativen Probandenkollektivs im Boxplot.

Tabelle 3.8: IgG-GMZ2-Reaktivität (Verdünnung 0,01) im Stadt-Land-Vergleich – Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis-Test. (Rt. = Bundesstraße, * = Signifikanzniveau, df = Freiheitsgrade)

Population A	Population B	p-Wert
Lambaréne	Dörfer	0.00482**
Lambaréné	Ndjolé	0.02965*
Ndjolé	Dörfer	0.1746
Zwischen o. g. Populationen		0.007711***
(Kruskal-Wallis chi-squared = 9.7303, df = 2)		

= 0,0297). Die Subpopulation Ndjolé wies hingegen keine statistisch signifikante Differenz zu dem dörflichen Probandenkollektiv auf ($p = 0,1746$). Im statistischen Vergleich zeigte sich zudem eine signifikante Differenz zwischen den drei Gruppen “Dörfer”, “Lambaréné” und “Ndjolé” ($p = 0,0077$).

Die gleichen Berechnungen zum Vergleich der IgM-GMZ2-Reaktivitäten der drei Gruppen (Verdünnung 0,01) zeigten jeweils keine statistisch signifikanten Unterschiede (s. Tab. 3.9).

Tabelle 3.9: IgM-GMZ2-Reaktivität (Verdünnung 0,01) im Stadt-Land-Vergleich – Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis-Test. (Rt. = Bundesstraße, df = Freiheitsgrade)

Population A	Population B	p-Wert)
Lambaréné	Dörfer	0.7801
Lambaréné	Ndjolé	0.3502
Ndjolé	Dörfer	0.9878
Zwischen o. g. Populationen		0.4405
(Kruskal-Wallis chi-squared = 10, df = 10)		

Tabelle 3.10: Vergleich der IgG- und IgM-Serumreaktivitäten gegen GMZ2 – Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

IgG-GMZ2	IgM-GMZ2	p-Wert
<i>Pf</i> -naiv	<i>Pf</i> -naiv	0.4418
Median total	Median total	0.1605
Mittelwert total	Mittelwert total	0.1605

3.3.3 Vergleich der IgM- und IgG-GMZ2-Serumreaktivität

Ein statistischer Vergleich der IgG- und IgM-GMZ2 sowie *Pf*-naiven Proben ($p = 0,4418$) nach Mittelwerten ($p = 0,1605$), Medianen ($p = 0,1605$) zeigte keinen signifikanten statistischen Zusammenhang (s. Tab. 3.10).

3.4 Analyse der GMZ2-reaktiven Memory-B-Zellen

3.4.1 Durchflusszytometrische Analyse der B-Zellpopulationen, insbesondere der klassischen und atypischen Memory-B-Zellen

Wir konnten von allen Studienteilnehmern PBMC isolieren und mithilfe durchflusszytometrischer Messungen im FACS ihre MBC analysieren. Nach einer ersten Auswertung der MBC der Screening-Blutproben wurde von den Probanden MP020, MP036, MP040, MP041, MP044, MP070 und MP073 zusätzlich 100 ml venöses Blut gewonnen aus denen die PBMC isoliert und für Folgestudien genutzt wurden (s. Müllenbeck et al. 2013).[124]

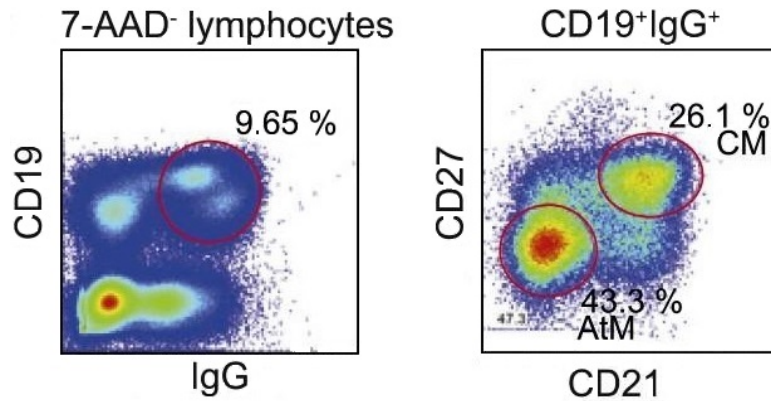


Abb. 3.13: FACS gating für die Isolation von klassischen und atypischen Memory-B-Zellen am Beispiel des PBMC-Isolats von MP070 (AtM = atypische MemBC, CM = klassische MemBC).[124]

Der Prozess des *gating* für die durchflusszytometrischen Isolation der klassischen und atypischen MBC aller PBMC-Isolate der Studienpopulation wird in Abbildung 3.13 dargestellt. In den im FACS analysierten Proben befanden sich im Mittel 98,8 % Lymphozyten und davon 11,9 % CD19⁺ B-Zellen (SD 0,8, Varianz 3,8) (s. Tab. 3.4.1).

Alle durchflusszytometrischen ermittelten B-Zell-Populationen werden nach naiven und reifen B-Zellen, klassischen und atypischen MBC nach deskriptiver Analyse in Tabelle 3.13 aufgeführt. Die PBMC-Isolate aller Studienteilnehmer zeigten hohe Raten an zirkulierenden klassischen IgG⁺ MBC (CD19⁺CD21⁺CD27⁺) und atypischen IgG⁺ MBC (CD19⁺CD21⁻CD27⁻) gegen GMZ2. In der *Pf*-naiven Kontrollprobe konnten zum Vergleich keine IgG⁺GMZ2⁺ MBC und deutlich weniger IgG⁻GMZ2⁺ MBC detektiert werden. Die zirkulierenden naiven Vorläufer-B-Zellen zeigten im Gegensatz dazu, wie zu erwarten, eine insgesamt niedrige Reaktivität (s. Abb. 3.14). In Abbildung 3.15 werden auszugsweise die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von GMZ2-reaktiven klassischen und atypischen MBC aus dem venösen Blut der Probanden MP036, MP070 und MP071 im Vergleich zu einer *Pf*-naiven Referenzprobe im Dotplot dargestellt.

3.4.2 Analyse der klassischen und atypischen Memory-B-Zellen nach geographischen und individuellen Subpopulationen

Analog zur Analyse der Serum-IgG- bzw. -IgM-Reaktivitäten gegen GMZ2 nach Subpopulationen wurde mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen der naiven BC und der klassischen und atypischen MBC, jeweils gegen GMZ2, vorgegangen.

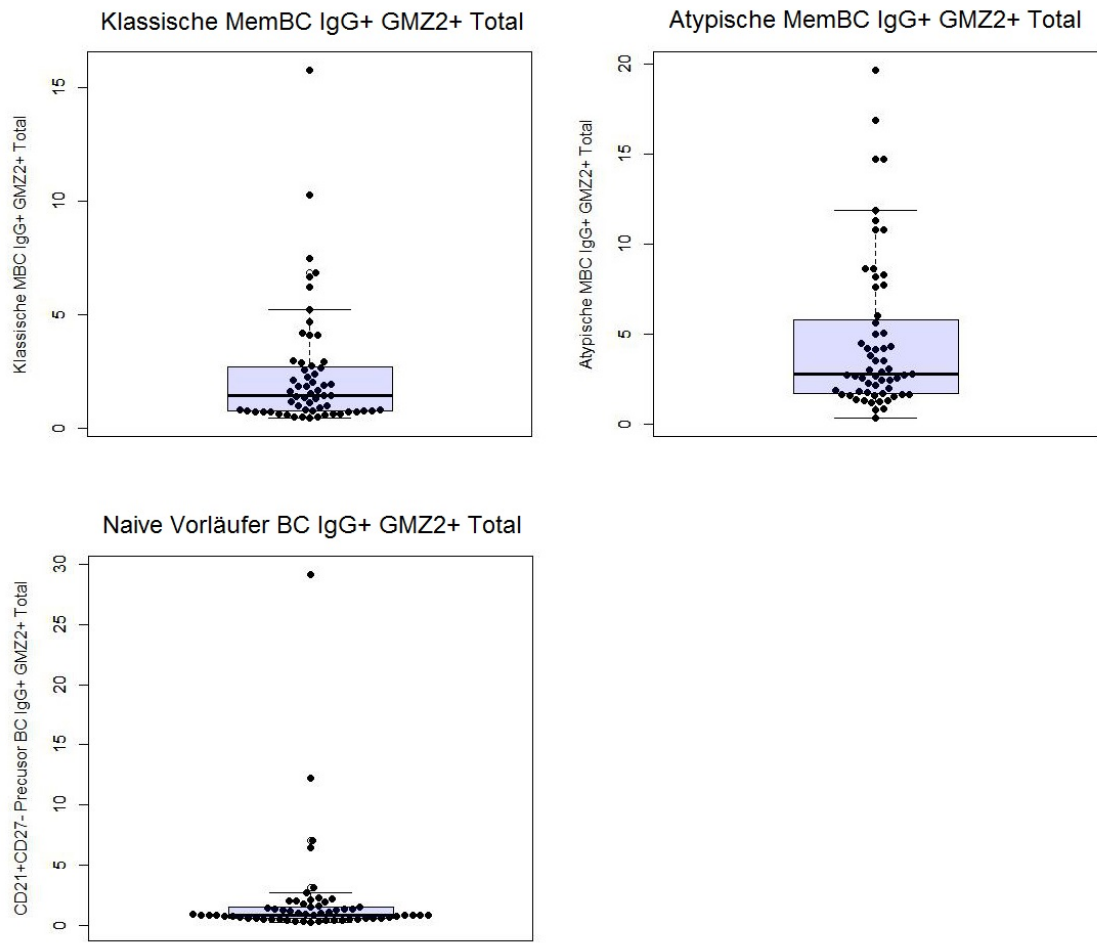


Abb. 3.14: Klassische und atypische IgG^+ $GMZ2^+$ MBC und IgG^+ $GMZ2^+$ naive Vorläufer BC im Boxplot.

Tabelle 3.11: Deskriptive Analyse im FACS-gating isolierten Lymphozyten und B-Zellen (BC = B-Zellen, SD = Standardabweichung).

Zelltypen	Lymphozyten in %	BC (CD19 ⁺) in %
<i>Pf</i> -naiv	98,3	9,83
Minimum	96,6	2,3
1. Quartile	98,5	9,3
Median	99,1	11,3
Mittelwert	98,8	11,9
3. Quartile	99,3	14,7
Maximum	99,8	20,2
SD	0,8	0,6
Varianz	3,8	14,7

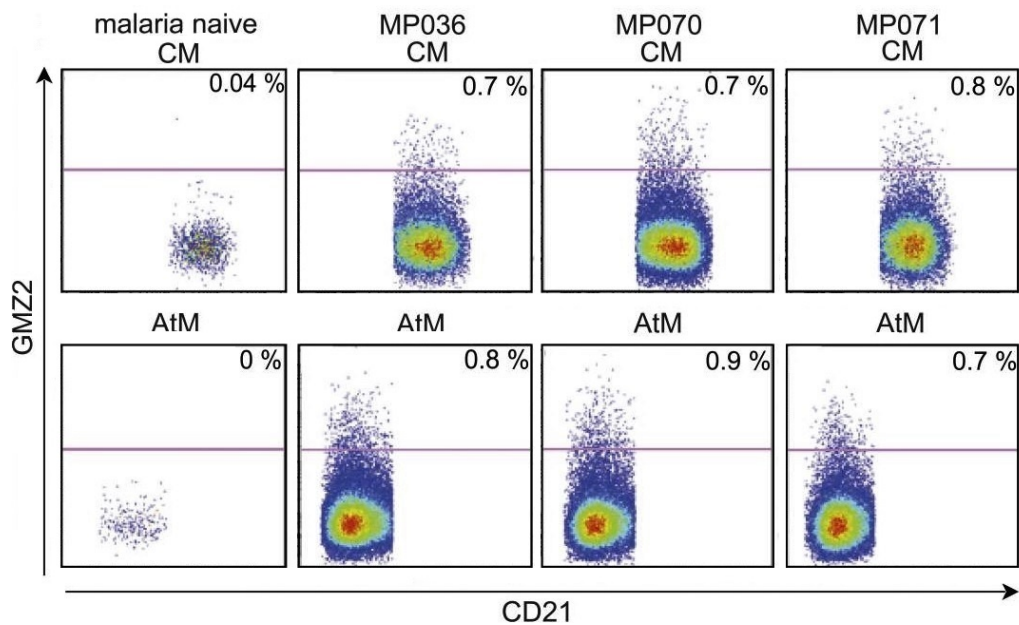


Abb. 3.15: GMZ2-reaktive klassische und atypische Memory-B-Zellen der Probanden MP036, MP070 und MP071 im Vergleich zu einer *Pf*-naiven Referenzprobe im Dotplot (AtM = atypische MemBC, CM = Klassische MemBC).[124]

Tabelle 3.12: Deskriptive Analyse der durchflusszytometrischen ermittelten IgG⁺ B-Zell-Populationen – Deskriptive Analyse der im FACS-gating isolierten IgG⁺ B-Zellen nach naiven und reifen B-Zellen, klassischen und atypischen MBC. CM, AtM und naive BC jeweils in % von reifen BC (CM = klassische MemBC, AtM = atypische MemBC, BC = B-zellen, SD = Standardabweichung).

Zelltypen	Reife BC (CD19 ⁺) in %	CM (CD21 ⁺ CD27 ⁺) in %	AtM (CD21 ⁻ CD27 ⁻) in %	Naive BC (CD21 ⁺ CD27 ⁻) in %
IgG⁺ total				
<i>Pf-naiv</i>	10,1	47,3	12,9	38,6
Minimum	7,80	1,96	13,60	5,87
1. Quartile	18,88	22,88	27,48	15,75
Median	23,55	33,55	37,40	19,40
Mittelwert	25,58	33,75	39,16	22,44
3. Quartile	31,80	42,62	50,65	24,82
Maximum	50,60	62,30	64,80	69,80
SD	9,87	13,88	14,50	12,36
Varianz	97,33	192,61	210,32	152,84
IgG⁺ GMZ2⁺				
<i>Pf-naiv</i>	*	0	0	0
Minimum	*	0,460	0,410	0,200
1. Quartile	*	0,768	0,730	0,565
Median	*	1,445	1,190	0,830
Mittelwert	*	2,360	2,655	1,870
3. Quartile	*	2,688	2,047	1,462
Maximum	*	15,800	42,100	29,200
SD	*	2,688	5,948	4,043
Varianz	*	7,235	35,381	16,344

Tabelle 3.13: Deskriptive Analyse der durchflusszytometrischen ermittelten IgG^- B-Zell-Populationen – Deskriptive Analyse der im FACS-gating isolierten IgG^- B-Zellen nach naiven und reifen B-Zellen, klassischen und atypischen MBC. CM, AtM und naive BC jeweils in % von reifen BC (CM = klassische MemBC, AtM = atypische MemBC, BC = B-zellen, SD = Standardabweichung).

Zelltypen	Reife BC (CD19 ⁺) in %	CM (CD21 ⁺ CD27 ⁺) in %	AtM (CD21 ⁻ CD27 ⁻) in %	Naive BC (CD21 ⁺ CD27 ⁻) in %
IgG^- total				
<i>Pf-naiv</i>	86,9	20,7	2,55	75,8
Minimum	46,30	1,25	1,470	34,20
1. Quartile	66,08	10,68	4,115	64,62
Median	74,75	14,20	6,475	73,60
Mittelwert	72,53	15,74	9,324	71,21
3. Quartile	79,22	19,25	11,525	79,60
Maximum	91,30	42,10	42,800	93,50
SD	10,125	8,086	8,525	12,659
Varianz	102,519	65,385	72,675	160,253
IgG^- GMZ2⁺				
<i>Pf-naiv</i>	*	0,22	0,22	0,022
Minimum	*	0,450	0,340	0,1800
1. Quartile	*	0,660	0,665	0,3200
Median	*	1,095	0,965	0,4400
Mittelwert	*	1,504	1,758	0,8438
3. Quartile	*	1,587	1,450	0,7125
Maximum	*	9,480	35,800	17,8000
SD	*	1,484	4,586	2,254
Varianz	*	2,203	21,035	5,082

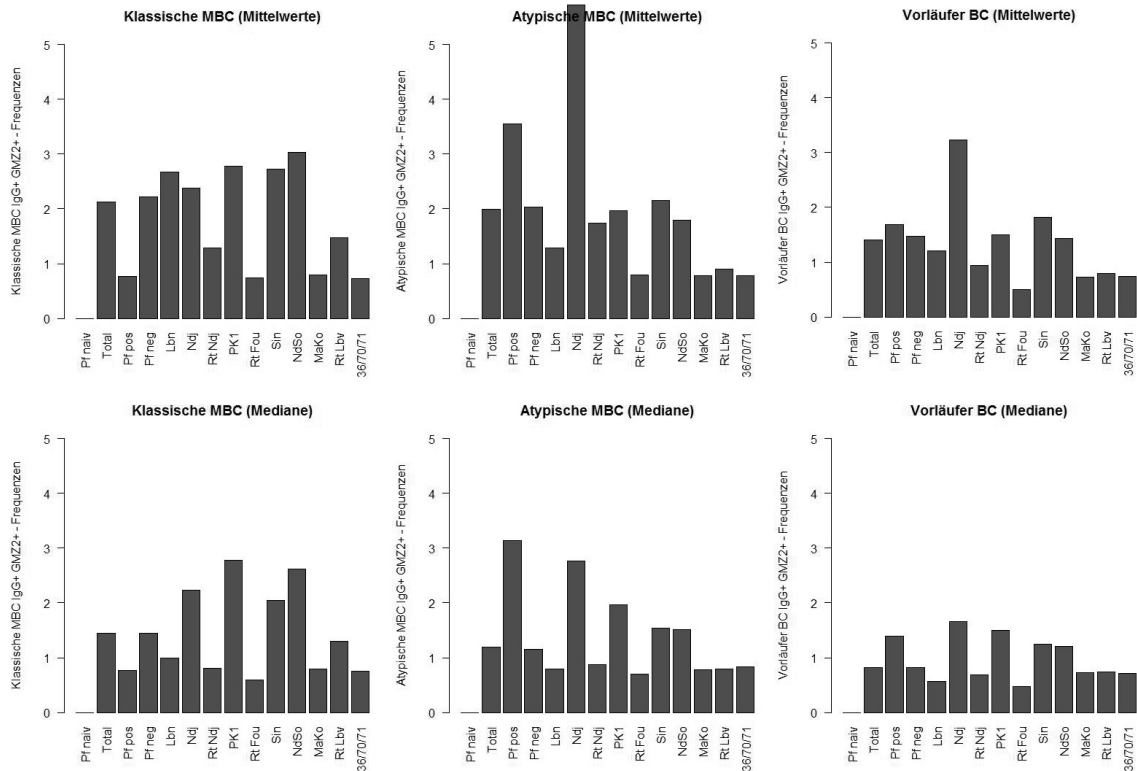


Abb. 3.16: B-Zellpopulationen gegen GMZ2 nach Subpopulationen, um MP041 bereinigt – Peripher zirkulierende Vorläufer BC, klassische und atypische MBC gegen GMZ2 nach Subpopulationen (MBC = MemBC, Pf-naiv = naive Kontrollprobe, Total = gesamte Studienpopulation exkl. MP041, Lbn = Lambaréné, Ndj = Ndjolé, Rt Ndj = Rt. Ndjolé, PK1 = MP065 & MP066, Rt Fou = Route Fougamou, Sin = Sindara, NdSo = Ndougou & Song exkl. MP041, MaKo = Mamiengué & Kouagna, Rt Lbv = Rt. Libreville, 36/70/71 = MP036, MP070 & MP071).

In Abbildung 3.16 werden die genannten B-Zellpopulationen nach Subpopulationen im Histogramm dargestellt. Die relativ betrachtet sehr hohen und möglicherweise einem Messfehler zugrunde liegenden B-Zellwerte des Probanden MP041 aus Ndougou (s. Abb. 3.16) verzerren die Darstellung im Histogramm und erschweren einen Vergleich nach Regionen. Daher wurden die Mittelwerte bzw. Mediane der Gesamtpopulation und der Subpopulation “Ndougou & Song” in der Darstellung im Histogramm um den Probanden MP041 bereinigt.

Insgesamt zeigte sich eine hohe Anzahl an zirkulierenden atypischen MBC, vor allem in der Gruppe der Pf-positiven Probanden und in der Subpopulation um Ndjolé.

4 Diskussion

4.1 Studienpopulation

Gabun bot aufgrund seiner ganzjährig stabilen endemischen *Pf*-Transmission einen idealen Studienstandort. Das MRU Lambaréné bietet zudem einen breiten Mitarbeiterstamm mit langjähriger Forschungserfahrung zu malariaspezifischen Fragestellungen.[39, 131, 154, 180, 210, 214]

Gesundheitsdefinition

Ziel der Studie war, die natürlich erworbene Semi-Immunität lebenslang malariaexponierter gesunder Erwachsener gegen *Plasmodium falciparum* zu charakterisieren. Doch was bzw. wer ist überhaupt gesund und welche Definition wird dafür herangezogen? Ist ein Individuum, das eine niedrige Parasitämie aufweist, jedoch frei von klinischen Infektionszeichen ist, gesund? Sind fast die Hälfte aller Probanden der Studie bzw. fast dreiviertel der eingeschlossenen Frauen krank, weil sie einen Hämoglobingehalt im anämischen Bereich aufwiesen?

Der Gesundheitsbegriff ist heterogen, multifaktoriell und unterliegt einem stetigen Wandel. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) prägte die Definition von Gesundheit in ihrer Verfassung von 1948 als "Zustand völligen psychischen, physischen und sozialen Wohlbefindens und nicht nur das Freisein von Krankheit und Gebrechen".[202] Dies galt als bahnbrechende Abkehr von zuvor dominierenden biomedizinischen Perspektiven, die Gesundheit als ein rein physisches Funktionsstadium in Abwesenheit von Krankheit betrachteten, wurde jedoch auch für Absolutheit, Unschärfe und mangelnde Überprüfbarkeit kritisiert.[173]

Weitergehende Gesundheitsdefinitionen tauchten später in regionalen Berichten der WHO auf. 1984 definierte das Regionale Europäische Büro der WHO Gesundheit beispielweise nicht mehr statisch, sondern in einer dynamischen Betrachtungsweise eines Resilienzfaktors. Gesundheit sei das "Ausmaß, in dem ein Individuum oder eine Gruppe fähig ist, eigene Ziele zu erreichen und Bedürfnisse zu befriedigen und Umwelteinflüsse entsprechend zu verändern oder zu bewältigen. Gesundheit ist eine Alltagsressource, kein Lebensziel; es handelt sich um ein positives Konzept, das soziale und persönliche Ressourcen genauso hervorhebt wie die physische Leistungsfähigkeit." [213] Für die zentrale Ottawa-Charta zur Gesundheitsförderung

der WHO von 1986 wurde dennoch die weiterhin offiziell verwendete o. g. Definition von 1948 herangezogen.[203]

Viele Autoren aus dem medizinischen sowie geisteswissenschaftlichen Bereich schreiben, es sei an der Zeit, den seit über 60 Jahren zentral verwendeten Gesundheitsbegriff von 1948 zu adaptieren, da eine Definition als Status des "völligen Wohlbefindens" unter anderem kaum und erst recht nicht durchgehend erreicht werden könne, und auch einer Entwicklung mittlerweile unter "normalen" Umständen mit chronischen Erkrankungen zu altern kaum gerecht werden könne. Der Definition entsprechend müssten im Umkehrschluss die meisten Menschen über weite Lebensspannen als "krank" bezeichnet werden. Zudem wäre ein solcher Gesundheitsstatus kaum messbar.[24, 79, 85] Jules Romain beschrieb diesen Kritikpunkt schon in seinem Theaterstück von 1923 "Knock ou le Triomphe de la médecine": "Gesunde Menschen sind nur Kranke, die von ihrem wahren Zustand nichts wissen."[158]

Die Wahl der Definitionen von Gesundheit und Krankheit sind nicht nur rein ethischer Natur. Sie haben praktische Auswirkungen auf die Gesundheitsversorgung bzw. beeinflussen die Entscheidungen, "was, wer und wie" behandelt und wie das Gesundheitssystem ausgerichtet werden sollte.[195] In einem offenen Brief an die WHO kritisierten 2017 Vertreter von Ureinwohnern, Anthropologen und Ärzten diverser Bevölkerungsgruppen weltweit (Amazonien, Patagonien, Papua Neu-Guinea, Inuit, Nordamerika, Indien, Subsaharisches Afrika, China, Melanesien, Polynesien) die offizielle Gesundheitsdefinition der WHO. Sie sei veraltet, sei unter anderem "utopischer" und kaum "pragmatischer" Natur und für weite Teile der Weltbevölkerung untauglich. Sie identifizierten und beschrieben dabei verschiedene Schlüsselkonzepte, die in eine Neudefinition von Gesundheit bei der WHO einfließen sollten, dazu zählten sie das "humane Gleichgewicht mit der Natur" sowie Spiritualität und Anpassungsfähigkeit.[29]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Sicht auf Gesundheit durch ein komplexes, dynamisches Zusammenspiel aus körperlichen, psychischen, sozialen Faktoren ist und auch von kulturellen, ökologischen, ökonomischen und politischen Faktoren beeinflusst wird.

Wir verwendeten in unserer Studie einen erweiterten Gesundheitsbegriff. Wir begriffen in unserer Studie "gesunde Erwachsene" entsprechend als Individuen, die sich subjektiv als gesund betrachteten, in der Lage waren, in ihrer Umwelt zu bestehen und sich ihr entsprechend anzupassen bzw. vermochten, auf diese Einfluss zu nehmen und sich weitgehend selbst zu regulieren. Dies beinhaltet, dass in den Messungen erhobene Werte (z. B: Anämien, Parasitämien) anhand von der WHO deklarierten Grenzwerte als "pathologisch" eingeordnet werden können, jedoch die einzelnen

Probanden nicht notwendigerweise als krank einzuordnen sind. Unsere diagnostischen Methoden wurden auf die Studienhypothese ausgerichtet. Viele Infektionen, die beispielsweise auch Anämien verursachen könnten, wurden nicht untersucht.

Zusammensetzung der Studienpopulation

Die Geschlechterverteilung war in der Studienpopulation relativ ausgeglichen, es nahmen etwas mehr männliche, als weibliche Probanden teil. In der Literatur sind diesbezüglich kaum Informationen über geschlechtsspezifische Aspekte der menschlichen *Pf*-Immunantwort zu finden. Der Bericht *Gender, Health and Malaria* von der WHO (2007) geht auf ein erhöhtes Erkrankungsrisiko schwangerer Frauen aufgrund einer herabgesetzten Immunabwehr, das auf die Infektion der Plazenta spezialisierten *Plasmodium falciparum*-Erythrozytenmembranprotein 1 (PfEMP1) und Verhaltens-, sowie sozioökonomische Faktoren ein, die auf eine höhere *Pf*-Exposition und ein erhöhtes Erkrankungsrisiko schließen lassen. Andere Untersuchungen zeigten jedoch, dass auch Männer in ländlichen Regionen aufgrund des Arbeitsverhaltens einer höheren *Pf*-Exposition ausgesetzt sein können.[204]

Das Alter der Probanden deckte ein breites Spektrum (19-51 Jahre) ab, wobei die Altersgruppe der 20 bis 40jährigen dominierte. Da die Studie den *Pf*-Immunstatus von Probanden mit reifen und noch funktionalen Immunsystem darstellen sollte, ist die Überrepräsentation dieser Altersgruppe von Vorteil.[91]

Der angegebene Wohnort der Probanden bildete nicht in jedem Fall dessen Lebensumfeld ab. So lebte beispielsweise der 23-jährige Proband MP020 zwar in Lambaréné in unmittelbarer Umgebung des Albert-Schweitzer-Hospitals, verbrachte aber seit Jahren den Großteil seiner Zeit beim Fischfang in weit entlegenen Seegebieten mitten im Regenwald.

Die anamnestisch erhobenen Angaben zu Malariapräventionsmaßnahmen waren nicht vergleichbar. Die diesbezüglich in der *Case Report Form* erhobenen Daten wurden in der Befragung nicht spezifiziert bzw. erläutert, die Ergebnisse sind entsprechend nur limitiert aussagekräftig. Viele Studien konnten einen eindeutigen präventiven Effekt von Innenraumsektiziden und ITN ausmachen.[62, 211] Ergebnisse randomisierter Studien aus Endemiegebieten mit stabiler Transmission zur Nutzung dieser Malariapräventionsmaßnahmen sind jedoch limitiert.[150] Auch die Angaben zu Fieber in den letzten 48 Stunden waren wenig valide, da sie auf rein anamnestischen Angaben beruhten. Aus der langjährigen klinischen Erfahrungen in Gabun lässt sich annehmen, dass die Angabe von Fieber auch bei Fieberfreiheit teilweise analog als Ausdruck eines breiten Spektrums physischer oder auch psychischer Beschwerden genutzt wird. Studien zeigten, dass anamnestische Angaben zum klinischen Mala-

riaverlauf zum Teil wenig akkurat und die entsprechenden Symptome hochgradig unspezifisch sind.[129, 132]

4.2 Blutbildparameter, *Pf*-Infektionsstatus und anamnestisch erhobene Malariasymptome

Die lichtmikroskopische Untersuchung des Dicken Tropfen als quantitativer Nachweis eines *Pf*-Infektionsstatus, ist Goldstandard in endemischen Regionen. Der Vorteil des Verfahrens liegt in der Detektierbarkeit nahezu aller klinisch relevanten Parasitämien.[94, 148] Nachteile dieser Methode sind jedoch unter anderem ihre relativ geringe Sensitivität bei sehr niedrigen Parasitenraten semi-immuner Individuen, die von epidemiologischen Interesse sind.[141, 136] Um eine exakte Erfassung des *Pf*-Infektionsstatus unseres Probandenkollektivs zu ermöglichen, wäre der Einsatz molekularbiologischer Detektionsmethoden interessant gewesen. *Polymerase chain reaction* (PCR) basierte Verfahren verfügen über die höchsten Spezifität und Sensitivität unter den *Pf*-Detektionsmethoden und sind besonders bei niedrigen Parasitenraten ($\leq 0,0001$ % *Pf*-infizierte Erythrozyten) asymptomatischer Träger, wie sie in unserer semi-immunen Studienpopulation zu erwarten waren, im Vorteil.[119] Studien konnten zeigen, dass zum Teil zwei Drittel mikroskopisch negativer Proben in der PCR positiv getestet werden konnten.[96] Da während der Durchführung der Studie die PCR-basierte Methode in Lambaréné nicht zur Verfügung stand, musste jedoch auf diese Methode vor Ort verzichtet werden.[39, 96]

Die nicht durchgehende Anwendung des *Pf*-Schnelltest birgt einen limitierenden Faktor in der einheitlichen Erhebung des *Pf*-Infektionsstatus. Der verwendete *Pf*-Schnelltest basiert auf der Detektion des wasserlöslichen *Pf*-Proteins HRP-2, dem am häufigsten verwendeten *Pf*-Schnelltestverfahren. HRP-2 wird während der asexuellen Reifestadien auf *Pf*-infizierten Erythrozyten exprimiert.[17, 178] Seine Sensitivität fällt von sehr hohen Werten bei hohen Parasitämien auf niedrige Werte (< 70 %) bei Parasitämien unter $50/\mu\text{l}$ ab. Zudem ermöglicht er keine Quantifizierung der Parasitämie.[81, 164, 194, 1] Die gemessene Halbwertszeit des HRP-2 wurde *in vitro* bei bis zu ca. sieben Tagen angegeben.[46] Falsch-positive Reaktionen sind unter anderem aufgrund einer Antigenpersistenz von bis zu 28 Tagen nach erfolgreicher Antimalariatherapie mit Beseitigung asexueller Parasiten im peripheren Blut möglich.[81, 164, 194, 1] Falsch-positive Ergebnisse kommen ebenfalls bei Rheumafaktor-positiven Probanden ohne *Pf*-Infektion vor.[83] Die niedrige Sensitivität bei niedrigen Parasitämien, wie sie in unserer Studie bei asymptomatischen

Erwachsenen zu erwarten waren, erklärt falsch-negative Ergebnisse im Schnelltest und auch die fehlende Konkordanz zu den Ergebnissen im Dicken Tropfen. Die gemessenen falsch-positiven Werte können anhand der Antigenpersistenz nach Infektion und möglichen nicht erhobenen Begleitfaktoren (z. B. Rheumafaktoren) erklärt werden.

Das Ergebnis einer *Pf*-Infektionsrate asexueller Stadien von 8,3 % deckt sich mit anderen Untersuchungen im Studiengebiet. Adegnika *et al.* publizierten 2006 eine Untersuchung von 145 Schwangeren in Lambaréné. Darin waren im peripheren Blut in der mikroskopischen Lambaréné-Methode 13 Frauen *Pf*-positiv (9,0 %). In der *real-time PCR* waren 43 Frauen (30 %) *Pf*-positiv. Insgesamt 30 (23 %) Frauen wiesen dementsprechend submikroskopische *Pf*-Infektionen auf.[2] Es zeigt die Diskrepanz zwischen mikroskopischen und submikroskopischer *Pf*-Prävalenz.[141, 96, 119, 136] Unser Probandenkollektiv ist jedoch nicht unmittelbar mit dem Kollektiv der genannten Studie vergleichbar. Die ermittelten *Pf*-Infektionen unserer Studienteilnehmer lagen im Bereich von 11 bis 690 Parasiten pro μl , also durchweg im bei Bereich niedriger Parasitämieraten, und entsprachen in allen Fällen asymptomatischen Infektionen.[205]. Es ließ sich in der Studienstichprobe kein direkter Zusammenhang zwischen einer *Pf*-Infektion und Fieber in den letzten 48 Stunden nachweisen. Dies könnte auf subklinisch Verläufe asymptomatischer semi-immuner Träger deuten, oder schlichtweg auf eine nicht ausreichend valide anamnestiche Fiebererhebung.

Die Rate an Anämien in der Studienpopulation war im Vergleich mit den WHO-Referenzwerten mit fast 50 % sehr hoch.[208] Sie lagen höher, als die ohnehin im weltweiten Vergleich höchsten Anämieprävalenzraten für den afrikanischen Raum, die in einer großen WHO Metanalyse im Jahr 2011 mit einer Rate von 37% aller nicht-schwangerer Frauen angegeben wurde.[207]

Eine kleine Einschränkung in der Bewertung der Hb-Ergebnisse könnten in von westlichen Referenzwerten divergierenden hämatologischen Normwerten der lokalen Bevölkerung liegen. In einer relativ kleinen Stichprobe wurden beispielsweise bei gesunden Kindern in Lambaréné im Mittel niedrigere Hb-Werte, als im europäischen Vergleich gemessen. Ursächlich könnte dafür jedoch eine höhere Rate an subklinischen chronischen *Pf*-Infektionen sein.[82]

In der Studienstichprobe konnte kein Zusammenhang zwischen Fieber und Anämie festgestellt werden. Dies kann an fehlerhaften Fieberangaben, nicht messbaren submikroskopischen *Pf*-Infektionen oder einer zu kleinen Fallzahl ($n = 6$) an *Pf*-positiven Individuen liegen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die genannten Pro-

banden zwar eine *Pf*-Infektion aufwiesen, jedoch nicht an Malaria erkrankt waren, sprich klinisch gesund waren. Zudem wurden viele für Anämien ursächliche Faktoren, wie Ernährungsdefizite (z. B. Eisen-, Folsäure, Vitamin B2-, Vitamin B12- oder Vitamin A-Mangel), akute und chronischen Infektionen (z. B. Krebserkrankungen, Tuberkulose), anderweitigen parasitäre Infektionen, angeborenen Störungen der Hämoglobinsynthese und der Erthrozytenentwicklung (z. B. Sichelzellanämien, Thalasämien) oder auch mögliche Frühschwangerschaften bei weiblichen Probanden nicht erhoben. Auch der Raucherstatus, der erhöhte Hämoglobinkonzentrationen zur Folge haben kann, wurde nicht erhoben.[207]

Auffällig waren deutlich erhöhte eosinophile Granulozytenkonzentrationen. Sie sind insofern interessant, da sie bei niedrigem hygienischen Standard und hoher Exposition gegenüber humanparasitären Helminthen meist erhöht sind.[155] Man könnte annehmen, dass in Dörfern mit niedrigem hygienischen Standard und konsekutiv erhöhten Blutspiegeln eosinophiler Granulozyten auch eine erhöhte Malariaexposition vorherrscht, da womöglich weniger auf präventive Gesundheitsvorsorgemaßnahmen geachtet wird. Es war bei den eosinophilen Granulozytenkonzentrationen möglich, eine Regression mit der IgG-GMZ2-Reaktivität im Serum als spezifische Immunantwort auf *Pf*-Infektionen darzustellen (s. Abb. 3.5 D-E). Dies unterstützt die oben aufgeführte Hypothese, dass eine mangelnde Hygiene mit einer höheren Malariaexposition und einer folglich stärkeren spezifischen Immunantwort einhergehen könnte.

4.3 GMZ2-reaktive IgG und IgM

Anti-Oberflächen-Ag-IgG korrelierten insbesondere in Studien in Ghana, Kenia, Gabun und Tansania positiv mit protektiver klinischer *Pf*-Immunität.[43, 93, 220, 106] Eine Studie von *Mamo et al.* zeigte in Äthiopien, einem *Pf*-Endemiegebiet, ebenfalls signifikant höhere IgG-Prävalenzen für GMZ2, als jeweils für die zwei Komponenten GLURP und MSP3, was laut der Autoren auf eine erhöhte Antigenizität von GMZ2 schließen lasse.[107]

Die IgG- und auch IgM-GMZ2-Reaktivität der Studienpopulation war signifikant höher, als die der naiven Kontrolle. Die IgG-GMZ2-Reaktivität der *Pf*-positiv getesteten Individuen lagen alle über dem Mittel des Studienkollektivs. Der Vergleich der *Pf*-positiven mit der *Pf*-negativen Gruppe ergab keine signifikanten Unterschiede, wobei auch hier limitierend eine rein mikroskopisch und auf Schnelltests basiertes Screeningverfahren erwähnt werden muss.

Es gab vor Studienbeginn 2010 kaum Vergleichswerte zu IgM gegen GMZ2 in der Literatur, was für uns den Hauptgrund darstellte auch IgM-GMZ2-Reaktivitäten zu untersuchen. IgM scheint eine weniger bedeutsame bzw. spezifische Rolle in der protektiven *Pf*-Immunabwehr zu spielen und sogar teilweise wesentliche Virulenzfaktoren zu Ungunsten des Wirtes zu beeinflussen: Die Bindung von unspezifischem IgM an das Oberflächenantigen PfEMP1 *Pf*-infizierter Erythrozyten begünstigt die erythrozytäre Rosettenbildung und scheint auch bei der planzentären Sequestration eine Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass PfEMP1 als spezifisches Fc-Bindungsprotein durch Ähnlichkeiten zu bakteriellen Fc-Bindungsproteinen polymeren IgM dient. Die gebundenen IgM würden protektive IgG-Epitope auf infizierten, PfEMP1-präsentierenden Erythrozyten verdecken.[10, 88, 68, 170] Die Autoren einer Studie nahmen hingegen an, dass die Rolle von IgM in der Malariaabwehr unterschätzt würde, da höhere IgM-Konzentrationen bei einer genetisch *Pf*-resistenteren Ethnie in Mali überrepräsentiert waren.[6] Die Stichprobe der genannten Studie war jedoch sehr klein ($n = 24$), darüber hinaus gibt sie keinen Hinweis auf Kausalität. Pleass et al. (2015) stellten in ihrem umfassenden *Review* die Bedeutung von IgM-Antikörpern in den Fokus. So sei IgM in seiner Effektorfunktion überlegen, ein Molekül könne ein *Pf*-infizierten Erythrozyten eliminieren, im Vergleich seien dafür ca. 1.000 IgG nötig. Jedoch scheint IgM im Vergleich zu seiner allgemein zentralen Rolle in der Abwehr von Pathogenen bei der *Pf*-Abwehr eine ungewöhnlich geringe Funktion gegenüber *Pf*-Blutstadien auszuüben, was eventuell auf *Pf*-Adaptationsmechanismen zurückzuführen sei. Neuere Evidenz deute jedoch auf eine unerwartet wichtige Funktion in der prä-erythrozytären Sporozoitenabwehr hin.[149] In der Literatur sind kaum Daten zu IgM gegen MSP3, GLURP bzw. GMZ2 zu finden.

Die in der Studie gemessenen IgG- und IgM-GMZ2-Konzentrationen korrelierten nicht im Mittel, jedoch innerhalb der Verdünnungsreihen miteinander. Im Vergleich zur IgG-GMZ2-Reaktivität war der Unterschied zur *Pf*-naiven Kontrolle geringer bei höherer Streubreite der Ergebnisse. Die nachweisbaren IgG- bzw. IgM-Konzentrationen gegen GMZ2 der naiven Kontrolle sind dadurch zu erklären, dass durch das Assay bedingte Kreuzreaktionen möglich sind, die bei IgM aufgrund in der Regel weniger affinen Antikörperbindungen bei IgM verstärkt vorkommen können. Zudem zirkulieren auch bei Malaria-naiven Individuen naive B-Zellen, die eine gewisse Spezifität für GMZ2 aufweisen können.[91] Da der ELISA ein relativ statisches Verfahren ist, können auch unspezifische Ig-Bindungen eine Farbreaktion auslösen. Die Reaktivität der naiven Kontrolle lässt entsprechend nicht auf qualitative Effektorfunktionen schließen.

Man muss insgesamt limitierend bedenken, dass die mittels ELISA erhobenen Ig-Konzentrationen rein quantitative Ergebnisse produzieren. Detaillierte Bindungseigenschaften und Effektorfunktionen können mit dieser Methode nicht untersucht werden.

4.4 GMZ2-reaktive B-Zellen und Memory-B-Zellen

Es existieren widersprüchliche Studienergebnisse über die Rolle von MBC und langlebigen Plasmazellen hinsichtlich der Persistenz der natürlich erworbenen *Pf*-Immunität.[51] Migot et al. (1993) beobachteten in Madagaskar MBC gegen *P. falciparum* nach acht Jahren ohne Reexposition.[97] Eine andere Studie gab Hinweise darauf, dass MBC gegen *P. falciparum* in Kindern entweder kaum gebildet werden oder kurzlebig sind bzw. auch bei initial guter *Pf*-Immunität keine ausreichende IgG-Antwort bei Reinfektion *geboostet* werden kann.[48, 50] Spätere Studien weisen in Tiermodellen und in Menschen endemischer Regionen *Pf*-spezifische MBC und langlebige Plasmazellen nach.[128, 146] Eine Studie untersuchte *Pf*-spezifische MBC über ein Jahr und zeigte, dass die Nummer an MBC nach einer akuten Malairainfektion anstieg und nach sechs Monaten reduzierter *Pf*-Exposition bis zu einem zum Ausgangswert leicht erhöhten Anzahl abnahm.[199]

Man geht mittlerweile davon aus, dass die Entwicklung von *Pf*-spezifischen MBC mit der kumulativen Exposition korreliert, nicht aber zwangsläufig mit dem Alter.[38, 199] Die große *Pf*-Antigenvariation könnte für B-Zellen hinderlich sein, spezifische MBC zu entwickeln. In chronischen *Pf*-Infektionen konnten eine erhöhte Anzahl zirkulierender atypischer MBC festgestellt werden, ohne dies als vorteilhaft oder nachteilhaft bewerten zu können.[201] Es war vor der Studie noch nicht geklärt, ob atypische MBC protektive Serum-Ig *in vivo* produzieren. Auch blieb unklar, ob eine Antigenpersistenz für die Erhaltung einer protektiven *Pf*-Immunität obligat wäre.

Die PBMC-Isolate aller Studienteilnehmer zeigten hohe Raten an zirkulierenden klassischen und atypischen IgG⁺ MBC gegen GMZ2. Bei den *Pf*-positiven Individuen waren die atypischen MBC relativ erhöht, wobei es sich dabei um eine zu kleine Fallzahl handelt, um daraus Rückschlüsse zu ziehen. Die Tatsache, dass alle Individuen über erhöhte Serum-IgG-Titer gegen GMZ2 (s. 3.3.1) mit einer deutlichen Reaktivität klassischer und atypischer MBC gegen GMZ2 verfügten, zeigt, dass die gesamte Studienpopulation über repräsentative anti-*Pf*-Serum-IgG und entsprechende MBC-Antworten verfügte.

Die MBC der in Abschnitt 3.4.1 herausgestellten Individuen MP036, MP070 und

MP071 zeigten bei weiterführenden Analysen eine hohe *Pf*-neutralisierenden IgG-Aktivität (s. Abb. 4.1). Die letztendlich für einen Heilungsprozess entscheidende *Pf*-Neutralisation hängt dementsprechend nicht allein von der Quantität entsprechender Antikörper gegen GMZ2 ab, sondern auch von deren Ig-Bindungseigenschaften. Es zeigt sich, dass zum Studienzeitpunkt die Probanden MP071 und MP036 über sehr effektive IgG gegen *Pf* verfügten.[124]

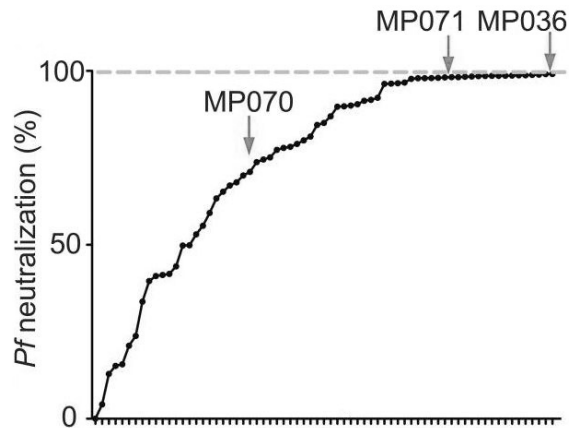


Abb. 4.1: *Pf*-Neutralisation der Serum-IgG der Studienpopulation im Vergleich zu einer Chloroquine-Lösung Relative neutralisierende 3D7^{luc} Aktivität von 100 µg/ml gereinigten Serum-IgG von Studienteilnehmern im Vergleich zu einem polyklonalen IgG-Serum-Lösung einer *Pf*-naiven Referenzprobe (0 % Neutralisation) und 50 mMio IE Chloroquine (100 % Neutralisation). Die Punkte repräsentieren die Proben der Studienpopulation (gestrichelte graue Linie = Chloroquinelösung). MP036, MP070 und MP071 sind markiert.[124]

In der *Pf*-naiven Kontrollprobe konnten zum Vergleich keine IgG⁺GMZ2⁺ MBC und deutlich weniger IgG⁻GMZ2⁺ MBC detektiert werden. Schon die große Varianz der IgM-GMZ2-Reaktivität (s. 4.3) deutet auf eine unspezifischere Effektorfunktion bei unausgereifteren Antigenbindungsstellen der IgM hin. Wie in Abschnitt 1.3.6 dargestellt, scheinen post-GC-CD27⁺IgM⁺ MBC früh und relativ unspezifisch zu reagieren und eine sekundäre Keimzentrumsreaktion mit Ig-Klassenreifung zu triggern.[18, 114]

Ohne *Pf*-Antigenkontakt konnte sich bei unserer naiven Probe kein spezifischeres IgG-Memory entwickeln. Die zirkulierenden naiven Vorläufer-B-Zellen zeigten, wie zu erwarten, eine insgesamt sehr niedrige Reaktivität (s. Abb. 3.14).

Es sticht eine relativ zu den klassischen MBC erhöhte Frequenz an zirkulierenden atypischen MBC gegen GMZ2 hervor. Im Vergleich der beiden MBC-Kompartimente der *Pf*-positiven Gruppe sind die klassischen MBC im Vergleich mit den atypischen MBC unterrepräsentiert, was auf die *Pf*-inhibitorische Effektorfunktion der atypi-

schen MBC hinweisen könnte. Auch fällt die überproportional hohe Anzahl atypischer MBC der Population aus Ndjolé auf, wobei hier auch die Vorläufer B-Zellen insgesamt erhöht sind.

Vor unserer Studie wurde von Weiss et al. (2009, 2010, 2011) dargelegt, dass eine *Pf*-Infektion mit der Häufungen zirkulierender atypischer (FcRL4⁺) MBC assoziiert ist.[201, 199, 200] Anhand einer Studie von Moir et al. (2008), die Zeichen funktionaler Erschöpfung und Hyporesponsivität atypischer MBC bei chronischen HIV-Infektionen nachgewiesen hatte, war die Hypothese aufgestellt worden, ihre Funktionalität könne gestört sein.[118]

Muellenbeck et al. (2013) zeigten in den Folgeuntersuchungen dieser Studie, die mit den PBMC-Isolaten der erweiterten Blutproben der oben genannten sieben Probanden durchgeführt wurden, folgendes: isolierte atypische GMZ2-spezifische MBC zeigten durchschnittlich höhere Raten an somatischen Hypermutationen im V-Gensegment, als klassische MBC. Um die Antigenreaktivität klassischer und atypischer MBC zu untersuchen, wurden rekombinante monoklonale Antikörper beider MBC-Kompartimente hergestellt. Beide wiesen GMZ2-non-polyreaktive und polyreaktive Antikörper auf, das atypische MBC-Kompartiment wies höhere Raten an polyreaktiven Antikörpern auf. Es konnte somit gezeigt werden, dass beide untersuchten MBC-Kompartimente *Pf*-inhibierende IgG-Antikörper in einem Kulturmedium kodieren. Es steht aus festzustellen, ob atypische MBC eine vollständige Memory-Funktion aufweisen oder schlichtweg kurzlebige Ig-sezernierende B-Zellsubpopulation darstellen.[124]

Eine Studie von Zinoecker et al. (2015) in Mali zeigte jedoch, dass die jeweiligen IgG-V-Genrepertoires auffällige Ähnlichkeiten aufwiesen, sodass von einem hohen Verwandtschaftsgrad zwischen atypischen und klassischen MBC ausgegangen wurde.[221] Portugal et al. (2015) beschrieben anhand jüngerer Daten, dass die B-Zellrezeptoren *Pf*-assoziierter atypischer MBC über reduzierte Signal- und Effektorfunktion verfügen und *in vitro* nicht in aktive Ig-sezernierende Zellen differenzieren. [152] Dies könnte ein Hinweis für die ineffiziente Entwicklung einer humoralen Malaraiimmunität sein. Sullivan et al. (2015) beschrieben, dass atypische MBC *ex vivo* spontan nur geringe Ig-Mengen produzieren und eine Hochregulation des FcRL5 aufweisen, eine hohe *Pf*-Exposition ging mit erhöhten FcRL5⁺ atypischen MBC einher. Sie stellten die Hypothese auf, dass atypische MBC funktionale Unterschiede zu klassischen MBC aufweisen und möglicherweise dysfunktional sind.[179]

4.5 Vergleich der *Pf*-Immunantwort nach geographischen Subpopulationen im Stadt-Land-Vergleich

Für die Gesundheitsversorgung und präventive Maßnahmen ist ein besseres Verständnis der unterschiedlichen Entwicklung und Verteilung von Malariaerkrankungen sowie deren Behandlungsstrategien in innerstädtischen und ländlichen Regionen von großer Relevanz.[216] Einige Studien legen nahe, dass ländliche Regionen aufgrund eines vermeintlich höheren Expositionsrisikos und geringeren Zugangsmöglichkeiten zu Präventionsmaßnahmen ein höheres Malariarisiko aufweisen, als urbane.[190, 140, 76] Demgegenüber steht ein Trend einer Zunahme von Infektionskrankheiten in urbanen Regionen.[76, 115, 183, 90, 4] Es liegen dabei kaum Daten zu Unterschieden im *Pf*-Immunitätsstatus zwischen ländlichen und urbane Regionen vor. Darüber hinaus erschwert ein Fehlen einer international akzeptierten einheitliche Definition von ländlichen und städtischen Räumen die Vergleichbarkeit von Daten im Stadt-Land-Vergleich.[183]

Die Probanden wurden in acht Gemeinden rekrutiert, davon gelten zwei Gemeinden (Lambaréné und Ndjolé) nach gabunischer Definition als Städte, alle weiteren sind ländliche Ansiedlung im Regenwaldgebiet. Die Regierung Gabuns deklariert landesweit insgesamt 13 Siedlungen als Städte.[69] In Lambaréné lebten im Jahr 2011 23.457 Einwohner (Bevölkerungsdichte 703,36/km²), in Ndjolé 4.209 Einwohner (Bevölkerungsdichte 107,04/km²) und zum Vergleich in der Hauptstadt Libreville 493.351 Einwohner (Bevölkerungsdichte 740,77/km²).[69] Die Stadt Ndjolé verfügte im Gegensatz zur Stadt Lambaréné trotz der niedrigeren Einwohnerzahl zusätzlich über eine Schienenverbindung mit regelmäßigem Zugverkehr in die Hauptstadt und stellt damit eine hochfrequentierte Route in andere Landesteile dar, mit entsprechender Infrastruktur. Es liegen keine Informationen über die Bevölkerungsdichten der eingeschlossenen Dörfer vor. Sie sind jedoch in der subjektiven Betrachtung deutlich kleiner, als Ndjolé.

Für die Auswertung der Studienergebnisse wurden die ländlichen Gemeinden (Dörfer) gruppiert. Die Stichproben der einzelnen Gemeinden wurden explorativ untersucht, weil die Gruppen jeweils zu klein waren, um einen validen statistischen Vergleich durchführen zu können.

In der Literatur stehen keine Vergleichswerte für IgG oder IgM gegen GMZ2 subklinischer Probanden im Stadt-Land-Vergleich zur Verfügung. In der Studienpopulation waren die IgG-GMZ2-Reaktivitäten der ländlichen Stichprobe signifikant höher, als in der Stichprobe aus Lambarénés. Die Stichprobe aus der Stadt Ndjolé lag, würde

man die Stadtkriterien zugrunde legen, überraschenderweise ebenfalls über alle Probanden hinweg über dem Mittel der Stadt Lambaréné. Die IgM-GMZ2-Reaktivitäten waren heterogener, bei größerer Varianz und wiesen keine signifikanten Unterschiede im Stadt-Land-Vergleich auf.

Die Ergebnisse des Vergleichs der GMZ2⁺ klassischen und atypischen Memory-B-Zellkompartimente stellen sich insgesamt sehr heterogen dar. Die relativ betrachtet sehr hohen und möglicherweise einem Mess- oder Übertragungsfehler zugrunde liegenden B-Zellwerte des Individuums MP041 aus Ndougou (s. Abb. 3.16) verzerren die Darstellung im Histogramm und erschweren einen Vergleich nach Regionen, weshalb die Darstellung um dieses Individuum bereinigt wurde.

In einem Vergleich zwischen Malariaerkrankungen in Lambaréné und Libreville zeigte Libreville eine signifikant höhere Rate an schweren Malariaerkrankungen. Die Autoren nehmen an, dass ein geringerer Zugang zur Gesundheitsversorgung aufgrund sozioökonomischer Schwierigkeiten großer kinderreicher Bevölkerungsgruppen die höhere Sterblichkeit begründen könnte.[84] Weitere Studien zeigten zwar, dass eine erhöhte Transmissionsrate eine erhöhte Rate an Malariaerkrankungen zur Folge hat, jedoch die Rate an Fällen zerebraler Malaria mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate in niedrigen bis mittelgradigen Transmissionsgebieten höher ist.[137, 70] Trotz dessen zeigen Daten, dass mit einer Abnahme der Transmission die Gesamtmalariasterblichkeitsrate ebenfalls abnimmt. Die erhöhte Sterblichkeitsrate bei zerebraler Malaria in Regionen niedriger Transmission würde demnach durch eine dort insgesamt geringere Rate an zerebraler Malaria zu erklären sein.[138]

Ein großer Unterschied der für die Studien aufgesuchten Gemeinden ist neben der Lage, Größe, Bevölkerungsdichte und dem sozioökonomischen Status der Bevölkerung die Distanz bzw. die Verfügbarkeit von Transportmitteln zum nächstgelegenen, für eine Malariabehandlung qualifizierten medizinischen Versorgungszentrum. Von den in die Studie eingeschlossenen Gemeinden verfügte einzig die Stadt Lambaréné über ein Krankenhaus, dem Albert-Schweitzer-Krankenhaus als überregionales medizinisches Versorgungszentrum. In allen anderen eingeschlossenen Gemeinden standen in den Jahren vor und zum Zeitpunkt der Probenerhebung keine *Pf*-Detektions- oder ambulante oder stationäre Interventionsmöglichkeiten zur Verfügung.

Man könnte also die Hypothese aufstellen, dass sie *Pf*-Infektionen nur eingeschränkt qualifiziert diagnostizieren und therapieren konnten und konsekutiv eine relativ höhere *Pf*-Immunität entwickelt haben. Der Vergleich der Stichproben aus den Städten Lambaréné und Ndjolé weist darauf hin, dass die *Pf*-Immunität nicht notwendigerweise von der Urbanität, sondern möglicherweise vielmehr von medizinischen

Diagnostik- und Versorgungsmöglichkeiten abhängen könnte.[30] Dies ist jedoch aufgrund der kleinen Stichproben nur limitiert aussagekräftig. Zudem fehlt für einen übertragbaren Vergleich eine international einheitliche Stadt-Land-Definition.

Es liegen bislang keine publizierten Referenzuntersuchungen der *Pf*-Immunität nach regionalen Subgruppen für das Studiengebiet vor.

4.6 Ausblick

Für die in den Entwicklungs-Millenniumzielen der Vereinten Nationen definierte Malariaeradikation ist eine Entwicklung eines effektiven Malariaimpfstoffes sowie ein umfassendes epidemiologisches Verständnis von zentraler Bedeutung. Ein weiterreichendes Verständnis der adaptiven *Pf*-Immunantwort und insbesondere des serologischen *Pf*-Memorys ist notwendig. Die Ursache der Abnahme der MBC-Antworten über die Zeit muss dringend identifiziert werden, um durch Malariaimpfstoffe eine robuste bzw. langlebige Immunität erreichen zu können. Eine Kombination des moderat effektiven prä-erythrozytären Impfstoffes Mosquirix (RTS,S/AS01) (s. Abschnitt 1.4.5) mit einem Blutstadienimpfstoff im Sinne einer Multistadienimmunität könnte von Vorteil sein.

Unter den Antikörpern nehmen IgG die Hauptabwehrfunktion wahr, das serologische Memory mit langlebigen und effektiven MBC ist zentral für den Erhalt einer *Pf*-Semi-Immunität. Es bleibt herauszufinden, ob atypische MBC eine vollständig funktionale Gedächtnisfunktion einnehmen, ob sie den kurzlebigen Ig-sezernierenden Zellen zuzuordnen sind oder eine das serologische Memory inhibierende Funktion ausüben. Es wurden nur MBC aus dem peripheren venösen Blut untersucht. Man könnte vermuten, dass bei einer *Pf*-Infektion atypische MBC aus dem Knochenmark aktiviert werden. Weitere Studien von MBC aus den primären und sekundären lymphatischen Organen wären aufschlussreich.

Die hier dargestellte Untersuchung der Antikörper und Memory-B-Zellen gegen GMZ2 betrachtet quantitative Aspekte im zeitlichen Querschnitt. Es sind weitere Studien notwendig, die qualitative Bindungseigenschaften und Effektorfunktionen der für die adaptive *Pf*-Immunität relevanten IgG zu untersuchen.

Zudem sollten auch andere *Pf* Antigene untersucht werden. Es existieren mittlerweile Arrays, auf denen fast das gesamte *Pf*-Proteom repräsentiert ist. Die derzeit erfolgsversprechendsten Malariaimpfstoffkandidaten basieren auf der Impfung von ganzen *Plasmodium falciparum*-Sporozoit (PfSPZ).[31, 77, 120, 157] Mordmüller et al. erreichten in einer kürzlich veröffentlichten Studie einen sterilen Malariaschutz (100 %). Sie impften dazu gesunde malaria-naive Erwachsener intravenös mit steri-

len, aufgereinigten und kryokonservierten PfSPZ unter Chloroquin-Prophylaxe bei insgesamt guter Verträglichkeit. Weitere Studien, die unter anderem die Dauer eines entsprechenden Malariaschutzes, die Übertragbarkeit auf endemische Regionen mit natürlichen Infektionen und Impfungen von Risikopopulationen einschließen, seien notwendig. Zudem sollte, neben der B-Zell- und Antikörperforschung, nach den neuesten Forschungsergebnissen der Fokus auch auf T-Zellfunktionen und insbesondere Memory-CD4-T-Zellen gelegt werden.[120]

Neben den immunologischen Schutzmechanismen ist ein tiefgreifendes Verständnis der öffentlichen Gesundheitsversorgung in endemischen Gebieten zur Malariabekämpfung notwendig. Daten zur natürlich erworbenen Immunität von Stadt- und Landbevölkerungen bringen Hinweise für entsprechende epidemiologische Schutzmaßnahmen. Es ist daher wichtig, weitere Informationen über regionale Einflussfaktoren auf die adaptive *Pf*-Immunität herauszuarbeiten. Dabei sollten Untersuchungen mit größeren Stichproben und standardisierten, vergleichbaren epidemiologischen Einflussgrößen arbeiten.

Die spezifische Darstellung der Ndjolé-Region kann für weitere Fragestellung und die Wahl von Stichproben für Malariastudien in Gabun interessant sein.

Im Laufe der Entstehung dieser Inaugural-Dissertation konnte ein weiterer Rückgang der weltweiten *Pf*-Prävalenz verzeichnet werden, der hoffnungsvoll stimmt. Laut der WHO sind die Malaria-Mortalitätsraten zwischen 2000 und 2013 um 47 % weltweit, und um 54 % in der afrikanischen Region gesunken (s. Abb. 4.2).[211]

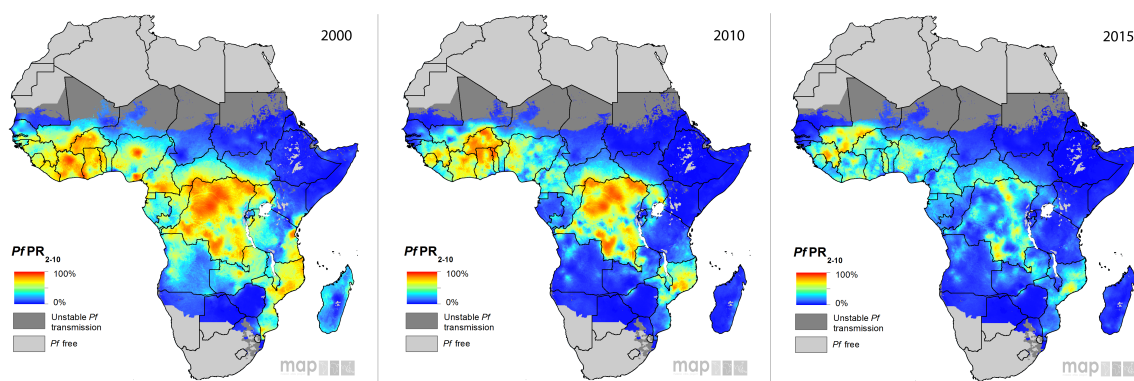


Abb. 4.2: Weltweite Prävalenz der *Malaria tropica* - Entwicklung von 2000 über 2010 bis 2015 im Vergleich innerhalb der stabilen Übertragungsgrenze. Der abgebildete Kennwert ($PfPR_2-10$) ist die nach Alter genormte *P. falciparum* Parasitenrate. Sie beschreibt den geschätzten Anteil 2-10 Jahre alter Individuen der Allgemeinbevölkerung, die auf das jeweilige gemittelt jeweils mit *P. falciparum* infiziert waren.[192]

5 Zusammenfassung

Die durch *Pf* verursachte Malaria tropica bedroht weltweit bis zu 3,3 Mrd. Menschen mit vielen Todesfällen, allein 438 000 im Jahr 2015. Sie zählt zu den größten Herausforderungen des öffentlichen Gesundheitssystems in hochendemischen Gebieten mit einer sehr hohen Morbidität und Mortalität für Kinder in Afrika südlich der Sahara. Der Entwicklung eines hocheffektiven Malariainpfstoffes wird eine zentrale Rolle in der weltweiten Malariaeliminierung beigemessen. Die natürlich erworbene, nicht sterile *Pf*-Immunität ist ein Modell für die Entwicklung von Impfstoffen, allerdings ist sie bislang nicht gut verstanden. Es existiert in der klinischen Praxis noch kein hochwirksamer Impfstoff; der fortgeschrittenste Impfstoffkandidat RTS,S bietet allenfalls moderaten und kurzlebigen Schutz.

Antikörper spielen eine wichtige Rolle in der natürlich erworbenen Immunität gegen die asexuellen Blutstadien des *Pf*, die für Symptome und Komplikationen einer Malaria verantwortlich sind. Ziel der Studie war, durch die Analyse der humoralen *Pf*-Blutstadienimmunität malariaexponierter, klinisch gesunder Erwachsener in Gabun, einem Endemiegebiet für *Pf*, einen Beitrag zum Verständnis der natürlich erworbenen *Pf*-Immunität unter Berücksichtigung epidemiologischer Einflussfaktoren zu leisten. Dazu wurden die Antikörper Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM), sowie klassische und atypische Memory-B-Zellen semi-immuner Individuen gegen das *Pf*-Fusionsprotein GMZ2, einem Malariainpfstoffkandidaten, untersucht und hochaffine Memory-B-Zellen für Folgestudien isoliert.

Die Studie wurde in der für *Pf* hochendemischen Region um das Albert-Schweitzer-Hospital Lambaréné in Gabun, Zentralafrika, durchgeführt. Von 60 gesunden erwachsenen Individuen wurden GMZ2-spezifische IgG und IgM im Serum mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und GMZ2-reaktive naive, klassische und atypische Memory-B-Zellen mittels Zytometrie untersucht. Zusätzlich wurden *Global Positioning System*-Daten (GPS) der Wohnorte der Individuen, Angaben zu Malariapräventionsmaßnahmen und Fieber erhoben und eine hämatologische und parasitologische Routinediagnostik durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nach regionalen Subpopulationen und insbesondere im Stadt-Land-Vergleich miteinander verglichen.

Alle eingeschlossenen Individuen (19-51 Jahre) im über 2.000 km² großen Studiengebiet zeigten hohe IgG- und IgM-Spiegel gegen GMZ2; die IgG-Reaktivität (MW

3,343 OD, SD 0,309 OD bei 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) war im Mittel 13-mal höher, als die der naiven Referenzprobe ($p = 0,0006$), die IgM-Reaktivität (MW 3,003 OD, SD 0,618 OD bei 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) um den Faktor 6 ($p = 0,0281$) bei größerer Streuung der Messwerte. Bei allen Individuen ließen sich im Vergleich zur *Pf*-naiven Referenzprobe hohe Raten an zirkulierenden klassischen und atypischen IgG⁺GMZ2⁺ Memory-B-Zellen nachweisen. Atypische IgG⁺GMZ2⁺ Memory-B-Zellen wiesen höhere Frequenzen auf, als die der klassischen IgG⁺GMZ2⁺ Memory-B-Zellen und waren insbesondere bei *Pf*-positiven Individuen relativ erhöht. Individuen aus der Stadt Lambaréné wiesen eine signifikant niedrigere IgG-Reaktivität gegen GMZ2 auf, als die der Individuen aus ländlichen Regionen ($p = 0,0048$) sowie der Individuen aus der Stadt Ndjolé ($p = 0,0297$). Letztere unterschieden sich nicht signifikant von Individuen aus ländlichen Regionen. Die IgM-Reaktivität zeigte zwischen den regionalen Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede. Ein Vergleich der Memory-B-Zellen gegen GMZ2 zeigte im regionalen Vergleich keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch im Trend höhere Werte für Individuen aus der medizinisch unterversorgten Region um die Stadt Ndjolé nördlich von Lambaréné.

Für eine detaillierte Untersuchung der regionalen Subpopulation war die Stichprobe jedoch zu klein. Zudem wurden keine hochsensitiven *Pf*-Detektionsmethoden für submikroskopische Infektionen eingesetzt.

Für eine in den Entwicklungs-Millenniumszielen definierte weltweite Malariaeradikation ist die Entwicklung eines hocheffektiven Malariaimpfstoffes sowie ein umfassendes Verständnis epidemiologischer Einflussfaktoren von zentraler Bedeutung. Dafür sind weiterführende Erkenntnisse über die effektiven und inhibierenden Funktionen der humoralen *Pf*-Immunantwort, insbesondere der IgG-, IgM-Funktionen und der verschiedenen Memory-B-Zellklassen, notwendig.

Abstract

Plasmodium falciparum (*Pf*) induced tropical malaria threatens up to 3.3 billion people and is responsible for many deaths; 438 000 in 2015 alone. With a very high morbidity and mortality for children in sub-Saharan Africa it is one of the key challenges for public health in highly endemic areas. The development of an effective malaria vaccine has been given a central role in the quest for global malaria elimination. Naturally acquired, non-sterile immunity to *Pf* is a basis for vaccine development. However, it is understood only in part. A clinically applied highly effective vaccine does not yet exist. The most advanced clinical trials vaccine candidate RTS,S only embues moderate and short-lived protection.

Antibodies play an important role in the non-sterile, naturally acquired immunity to the asexual blood stages of *Pf*, which are responsible for the clinical manifestations and complications of malaria. The aim of the study was to achieve a contribution to the understanding of naturally acquired immunity against *Pf* by analysing the asexual blood stage immunity of life-long exposed, clinically healthy adults while taking the influence of epidemiological factors into account. To this end, Immunoglobuline G (IgG), Immunoglobuline M (IgM) and classical and atypical memory B cells of semi-immune individuals have been examined against the *Pf* fusion protein GMZ2, a malaria vaccine candidate. Highly affine memory B cells were then isolated for follow-up studies.

The study was conducted in a highly malaria-endemic region around the Albert Schweitzer Hospital in Lambaréné, Gabon, Central Africa. GMZ2-specific IgG and IgM from 60 healthy adult individuals were examined in serum by *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA); respectively GMZ2 specific naive, classical and atypical memory B cells were examined by cytometry. Data on the individuals residence global positioning system (GPS) locations, malaria prevention measures and history of fever were collected and routine hematological and parasitological diagnostics were performed. The individual results were regrouped into regional subpopulations and compared against each other, specifically regarding urban and rural residencies. All enrolled individuals (19-51 years) in the > 2,000 km² study area showed high IgG and IgM levels against GMZ2; the IgG reactivity (M 3.343, SD 0.309 at 0.1 µg/ml) was on average 13 times higher than that of the naive reference sample (p = 0.0006); IgM reactivity (M 3.003, 0.618 SD at 0.1 µg/ml) was also found to be raised by a factor of 6 (p = 0.0281) although with a larger variance of measured values. When compared against the naive reference sample, high rates of circulating classical and atypical IgG⁺ memory B cells against GMZ2 were also detected in all individuals. Atypical IgG⁺GMZ2⁺ memory B cells were relatively increased,

especially in *Pf*-positive individuals. Residents of the city of Lamberéné showed a significantly lower IgG reactivity against GMZ2 than residents of rural areas ($p = 0.0048$) and to the residents of the city of Ndjole ($p = 0.0297$). Whereas residents of Ndjolé showed no significant difference to the residents of rural areas. The IgM reactivity was similar between urban and rural subpopulations. A comparison of the memory B cells against GMZ2 by these geographical subpopulations revealed no statistically significant results, but did however, show a trend for higher frequencies of atypical memory B cells in the remote region around the city Ndjolé north of Lambaréné. However, the sample size was too small for a detailed analysis of regional subpopulation. In addition, no highly sensitive *Pf* detection methods for submicroscopic infections have been used.

The development of a highly effective malaria vaccine would greatly facilitate achievement of malaria control and eradication, one of the Millennium Development Goals. Therefore, a better understanding of the effective and inhibitory functions of humoral *Pf* immunity, in particular the understanding of the role of IgG, IgM and the various memory B cell classes, is required.

6 Literaturverzeichnis

- [1] ABBA K, Olliaro P Naing CM Jackson SM Takwoingi Y Donegan S Garner P. Deeks JJ J. Deeks JJ: Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. In: *The Cochrane Library* 7 (2011), Nr. CD008122
- [2] ADEGNIKA AA, Agnandji ST Chai SK Breitling LP Ramharter M Frolich M Issifou S Kremsner PG Yazdanbakhsh M. Verweij JJ J. Verweij JJ: Microscopic and sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. In: *Am J Trop Med Hyg* 75(5) (2006), S. 798–803
- [3] AHMED L, Ainley C De la Salle B Brereton M Hyde K Burthem J Gilmore W. Seal LH L. Seal LH: Web-Based Virtual Microscopy of Digitized Blood Slides for Malaria Diagnosis: An Effective Tool for Skills Assessment in Different Countries and Environments. In: *J Med Internet Res* 18 (2016), Nr. 8, S. e213
- [4] ALIROL E, Stoll B Chappuis F Loutan L. Getaz L L. Getaz L: Urbanisation and infectious diseases in a globalised world. In: *Lancet Infect Dis* 11 (2011), Nr. 2, S. 131–41
- [5] AMINO R, Martin B Celli S Shorte S Frischknecht F Ménard R. Thiberge S: Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. In: *Nat Med* 12(2) (2006), S. 220–4
- [6] ARAMA C, Doumtable D Portugal S Tran TM Jain A Traore B Doumbo OK Davies DH Troye-Blomberg M Dolo A Felgner PL Crompton P. Skinner J J. Skinner J: Genetic Resistance to Malaria Is Associated With Greater Enhancement of Immunoglobulin (Ig)M Than IgG Responses to a Broad Array of *Plasmodium falciparum* Antigens. In: *Open Forum Infect Dis* 26;2(3):ofv118 (2015)
- [7] ATWINE D, Bassat Q Chalwe V D’Alessandro U Dhorda M Donegan S Garner P González R Tinga Guiguemde R Hachizovu S Kajungu D Kanya M Karema C Kibuuka A Kremsner PG Lell B Machevo S Menéndez C Menten J Meremikwu M Mombo-Ngoma G Mudangha F Mulenga M Munyaneza T Nabasumba C Nambozi M Odey F Okello S Oringange C Oyo-Ita A Piola P Ravinetto R Tinto H Rouamba N Strecker F Talisuna AO Umulisa N Uwimana A Valéa I Van Geertruyden JP van Loen H Williamson P Yeka A. Balikagala B: A head-to-head comparison of four artemisinin-based combinations for treating uncomplicated malaria in African children: a randomized trial. In: *PLoS Med* 8(11) (2011), S. e1001119

- [8] AUSWÄRTIGES AMT: *Gabun*. http://www.auswaertiges-amt.de/DE/Aussenpolitik/Laender/Laenderinfos/01-Nodes_Uebersichtsseiten/Gabun_node.html. Version: 05 2017. – 18.06.2017
- [9] AVRAMEAS S, Guilbert B.: Enzymo-immunological determination of proteins with the aid of immunoadsorbants and enzyme-labelled antigens. In: *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 273(25) (1971), S. 2705–7
- [10] BARFOD L, Pleman ST Ofori MF Pleass RJ Hviid L. Dalgaard MB M. Dalgaard MB: Evasion of immunity to Plasmodium falciparum malaria by IgM masking of protective IgG epitopes in infected erythrocyte surface-exposed PfEMP1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(30) (2011), S. 12485–90
- [11] BARRY AE, Buckee CO Reeder J. Schultz L L. Schultz L: Contrasting population structures of the genes encoding ten leading vaccine-candidate antigens of the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. In: *PLoS One* 4(12) (2009), S. e8497
- [12] BATISTA FD, Harwood N.: The who, how and where of antigen presentation to B cells. In: *Nat Rev Immunol* 9(1) (2009), S. 15–27
- [13] BATON LA, Ranford-Cartwright L.: Spreading the seeds of million-murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. In: *Trends Parasitol* 21 (2005), Nr. 12, S. 573–80
- [14] BAUMANN A, Urbaez ML Vivas-Martinez S Duran R Nieves T Esen M Mordmuller BG Theisen M Avilan L Metzger W. Magris MM M. Magris MM: Naturally acquired immune responses to malaria vaccine candidate antigens MSP3 and GLURP in Guahibo and Piaroa indigenous communities of the Venezuelan Amazon. In: *Malar J* 11 (2012), S. 46
- [15] BD BIOSCIENCES: *BD FACSCalibur*. <http://www.bdbiosciences.com/anz/instruments/facscalibur/features/index.jsp>. Version: 06 2017. – 18.06.2017
- [16] BD BIOSCIENCES: *BD Fluorescence Spectrum Viewer*. <http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrumguide/>. Version: 06 2017. – 18.06.2017
- [17] BEADLE C, Weiss WR McElroy PD Maret SM Oloo AJ Hoffman S. Long GW G. Long GW: Diagnosis of malaria by detection of Plasmodium falciparum HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. In: *Lancet* 343 (1994), Nr. 8897, S. 564–8
- [18] BERNASCONI NL, Lanzavecchia A. Traggiai E E. Traggiai E: Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. In: *Science* 298(5601) (2002), S. 2199–202
- [19] BORRE MB, Høgh B Petersen E Rieneck K Riley E Meis JF Aikawa M Nakamura K Harada M et al. Dziegiel M M. Dziegiel M: Primary structure and

- localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. In: *Mol Biochem Parasitol* 49 (1991), Nr. 1, S. 119–31
- [20] BOUCHAUD O, Kony S Durand R Schiemann R Ralaimazava P Coulaud JP Le Bras J Deloron P. Cot M M. Cot M: Do African immigrants living in France have long-term malarial immunity? In: *Am J Trop Med Hyg* 72 (2005), Nr. 1, S. 21–5
- [21] BOUHAROUN-TAYOUN H, Sabchareon A Chongsuphajaisiddhi T Druilhe P. Attanath P P. Attanath P: 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. In: *J Exp Med* 172 (1990), Nr. 6, S. 1633–41
- [22] BULL PC, Kortok M Molyneux CS Newbold CI Marsh K. Lowe BS B. Lowe BS: Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. In: *Nat Med* 4(3) (1998), S. 358–60
- [23] CABRAL AC, Suarez-Mutis MC Boia MN Carvalho-Costa F. Fe NF N. Fe NF: Increasing incidence of malaria in the Negro River basin, Brazilian Amazon. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104(8) (2010), S. 556–562
- [24] CALLAHAN, D: The WHO definition of 'health'. In: *Stud Hastings Cent.* 1 (1973), Nr. 3, S. 77–88
- [25] CASARES S, Richie T.: Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. In: *Curr Opin Immunol* 21(3) (2009), S. 321–30
- [26] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: *Anopheles Mosquitoes*. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>. Version: 10 2015. – 18.06.2017
- [27] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: *Malaria Lifecycle*. https://www.cdc.gov/malaria/images/graphs/life_cycle/malaria_lifecycle.gif. Version: 06 2017. – 18.06.2017
- [28] CENTRAL INTELLIGENCE AGENCY: *The World Factbook*. <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/gb.html>. Version: 05 2017. – 18.06.2017
- [29] CHARLIER P, Malaurie J Brun L Kepanga M-Hoang-Opermann V Correa Calfin JA Nuku G Ushiga M Schor XE Deo S Hassin J Herve C. Coppens Y Y. Coppens Y: A new definition of health? An open letter of autochthonous peoples and medical anthropologists to the WHO. In: *Eur J Intern Med* 37 (2017), S. 33–37
- [30] CHRISTOPHER J. THOMAS, Gemma Davies; Christine E. D.: Mixed picture for changes in stable malaria distribution with future climate in Africa. In: *Trends Parasitol* 20(5) (2004), S. 216–220

- [31] CLYDE DF, McCarthy VC Vanderberg J. Most H H. Most H: Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. In: *Am J Med Sci* 266 (1973), Nr. 3, S. 169–77
- [32] COHEN S, Carrington S. McGregor IA I. McGregor IA: Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. In: *Nature* 192 (1961), S. 733–7
- [33] COMBES V, Faille D Jambou R Hunt NH-Grau G. El-Assaad F F. El-Assaad F: Microvesiculation and cell interactions at the brain–endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. In: *Prog Neurobiol* 91 (2010), S. 140–51
- [34] CORTES A, Kaneko O Yim Lim BY Ivens A-Holder A. Carret C C. Carret C: Epigenetic silencing of Plasmodium falciparum genes linked to erythrocyte invasion. In: *PLoS Pathog* 3(8) (2007), S. 1023–35
- [35] COURTIN D, Huismans H Kusi K Milet J Badaut C Gaye O Roeffen W Remarque EJ Sauerwein R Garcia A Luty A. Oesterholt M M. Oesterholt M: The quantity and quality of African children’s IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against Plasmodium falciparum malaria. In: *PLoS One* 4 (2009), Nr. 10, S. e7590
- [36] COVELL G, Nicol W.: Clinical, chemotherapeutic and immunological studies on induced malaria. In: *Br Med Bull* 8(1) (1951), S. 51–5
- [37] COWMAN AF, Crabb B.: Invasion of red blood cells by malaria parasites. In: *Cell* 124(4) (2006), S. 755–66
- [38] CROMPTON PD, Miller L. Pierce S S. Pierce S: Advances and challenges in malaria vaccine development. In: *J Clin Invest* 120(12) (2010), S. 4168–4178
- [39] DAL-BIANCO MP, Kombila UD Kun JF Grobusch MP Ngoma GM Matsiegui PB Supan C Salazar CL Missinou MA Issifou S Lell B Kremsner P. Koester KB K. Koester KB: High prevalence of asymptomatic Plasmodium falciparum infection in Gabonese adults. In: *Am J Trop Med Hyg* 77(5) (2007), S. 939–42
- [40] DASARI P, Bhakdi S.: Pathogenesis of malaria revisited. In: *Med Microbiol Immunol* (2012)
- [41] DELORON P, Chougnet C.: Is immunity to malaria really short-lived? In: *Parasitol Today* 8(11) (1992), S. 375–8
- [42] DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR TROPENMEDIZIN UND INTERNATIONALE GESUNDHEIT E.V.: Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Malaria. In: *AWMF online* 042(001) (2011), S. S1
- [43] DODOO D, Giha H Kurtzhals JA Akanmori BD Koram K Dunyo S Nkrumah FK Hviid L Theander T. Staalsoe T T. Staalsoe T: Antibodies to variant antigens on the surfaces of infected erythrocytes are associated with protection from malaria in Ghanaian children. In: *Infect Immun* 69(6) (2001), S. 3713–8

- [44] DODOO D, Kurtzhals JA Akanmori BD Koram KA Jepsen S Nkrumah FK Theander TG Hviid L. Theisen M M. Theisen M: Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria. In: *J Infect Dis* 181 (2000), Nr. 3, S. 1202–5
- [45] DONDORP AM, et a.: Artesimin resistance: current status and scenarios for containment. In: *Nat Rev Microbiol* 8(4) (2010), S. 272–280
- [46] DONDORP AM, Pongtavornpinyo W Sahassananda D Silamut K Chotivanich K Newton PN Pitisuttithum P Smithyman AM White NJ Day N. Desakorn V V. Desakorn V: Estimation of the total parasite biomass in acute *falciparum* malaria from plasma PfHRP2. In: *PLoS Med* 2 (2005), Nr. 8, S. e204
- [47] DONDORP AM, Yi P Das D Phyto AP Tarning J Lwin KM Arie F Hanpithakpong W Lee SJ Ringwald P Silamut K Imwong M Chotivanich K Lim P Herdman T An SS Yeung S Singhasivanon P Day NP Lindegardh N Socheat D-White N. Nosten F F. Nosten F: Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. In: *N Engl J Med* 361(5) (2009), S. 455–67
- [48] DOOLAN DL, Baird J. Dobano C C. Dobano C: Acquired Immunity to Malaria. In: *Clin Microbiol Rev* 22(1) (2009), S. 13–36
- [49] DOOLAN DL, Martinez-Alier N.: Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. In: *Curr Mol Med.* 6(2) (2006), S. 169–85
- [50] DORFMAN JR, Ndungu FM Langhorne J Kortok MM Lowe BS Mwangi TW Williams TN Marsh K. Bejon P P. Bejon P: B cell memory to 3 *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in a malaria-endemic area. In: *J Infect Dis* 191(10) (2005), S. 1623–30
- [51] DOURADINHA B, Doolan D.: Harnessing immune responses against *Plasmodium* for rational vaccine design. In: *Trends Parasitol* 27(6) (2011), S. 274–83
- [52] DRUILHE P, Marc JP Miltgen F Mazier D Parent G. Pradier O O. Pradier O: Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. In: *Infect Immun* 53(2) (1986), S. 393–7
- [53] EDOZIEN JC, Udeozo I. Gilles HM H. Gilles HM: Adult and cord-blood gamma-globulin and immunity to malaria in Nigerians. In: *Lancet* ii (1962), S. 951–955
- [54] EHRHARDT GR, Gartland L Leu CM Zhang S Davis RS Cooper M. Hsu JT J. Hsu JT: Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. In: *J Exp Med* 202(6) (2005), S. 783–91
- [55] EHRHARDT GR, Kitamura H Ohara O Wang JY Cooper M. Hijikata A A. Hijikata A: Discriminating gene expression profiles of memory B cell subpopulations. In: *J Exp Med* 205(8) (2008), S. 1807–17

- [56] EICHNER M, Molineaux L Collins WE Jeffery GM Dietz K. Diebner HH H. Diebner HH: Genesis, sequestration and survival of Plasmodium falciparum gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malariat therapy data. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(5) (2001), S. 497–501
- [57] ELLIOTT SR, Duffy MF Byrne TJ Tham WH Rogerson SJ Brown GV Eisen D. Payne PD P. Payne PD: Antibody recognition of heterologous variant surface antigens after a single Plasmodium falciparum infection in previously naive adults. In: *Am J Trop Med Hyg* 76(5) (2007), S. 860–4
- [58] ENGVALL E, Perlmann P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. In: *Immunochemistry* 8(9) (1971), S. 871–4
- [59] ESEN M, Schleucher R Gaessler M Imoukhuede EB Imbault N Leroy O Jepsen S Knudsen BW Schumm M Knobloch J Theisen M Mordmueller B. Kremsner PG P. Kremsner PG: Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. In: *Vaccine* 27(49) (2009), S. 6862–8
- [60] EUROPEAN MEDICINES AGENCY: *First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA.* http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2015/07/WC500190447.pdf. Version: 2015. – 18.06.2017
- [61] FAIRHURST RM, Krause M. Bess CD C. Bess CD: Abnormal PfEMP1/knob display on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing hemoglobin variants: fresh insights into malaria pathogenesis and protection. In: *Microbes Infect* 14(10) (2012), S. 851–62
- [62] FEACHEM RG, Hwang J Cotter C Wielgosz B Greenwood BM Sabot O Rodriguez MH Abeyasinghe RR Ghebreyesus TA Snow R. Phillips AA A. Phillips AA: Shrinking the malaria map: progress and prospects. In: *Lancet* 6;376(9752) (2010), S. 1566–78
- [63] FOWKES FJ, Simpson JA Beeson J. Richards JS J. Richards JS: The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of Plasmodium falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis. In: *PLoS Med* 7(1) (2010), S. e1000218
- [64] GABISWORLD.COM: *Gabon.* <http://ds-lands.com/photo/countries/gabon/07/>. Version: 06 2017. – 18.06.2017
- [65] GALLUP JL, Sachs J.: The economic burden of malaria. In: *Am J Trop Med Hyg* 64(1-2 Suppl) (2001), S. 85–96
- [66] GARDNER MJ, Fung E White O Berriman M Hyman RW Carlton JM Pain A Nelson KE Bowman S Paulsen IT James K Eisen JA Rutherford K Salzberg SL Craig A Kyes S Chan MS Nene V Shallom SJ Suh B Peterson J-Angiuoli S Perteua M Allen J Selengut J Haft D Mather MW Vaidya AB Martin DM

- Fairlamb AH Fraunholz MJ Roos DS Ralph SA McFadden GI Cummings LM Subramanian GM Mungall C Venter JC Carucci DJ Hoffman SL Newbold C Davis RW Fraser CM Barrell B. Hall N N. Hall N: Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Nature* 419(6906) (2002), S. 498–511
- [67] GARNHAM, PC: Malarial immunity in Africans; effects in infancy and early childhood. In: *Ann Trop Med Parasitol* 43(1) (1949), S. 47–61
- [68] GHUMRA A, McIntosh RS Raza A Rasmussen IB Braathen R Johansen FE Sandlie I Mongini PK Rowe JA Pleass R. Semblat JP J. Semblat JP: Identification of residues in the Cmu4 domain of polymeric IgM essential for interaction with *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). In: *J Immunol* 181(3) (2008), S. 1988–2000
- [69] GOUVERNEMENT DE LA REPUBLIQUE GABONAISE, MINISTERE DE L'HABITAT, DU LOGEMENT, DE L'URBANISME, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU DEVELOPPEMENT DURABLE: *Etude diagnostique pour l'elaboration d'une strategie nationale d'habitat et de developpement urbain au Gabon*. 2011
- [70] GRIFFIN JT, Reyburn H Drakeley CJ Riley EM Ghani A. Hollingsworth TD T. Hollingsworth TD: Gradual acquisition of immunity to severe malaria with increasing exposure. In: *Proc Biol Sci* 282 (2015), Nr. 1801, S. 20142657
- [71] GROBUSCH MP, Kremsner P.: Uncomplicated malaria. In: *Curr Top Microbiol Immunol*. 295 (2005), S. 83–104
- [72] GUEIRARD P, Thiberge S Bernex F Ishino T Milon G Franke-Fayard B Janse CJ Ménard R Amino R. Tavares J: Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(43) (2010), S. 18640–5
- [73] GUERRANT RL, Weller P. Walker DH D. Walker DH ; CONSULT, Elsevier: E. (Hrsg.): *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*. 3rd. Saunders, 2011 (chapter 96). – 646–675 S.
- [74] GUPTA S, Donnelly CA Marsh K Newbold C. Snow RW R. Snow RW: Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. In: *Nat Med* 5(3) (1999), S. 340–3
- [75] HAY S, Tatem A Noor A Snow R. Guerra C C. Guerra C: The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. In: *Lancet Infect Dis* 4(6) (2004), S. 327–36
- [76] HAY SI, Tatem AJ Atkinson PM Snow R. Guerra CA C. Guerra CA: Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. In: *Nat Rev Microbiol* 3 (2005), Nr. 1, S. 81–90

- [77] HOFFMAN SL, Luke TC Schneider I Le TP Doolan DL Sacci J de la Vega P Dowler M Paul C Gordon DM Stoute JA Church LW Sedegah M Heppner DG Ballou WR Richie T. Goh LM L. Goh LM: Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. In: *J Infect Dis* 185 (2002), Nr. 8, S. 1155–64
- [78] HOLT RA, Halpern A Sutton GG Charlab R Nusskern DR Wincker P Clark AG Ribeiro JM Wides R Salzberg SL Loftus B Yandell M Majoros WH Rusch DB Lai Z Kraft CL Abril JF Anthouard V Arensburger P Atkinson PW Baden H-de Berardinis V Baldwin D Benes V Biedler J Blass C Bolanos R Boscus D Barnstead M Cai S Center A Chaturverdi K Christophides GK Chrystal MA Clamp M Cravchik A Curwen V Dana A Delcher A Dew I Evans CA Flanigan M Grundschober-Freimoser A Friedli L Gu Z Guan P Guigo R Hillenmeyer ME Hladun SL Hogan JR Hong YS Hoover J Jaillon O Ke Z Kodira C Kokoza E Koutsos A Letunic I Levitsky A Liang Y Lin JJ Lobo NF Lopez JR Malek JA McIntosh TC-Meister S Miller J Mobarry C Mongin E Murphy SD O’Brochta DA Pfannkoch C Qi R Regier MA Remington K Shao H Sharakhova MV Sitter CD Shetty J Smith TJ Strong R Sun J Thomasova D Ton LQ Topalis P Tu Z Unger MF Walenz B Wang A Wang J Wang M Wang X Woodford KJ Wortman JR Wu M Yao A Zdobnov EM Zhang H Zhao Q Zhao S Zhu SC Zhimulev I Coluzzi M della Torre A Roth CW Louis C Kalush F Mural RJ Myers EW Adams MD Smith HO Broder S Gardner MJ Fraser CM Birney E Bork P Brey PT Venter JC Weissenbach J Kafatos FC Collins FH Hoffman S. Subramanian GM G. Subramanian GM: The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. In: *Science* 298(5591) (2002), S. 129–49
- [79] HUBER M, Green L van der Horst H Jadad AR Kromhout D Leonard B Lorig K Loureiro MI van der Meer JW Schnabel P Smith R van Weel C Smid H. Knottnerus JA J. Knottnerus JA: How should we define health? In: *BMJ* (2011), S. 343:d4163
- [80] HUBER W, Matile H Lipps HJ Steiger S Beck H. Felger I I. Felger I: Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. In: *Mol Biochem Parasitol* 87 (1997), Nr. 2, S. 231–4
- [81] HUMAR A, Harrington MA Pillai D Kain K. Ohrt C C. Ohrt C: Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. In: *Am J Trop Med Hyg* 56 (1997), Nr. 1, S. 44–8
- [82] HUMBERG A, Mordmueller B Kremsner PG Lell B. Kammer J J. Kammer J: Haematological and biochemical reference intervals for infants and children in Gabon. In: *Trop Med Int Health* 16(3) (2011), S. 343–8
- [83] IQBAL J, Rab A. Sher A A. Sher A: *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: cross-reactivity with rheumatoid factors. In: *J Clin Microbiol* 38 (2000), Nr. 3, S. 1184–6

- [84] ISSIFOU S, Missinou MA Matsiegui PB Dzeing-Ella A Dissanami FA Kombila M Krishna S Kremsner P. Kendjo E E. Kendjo E: Differences in presentation of severe malaria in urban and rural Gabon. In: *Am J Trop Med Hyg* 77 (2007), Nr. 6, S. 1015–9
- [85] JADAD AR, O Grady L.: How should health be defined? In: *BMJ* (2008), S. 337:a2900
- [86] JEFFERY, GM: Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of Plasmodium. In: *Bull World Health Organ* 35(6) (1966), S. 873–82
- [87] JENNINGS RM, Todd JE Armstrong M-Flanagan KL Riley EM Doherty J. DE Souza JB J. DE Souza JB: Imported Plasmodium falciparum malaria: are patients originating from disease-endemic areas less likely to develop severe disease? A prospective, observational study. In: *Am J Trop Med Hyg* 75(6) (2006), S. 1195–9
- [88] JEPPESEN A, Soroka V Stevenson L Turner L Dzikowski R Hviid L Barfod L. Ditlev SB S. Ditlev SB: Multiple Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Variants per Genome Can Bind IgM via Its Fc Fragment Fc μ . In: *Infect Immun* 83 (2015), Nr. 10, S. 3972–81
- [89] JEPSEN MP, Singh SK Esen M Christiansen M Issifou S Hounkpatin AB Ateba-Ngoa U Kremsner PG Dziegiel MH Olesen-Larsen S Jepsen S Mordmuller B Theisen M. Jogdand PS P. Jogdand PS: The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas. In: *J Infect Dis* 208(3) (2013), S. 479–88
- [90] KEISER J, Caldas de Castro M Smith TA Tanner M Singer B. Utzinger J J. Utzinger J: Urbanization in sub-saharan Africa and implication for malaria control. In: *Am J Trop Med Hyg* 71 (2004), Nr. (2 Suppl), S. 118–27
- [91] KENNETH MURPHY, Mark W. Paul Travers T. Paul Travers ; JANEWAY, Charles (Hrsg.): *Janeway's Immunobiology*. 7th. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008 (ISBN 0-8153-4123-7 (978-0-8153-4123-9))
- [92] KHUSMITH S, Druilhe P.: Cooperation between antibodies and monocytes that inhibit in vitro proliferation of Plasmodium falciparum. In: *Infect Immun* 41 (1983), Nr. 1, S. 219–23
- [93] KINYANJUI SM, Bull PC Newbold CI Marsh K. Mwangi T T. Mwangi T: Protection against clinical malaria by heterologous immunoglobulin G antibodies against malaria-infected erythrocyte variant surface antigens requires interaction with asymptomatic infections. In: *J Infect Dis* 190(9) (2004), S. 1527–33
- [94] KREMSNER PG, Feldmeier H Graninger W Rocha RM Wiedermann G. Zotter GM G. Zotter GM: A comparative trial of three regimens for treating

- uncomplicated falciparum malaria in Acre, Brazil. In: *J Infect Dis* 158(6) (1988), S. 1368–71
- [95] KUEHN A, Pradel G.: The coming–out of malaria gametocytes. In: *J Biomed Biotechnol* (2010), S. Article ID: 976827
- [96] LAISHRAM DD, Nanda N Sharma VL Sobti RC Carlton JM Joshi H. Sutton PL P. Sutton PL: The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. In: *Malar J* 11 (2012), S. 29
- [97] LANGHORNE J, Sponaas AM Marsh K. Ndungu FM F. Ndungu FM: Immunity to malaria: more questions than answers. In: *Nat Immunol* 9(7) (2008), S. 725–32
- [98] LAVERAN: A new parasite found in the blood of malaria patients. Parasite origin of malarial attacks. In: *Bull Mem Soc Med Hosp Paris* 17 (1880), S. 158–164
- [99] LENZ D, Lell B Biallas B Boettcher M Mordmueller B Adegnika A. Kremsner PG P. Kremsner PG: Assessment of LED fluorescence microscopy for the diagnosis of Plasmodium falciparum infections in Gabon. In: *Malar J* 10 (2011), S. 194
- [100] LUBELL Y, Mbakilwa H Mwangi R Chonya S Whitty CJ Mills A. Reyburn H H. Reyburn H: The impact of response to the results of diagnostic tests for malaria: cost-benefit analysis. In: *Br Med J* 336(7637) (2008), S. 202–5
- [101] LUNEL F, Druilhe P.: Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against Plasmodium falciparum blood stages in vitro. In: *Infect Immun* 57 (1989), Nr. 7, S. 2043–9
- [102] LUTTMANN W, Kuepper M Myrtek D. Bratke K K. Bratke K: *Der Experimentator: Immunologie*. Bd. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009
- [103] MACKINNON MJ, Marsh K.: The Selection Landscape of Malaria Parasites. In: *Science* 328 (2010), S. 866–71
- [104] MACKINTOSH CL, Marsh K. Beeson JG J. Beeson JG: Clinical features and pathogenesis of severe malaria. In: *Trends Parasitol* 20(12) (2004), S. 597–603
- [105] MACPHERSON GG, White NJ Looareesuwan S Warrell D. Warrell MJ M. Warrell MJ: Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. In: *Am J Pathol* 119(3) (1985), S. 385–401
- [106] MAGISTRADO PA, Vestergaard LS Lemnge M Lavstsen T Turner L Hviid L Jensen AT Theander T. Lusingu J J. Lusingu J: Immunoglobulin G antibody reactivity to a group A Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein

- 1 and protection from *P. falciparum* malaria. In: *Infect Immun* 75(5) (2007), S. 2415–20
- [107] MAMO H, Ajua A Theisen M Mordmuller B Petros B. Esen M M. Esen M: Humoral immune response to *Plasmodium falciparum* vaccine candidate GMZ2 and its components in populations naturally exposed to seasonal malaria in Ethiopia. In: *Malar J* 12 (2013), S. 51
- [108] MAP: MALARIA ATLAS PROJECT: *The spatial distribution of Plasmodium falciparum malaria endemicity map in 2010 globally*. http://www.map.ox.ac.uk/browse-resources/endemicity/Pf_mean/world/. Version: 2010. – 02.05.2015
- [109] MARSH K, Kinyanjui S.: Immune effector mechanisms in malaria. In: *Parasite Immunol* 28(1-2) (2006), S. 51–60
- [110] MARUYAMA M, Rajewsky K. Lam KP K. Lam KP: Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. In: *Nature* 407(6804) (2000), S. 636–42
- [111] MCCOLL DJ, Anders R.: Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). In: *Mol Biochem Parasitol* 90 (1997), Nr. 1, S. 21–31
- [112] MCCOLL DJ, Foley M Kun JFK Favalaro JM Thompson JK Marshall VM Coppel RL Kemp DJ Anders R. Silva A A. Silva A: Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. In: *Mol Biochem Parasitol* 68 (1994), Nr. 1, S. 53–67
- [113] MCGREGOR IA, Cohen S. Carrington SP S. Carrington SP: Treatment of East African *P. falciparum* malaria with West African human gamma-globulin. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 57 (1963), S. 170–175
- [114] MCHEYZER-WILLIAMS M, Wang N McHeyzer-Williams L. Okitsu S S. Okitsu S: Molecular programming of B cell memory. In: *Nat Rev Immunol* 12(1) (2011), S. 24–34
- [115] MCMICHAEL, AJ: The urban environment and health in a world of increasing globalization: issues for developing countries. In: *Bull World Health Organ* 78 (2000), Nr. 9, S. 1117–26
- [116] MELLOUK S, Druilhe P Berbiguier N-Danis M. Mazier D D. Mazier D: In vitro and in vivo results suggesting that anti-sporozoite antibodies do not totally block *Plasmodium falciparum* sporozoite infectivity. In: *N Engl J Med* 315(10) (1986), S. 648
- [117] MILLER LH, Marsh K Doumbo O. Baruch DI D. Baruch DI: The pathogenic basis of malaria. In: *Nature* 415 (2002), S. 673–9

- [118] MOIR S, Malaspina A Wang W-DiPoto AC O Shea MA Roby G Kottitil S Arthos J Proschan MA Chun TW Fauci A. Ho J J. Ho J: Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. In: *J Exp Med* 205(8) (2008), S. 1797–805
- [119] MORASSIN B, Berry A Magnaval J. Fabre R R. Fabre R: One year’s experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. In: *Am J Trop Med Hyg* 66(5) (2002), S. 503–8
- [120] MORDMUELLER B, Lagler H Chakravarty S-Ishizuka AS Lalremruata A Gmeiner M Campo JJ Esen M Ruben AJ Held J Calle CL Mengue JB Gebru T Ibanez J Sulyok M James ER Billingsley PF Natasha KC Manoj A Murshedkar T Gunasekera A-Eappen AG Li T Stafford RE Li M Felgner PL Seder RA Richie TL Sim BK Hoffman SL Kreamsner P. Surat G G. Surat G: Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. In: *Nature* 42 (2017), Nr. 7642, S. 445–449
- [121] MORDMULLER, B: New medicines for malaria. In: *Wien Klin Wochenschr* 122 Suppl 1 (2010), S. 19–22
- [122] MORDMULLER B, Greutelaers B Esen M-Mewono L Treut C Murbeth RE Chilengi R Noor R Kilama WL Imoukhuede EB Imbault N Leroy O Theisen M Jepsen S Milligan P Fendel R Kreamsner PG Issifou S. Szywon K K. Szywon K: Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambarene, Gabon. In: *Vaccine* 28(41) (2010), S. 6698–703
- [123] MOTA MM, Rodriguez A.: Migration through host cells: the first steps of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. In: *Cell Microbiol* 6(12) (2004), S. 1113–8
- [124] MUELLENBECK MF, Amulic B Epp A-Fenyo D Busse CE Esen M Theisen M Mordmueller B Wardemann H. Ueberheide B B. Ueberheide B: Atypical and classical memory B cells produce Plasmodium falciparum neutralizing antibodies. In: *J Exp Med* 210(2) (2013), S. 389–99
- [125] MURRAY CJ, Lim SS Andrews KG-Foreman KJ Haring D Fullman N Naghavi M Lozano R Lopez A. Rosenfeld LC L. Rosenfeld LC: Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. In: *The Lancet* Lancet 379 (9814) (2012), S. 413–31
- [126] NARDIN EH, McGregor IA Bryan J. Nussenzweig RS R. Nussenzweig RS: Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria. In: *Science* 206(4418) (1979), S. 597–9
- [127] NDUGWA RP, Mueller O Jasseh M-Sie A Kouyate B Greenwood B Becher H. Ramroth H H. Ramroth H: Comparison of all-cause and malaria-specific mortality from two West African countries with different malaria transmission patterns. In: *Malar J* 7:15 (2008), S. doi: 10.1186/1475–2875–7–15

- [128] NDUNGU FM, Coulcher J Nduati E-Couper E Macdonald DW Ng D Langhorne J. Cadman ET E. Cadman ET: Functional memory B cells and long-lived plasma cells are generated after a single *Plasmodium chabaudi* infection in mice. In: *PLoS Pathog* 5(12):e1000690 (2009)
- [129] NDYOMUGYENYI R, Clarke S. Magnussen P P. Magnussen P: Diagnosis and treatment of malaria in peripheral health facilities in Uganda: findings from an area of low transmission in south-western Uganda. In: *Malar J* 6 (2007), S. 39
- [130] N'GUESSAN R, Akogbeto M Rowland M. Corbel V V. Corbel V: Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. In: *Emerg Infect Dis* 13(2) (2007), S. 199–206
- [131] NKOGHE D, Gonzalez JP Leroy E. Akue JP J. Akue JP: Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic rural Gabonese populations. In: *Malar J* 10(1) (2011), S. 33–36
- [132] NWANYANWU OC, Ziba C Luby SP-Mount DL Franco C Nyasulu Y Chitsulo L. Redd SC S. Redd SC: Validity of mother's history regarding antimalarial drug use in Malawian children under five years old. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90(1) (1996), S. 66–8
- [133] OEUVRAY C, Gras-Masse H-Bottius E Kaidoh T Aikawa M Filgueira MC Tartar A Druilhe P. Bouharoun-Tayoun H H. Bouharoun-Tayoun H: Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. In: *Blood* 84 (1994), Nr. 5, S. 1594–602
- [134] OEUVRAY C, Rogier C-Trape JF-Jepsen S Druilhe P. Theisen M M. Theisen M: Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. In: *Infect Immun* 68 (2000), Nr. 5, S. 2617–20
- [135] OFFEDDU V, Marsh K-Matuschewski K. Thathy V V. Thathy V: Naturally acquired immune responses against *Plasmodium falciparum* sporozoites and liver infection. In: *Int J Parasitol* 42(6) (2012), S. 535–48
- [136] OHRT C, Sutamihardja MA Tang D Kain K. Purnomo: Impact of microscopy error on estimates of protective efficacy in malaria-prevention trials. In: *J Infect Dis* 186(4) (2002), S. 540–6
- [137] OKIRO EA, Reyburn H Idro R Berkley JA Snow R. Al-Taiar A A. Al-Taiar A: Age patterns of severe paediatric malaria and their relationship to *Plasmodium falciparum* transmission intensity. In: *Malar J* doi: 10.1186/1475-2875-8-4 (2009)

- [138] O'MEARA WP, Mwangi TW Okiro EA Peshu N Snow RW Newton CR Marsh K. Bejon P P. Bejon P: Effect of a fall in malaria transmission on morbidity and mortality in Kilifi, Kenya. In: *Lancet* 372 (2008), Nr. 9649, S. 1555–62
- [139] O'MEARA WP, Steketee R Greenwood B. Mangeni JN J. Mangeni JN: Changes in the Burden of Malaria in sub-Saharan Africa. In: *Lancet Infect Dis* 10(8) (2009), S. 545–555
- [140] OMUMBO JA, Hay SI Snow R. Guerra CA C. Guerra CA: The influence of urbanisation on measures of Plasmodium falciparum infection prevalence in East Africa. In: *Acta Trop* 93 (2005), Nr. 1, S. 11–21
- [141] PAYNE, D: Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. In: *Bull World Health Organ* 66(5) (1988), S. 621–6
- [142] PENNY MA, Bever CA Sauboin C Galactionova K Flasche S White MT Wenger EA Van de Velde N Pemberton-Ross P Griffin JT Smith TA Eckhoff PA Muhib F Jit M Ghani A. Verity R R. Verity R: Public health impact and cost-effectiveness of the RTS,S/AS01 malaria vaccine: a systematic comparison of predictions from four mathematical models. In: *Lancet* S0140-6736(15)00725-4 (2015)
- [143] PERKINS DJ, Davenport GC Kempaiah P Hittner JB Ong'echa J. Were T T. Were T: Severe Malarial Anemia: Innate Immunity and Pathogenesis. In: *Int J Biol Sci* 7(9) (2011), S. 1427–1442
- [144] PEYROT, Bernard: Incidences écologiques, anthropiques et paléoécologiques sur l'évolution des forêts du Gabon. In: *Les Cahiers d'Outre Mer* 1-2 (n° 241-242) (2008), S. 111–144
- [145] PHILLIPS RE, Warrell DA Lee SH Karbwang J Warrell MJ White NJ Swasdichai C Weatherall D. Looareesuwan S S. Looareesuwan S: The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. In: *Q J Med* 58(227) (1986), S. 305–23
- [146] PIERCE SK, Miller L.: World Malaria Day 2009: what malaria knows about the immune system that immunologists still do not. In: *J Immunol* 182(9):5171-7 (2009)
- [147] PLANCHE T, Kombila M Engel K Faucher JF Ngou-Milama E Kremsner P. Krishna S S. Krishna S: Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. In: *Am J Trop Med Hyg* 65 (2001), Nr. 5, S. 599–602
- [148] PLANCHE T, Kombila M Engel K Faucher JF Ngou-Milama E Kremsner P. Krishna S S. Krishna S: Comparison of methods for the rapid laboratory

- assessment of children with malaria. In: *Am J Trop Med Hyg* 65(5) (2001), S. 599–602
- [149] PLEASS RJ, Stevenson L Hviid L. Moore SC S. Moore SC: Immunoglobulin M: Restraint of Inflammation and Mediator of Immune Evasion by *Plasmodium falciparum* Malaria. In: *Trends Parasitol* 15 (2015), S. 1471–4922
- [150] PLUESS B, Lengeler C Sharp B. Tanser FC F. Tanser FC: Indoor residual spraying for preventing malaria. In: *Cochrane Database Syst Rev* 14;(4) (2010), S. CD006657
- [151] POON LL, Ma EH Chan KH Chow LM Abeyewickreme W Tangpukdee N Yuen KY Guan Y Looareesuwan S Peiris J. Wong BW B. Wong BW: Sensitive and inexpensive molecular test for *falciparum* malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. In: *Clin Chem* 52(2) (2006), S. 303–6
- [152] PORTUGAL S, Sohn H Kone Y Wang J Li S Skinner J Virtaneva K Sturdevant DE Porcella SF Doumbo OK Doumbo S Kayentao K Ongoiba A Traore B Sanz I Pierce SK Crompton P. Tipton CM C. Tipton CM: Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. In: *Elife* doi: 10.7554/eLife.07218 (2015)
- [153] PRUDENCIO M, Mota M. Rodriguez A A. Rodriguez A: The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. In: *Nat Rev Microbiol* 4(11) (2006), S. 849–56
- [154] RICHARD-LENOBLE D, Chandenier J Gay F Billiault X Nguiri C Martz M Boyer F Bauzou M. Kombila M M. Kombila M: Malaria in Gabon. 2. Evaluation of the qualitative and quantitative prevalence of parasites in the total school and preschool population of the country. In: *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 80(3 Pt 2) (1987), S. 532–42
- [155] RICHARD-LENOBLE D, Gendrel D. Kombila M M. Kombila M: Epidemiology of parasitic diseases, hypereosinophilia, IgE from tropical and European parasitological origins. In: *Bull Acad Natl Med* 194(3) (2010), S. 561–2; discussion 562–4
- [156] RICHIE TL, Parekh F. ; BARRETT ADT, Stanberry L. (Hrsg.): *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*. Elsevier, 2009 (chapter 65). – 1309–1364 S.
- [157] RIECKMANN KH, Beaudoin RL Cassells JS Sell K. Carson PE P. Carson PE: Letter: Sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of *Plasmodium falciparum*. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68 (1974), Nr. 3, S. 258–9
- [158] ROMAÏNS, Jules: *Knock ou le Triomphe de la medecine*. Comedie des Champs-Elysees, 1923

- [159] SABBATANI S, Manfredi R. Fiorino S S. Fiorino S: The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? In: *Braz J Infect Dis* 14(3) (2010), S. 299–309
- [160] SABCHAREON A, Ouattara D Attanath P Bouharoun-Tayoun H Chantavanich P Foucault C Chongsuphajsiddhi T Druilhe P. Burnouf T T. Burnouf T: Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. In: *Am J Trop Med Hyg* 45(3) (1991), S. 297–308
- [161] SCHERF A, Riviere L. Lopez-Rubio JJ J. Lopez-Rubio JJ: Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. In: *Annu Rev Microbiol* 62 (2008), S. 445–70
- [162] SCHOLZEN A, Plebanski M. Minigo G G. Minigo G: Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. In: *Trends Parasitol* 26(1) (2010), S. 16–25
- [163] SHAPIRO, HM: *Practical Flow Cytometry*. Bd. 4. Aufl. Wiley-Liss, New York, 2003
- [164] SHIFF CJ, Premji Z. Minjas J J. Minjas J: The ParaSight-F test: a simple rapid manual dipstick test to detect *Plasmodium falciparum* infection. In: *Parasitol Today* 10 (1994), Nr. 12, S. 494–5
- [165] SIMPSON JA, Collins WE Jeffery GM White N. Aarons L L. Aarons L: Population dynamics of untreated *Plasmodium falciparum* malaria within the adult human host during the expansion phase of the infection. In: *Parasitology* 124 (2002), Nr. Pt 3, S. 247–63
- [166] SINCLAIR D, Isba R Lalloo D. Donegan S S. Donegan S: Artesunate versus quinine for treating severe malaria. In: *The Cochrane Library* 6 (2012), S. CD005967
- [167] SOE S, Roussillon C Aye KS Druilhe P. Theisen M M. Theisen M: Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. In: *Infect Immun* 72 (2004), Nr. 1, S. 247–52
- [168] SOTIRIADES: Attempts at serotherapy in malaria. In: *Greek Med* 19 (1917), S. 27–28
- [169] STANISIC DI, McCallum FJ Michon P King CL Schoepflin S Gilson PR Murphy VJ Anders RF Mueller I Beeson J. Richards JS J. Richards JS: Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. In: *Infect Immun* 77(3) (2009), S. 1165–74
- [170] STEVENSON L, Jeppesen A Laursen E Rowe JA Craig A Streicher W Barfod L Hviid L. Huda P P. Huda P: Investigating the function of Fc -specific binding of IgM to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediating erythrocyte rosetting. In: *Cell Microbiol* 17(6) (2015), S. 819–31

- [171] STEVENSON MM, Riley E.: Innate immunity to malaria. In: *Nat Rev Immunol* 4(3) (2004), S. 169–80
- [172] STEWART CC, Stewart S.: Four color compensation. In: *Cytometry* 38(4) (1999), S. 161–75
- [173] STOKES J 3RD, Shindell S. Noren J J. Noren J: Definition of terms and concepts applicable to clinical preventive medicine. In: *J Community Health* 8 (1982), Nr. 1, S. 33–41
- [174] STOUTE JA, Owuor BO Mibei EK Opollo MO Waitumbi J. Odindo AO A. Odindo AO: Loss of red blood cell–complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. In: *J Infect Dis* 187(3) (2003), S. 522–5
- [175] STRICKER K, Jepsen S Oeuvray C Theisen M. Vuust J J. Vuust J: Conservation and heterogeneity of the glutamate-rich protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of *Plasmodium falciparum*. In: *Mol Biochem Parasitol* 111 (2000), Nr. 1, S. 123–30
- [176] STRUIK SS, Riley E.: Does malaria suffer from lack of memory? In: *Immunol Rev* 201 (2004), S. 268–90
- [177] STURM A, van de Sand C Regen T Retzlaff S Rennenberg A Krueger A Pollok JM Menard R Heussler V. Amino R R. Amino R: Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. In: *Science* 313(5791) (2006), S. 1287–90
- [178] SULLIVAN DJ JR, Goldberg D. Gluzman IY I. Gluzman IY: *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. In: *Science* 271 (1996), Nr. 5246, S. 219–22
- [179] SULLIVAN RT, Fontana MF Feeney ME Jagannathan P Boyle MJ Drakeley CJ Ssewanyana I Nankya F Mayanja-Kizza H Dorsey G Greenhouse B. Kim CC C. Kim CC: FCRL5 Delineates Functionally Impaired Memory B Cells Associated with *Plasmodium falciparum* Exposure. In: *PLoS Pathog* 11(5):e1004894 (2015)
- [180] SYLLA EH, Kremsner P. Kun JF J. Kun JF: Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(6) (2000), S. 652–6
- [181] TAKASHIMA E, Tsuboi T. Morita M M. Morita M: Vaccine candidates for malaria: what’s new? In: *Expert Rev Vaccines* 11 (2016), Nr. 1-3
- [182] TANGYE SG, Tarlinton D.: Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. In: *Eur J Immunol* 39(8) (2009), S. 2065–75
- [183] TATEM AJ, Hay S.: Measuring urbanization pattern and extent for malaria research: a review of remote sensing approaches. In: *J Urban Health* 81 (2004), Nr. 3, S. 363–76

- [184] TEDROS AG, Awa Marie Coll-Seck Matthew C. L. Matthew C. Lynch: *Global Malaria Action Plan*. <http://www.rbm.who.int/keyfacts.html>. Version: 2008
- [185] THEISEN M, Brunstedt K Follmann F-Bredmose L Israelsen H Madsan SM Druilhe P. Soe S S. Soe S: A plasmodium falciparum GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. In: *Vaccine* 22 (2004), S. 1188–1198
- [186] THEISEN M, Oeuvray C Thomas AW-Vuust J Danielsen S Jepsen S Druilhe P. Soe S S. Soe S: The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. In: *Infect Immun* 66 (1998), Nr. 1, S. 11–7
- [187] THEISEN M, Toure-Balde A Soe S Corradin G Koram KK Kurtzhals JA Hviid L Theander T-Akanmori B Ndiaye M Druilhe P. Dodoo D D. Dodoo D: Selection of glutamate-rich protein long synthetic peptides for vaccine development: antigenicity and relationship with clinical protection and immunogenicity. In: *Infect Immun* 69 (2001), Nr. 9, S. 5223–9
- [188] TILLER T, Yurasov S Tsuiji M Nussenzweig MC Wardemann H. Meffre E E. Meffre E: Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. In: *J Immunol Methods* 329 (2008), S. 112–124
- [189] TINTO H, Sorgho H Valea I Tahita MC Kabore W Kiemde F Lompo P Ouedraogo S Derra K Ouedraogo F Ouedraogo JB Ballou WR Cohen J Guerra Y Heerwegh D Jongert E Lapierre D Leach A Lievens M Ofori-Anyinam O Olivier A Vekemans J Agnandji ST Lell B Fernandes JF Abossolo BP Kabwende AL Adegnika AA Mordmueller B Issifou S Kremsner PG Loembe MM Bache E Alabi A Owusu-Agyei S Asante KP Boahen O Dosoo D Asante I Yidana Z Anim J Adeniji E-Yawson AK Kayan K Chandramohan D Greenwood B Ansong D Agbenyega T Adjei S Boateng HO Rettig T Sylverken J Sambian D Badu-Prepah A Kotey A Buabeng P Paintsil V Enimil A Hamel MJ Kariuki S Oneko M Odero C Otieno K Awino N Muturi-Kioi V Omoto J Sang T Odhiambo S Laserson KF Slutsker L Otieno W Otieno L Otsyula N Gondi S Ochola J Okoth G Mabunde DC Wangwe A Otieno A Oyieko J Cowden J Ogutu B Njuguna P Marsh K Akoo P Kerubo C Maingi C Bejon P Olotu A Chilengi R Tsofa B Lang T Gitaka J Awuondo K Martinson F Hoffman I Mvalo T Kamthunzi P Nkomo R Tembo T Tegha G Chawinga C Banda T Khan S Mwambakulu S Mzembe E Sacarlal J Aide P Madrid L Mandjate S Aponte JJ Bulu H Massora S Varela E Macete E Alonso P Lusingu J Gesase S Malabeja A Abdul O Mahende C Liheluka E Lemnge M Theander TG Drakeley C Mbwana J Olomi R Mmbando B Abdulla S Salim N Mtoro A Ahmed S Hamad A Kafuruki S Minja R Tanner M Maganga M Mdemu A Gwandu C Mohammed A Kaslow D Leboulleux D Savarese B Schellenberg D. D'Alessandro U U. D'Alessandro U: Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa:

- final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. In: *Lancet* 386(9988) (2015), S. 31–45
- [190] TRAPE JF, Zoulani A.: Malaria and urbanization in central Africa: the example of Brazzaville. Part II: Results of entomological surveys and epidemiological analysis. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81 Suppl 2 (1987), S. 10–8
- [191] UNITED NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS: *World Population Prospects, the 2010 Revision*. <http://esa.un.org/unpd/wpp/Excel-Data/population.htm>. Version: June 2010. – 18.06.2017
- [192] UNIVERSITY OF OXFORD: *MAP: Malaria Atlas Project*. <http://www.map.ox.ac.uk/>. Version: 11 2015. – 18.06.2017
- [193] VERHAGE DF, Bousema JT Hermsen CC van Gemert GJ van der Meer JW Sauerwein R. Telgt DS D. Telgt DS: Clinical outcome of experimental human malaria induced by Plasmodium falciparum–infected mosquitoes. In: *Neth J Med* 63(2) (2005), S. 52–8
- [194] VERLE P, Lieu TT Yen PT Coosemans M. Binh LN L. Binh LN: ParaSight-F test to diagnose malaria in hypo-endemic and epidemic prone regions of Vietnam. In: *Trop Med Int Health* 1 (1996), Nr. 6, S. 794–6
- [195] VIHINEN, M: How to Define Pathogenicity, Health, and Disease? In: *Hum. Mutat.* 38 (2017), Nr. 2, S. 129–136
- [196] VIKSTROM I, Tarlinton D.: B cell memory and the role of apoptosis in its formation. In: *Mol Immunol* 48(11) (2011), S. 1301–6
- [197] WAHLGREN M, Udomsangpetch R Perlmann P. Carlson J J. Carlson J: Why do Plasmodium falciparum–infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes? In: *Parasitol Today* 5(6) (1989), S. 183–5
- [198] WEISS, C: *Basiswissen Medizinische Statistik*. Bd. 4. Auflage. Springer Medizin Verlag, 2008
- [199] WEISS GE, Kayentao K Ongoiba A Doumbo S Doumtabe D Kone Y Dia S Guindo A Traore A Huang CY Miura K Mircetic M Li S Baughman A Narum DL Miller LH Doumbo OK Pierce SK Crompton P. Traore B B. Traore B: The Plasmodium falciparum-Specific Human Memory B Cell Compartment Expands Gradually with Repeated Malaria Infections. In: *PLoS Pathog* 6(5) (2010), S. e1000912
- [200] WEISS GE, Li S Traore B Kayentao K Ongoiba A Hernandez JN Doumbo OK Pierce SK Branch OH Crompton P. Clark EH E. Clark EH: A Positive Correlation between Atypical Memory B Cells and Plasmodium falciparum transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. In: *PLoS One* 6(1) (2011), S. e15983

- [201] WEISS GE, Li S Walsh LA Moir S Traore B Kayentao K Ongoiba A Doumbo OK Pierce S. Crompton PD P. Crompton PD: Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. In: *J Immunol* 183(3) (2009), S. 2176–82
- [202] WHO: The Preamble of the Constitution of the World Health Organization. In: *Bull. World Health Organ.* 80 (1948), Nr. 12, S. 982
- [203] WHO: The Ottawa Charter for Health Promotion. (1986)
- [204] WHO: *WHO Gender, health and Malaria*. http://www.who.int/gender/documents/gender_health_malaria.pdf. Version: 2007. – 18.06.2017
- [205] WHO: *Malaria case management: operations manual.*, 2009. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598088_eng.pdf
- [206] WHO: *World Malaria Report 2010*. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalariareport2010.pdf. Version: 2010. – 18.06.2017
- [207] WHO: The global prevalence of anaemia in 2011. In: *World Health Organization* ISBN: 978 92 4 156496 0 (2011)
- [208] WHO: Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. WHO reference number: WHO/NMH/NHD/MNM/11.1 (2011)
- [209] WHO: *World Malaria Report 2011*. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf. Version: 2011. – 18.06.2017
- [210] WHO: *World Health Statistics*. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2013_Full.pdf. Version: 2013. – 18.06.2017
- [211] WHO: *World Malaria Report 2014*. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf?ua=1. Version: 2014. – 18.06.2017
- [212] WHO: *World Malaria Report 2015*. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/wmr2015-without-profiles.pdf?ua=1>. Version: 2015. – 18.06.2017
- [213] WHO, REGIONAL OFFICE FOR EUROPE: Health promotion : a discussion document on the concept and principles : summary report of the Working Group on Concept and Principles of Health Promotion, Copenhagen, 9-13 July 1984. (1984)
- [214] WILDLING E, Kremsner PG Brandts C Jenne L Wernsdorfer W. Winkler S S. Winkler S: Malaria epidemiology in the Province of Moyen Ogooué, Gabon. In: *Trop Med Parasitol* 46(2) (1995), S. 77–82

- [215] WILSON, ML: Malaria Rapid Diagnostic Tests. In: *Clin Infect Dis* 54(11) (2012), S. 1637–41
- [216] WILSON ML, Arinaitwe E Arevalo-Herrera M Chery L Ferreira MU Ndiaye D Mathanga DP Eapen A. Krogstad DJ D. Krogstad DJ: Urban Malaria: Understanding its Epidemiology, Ecology, and Transmission across Seven Diverse ICEMR Network Sites. In: *Am J Trop Med Hyg* 93(3 Suppl) (2015), S. 110–23
- [217] WYKES MN, Good M.: What really happens to dendritic cells during malaria? In: *Nat Rev Microbiol* 6(11) (2008), S. 864–70
- [218] YAMAUCHI LM, Snounou G Sinnis P. Coppi A A. Coppi A: Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. In: *Cell Microbiol* 9(5) (2007), S. 1215–22
- [219] YEO TW, Tjitra E Gitawati R Kenangalem E Piera K Granger DL Lopansri BK Weinberg JB Price RN Duffull SB Celermajer DS Anstey N. Lampah DA D. Lampah DA: Relationship of cell-free hemoglobin to impaired endothelial nitric oxide bioavailability and perfusion in severe falciparum malaria. In: *J Infect Dis* 200(10) (2009), S. 1522–9
- [220] YONE CL, Luty A. Kremsner PG P. Kremsner PG: Immunoglobulin G isotype responses to erythrocyte surface-expressed variant antigens of Plasmodium falciparum predict protection from malaria in African children. In: *Infect Immun* 73(4) (2005), S. 2281–7
- [221] ZINOECKER S, Skinner J Rogosch T Waisberg M Schickel JN Meffre E Kayenta K Ongoiba A Traore B Pierce S. Schindler CE C. Schindler CE: The V gene repertoires of classical and atypical memory B cells in malaria-susceptible West African children. In: *J Immunol* 194(3) (2015), Nr. 929-39

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Tropenmedizin unter Betreuung von Prof. Dr. Peter Kreamsner durchgeführt.

Die Konzeption der Studie und ihrer Folgestudie erfolgte durch PD Dr. Benjamin Mordmüller, Dr. Hedda Wardemann (PhD), Dr. Matthias Müllenbeck, Dr. Selidji Agnandji und Dr. Saadou Issifou (PhD). Die Konzeption und praktische Umsetzung der Probengewinnung und Datenerhebung erfolgte eigenständig durch mich.

Sämtliche Versuche wurden von mir unter Anleitung und in Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Müllenbeck durchgeführt.

Die statistische Auswertung sowie die Daten-Recherche erfolgten eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Bei der Korrektur des Manuskripts haben mich PD Dr. Benjamin Mordmüller und Dr. Matthias Müllenbeck unterstützt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.