Malariapigment Hemozoin und die funktionelle Hemmung von Monozyten

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

BIOCHEMIE

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dr. Evelin Schwarzer

geb. am 01.10.1956 in Großenhain

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

eingereicht am: 16.06.1999

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. H. Schirmer
2. Prof. Dr. P. Kremsner

Datum des öffentlichen Vortrages: 02.05.2000

Zusammenfassung

Malariapigment Hemozoin wird üblicherweise als nicht-toxische, hochmolekulare, parasitäre Speicherform des nicht abgebauten, toxischen Häms aus dem Wirtszell-Hämoglobins betrachtet. Unaufgereinigtes Pigment, wie wir es im infizierten Erythroyzten finden und wie es nach Schizontenruptur freigesetzt wird, kann man als die "natürliche Diät" ansehen, die Makrophagen in Malaria-infizierten Wirten aufnehmen. Nach Aufnahme in den Makrophagen persistiert Hemozoin in den Lysosomen und wird nicht abgebaut. Das Häm-abbauende Enzym, die Häm-Oxygenase wird nicht induziert. Hemozoin ist eine potente Quelle für Radikale, woraus Lipoperoxide und davon abgeleitete Hydroxyaldehyde,wie 4-Hydroxynonenal resultieren . 4-Hydroxynonenal in Konzentrationen, wie sie in Hemozoin-beladenen Monozyten nachgewiesen wurden, hemmen die Proteinkinase C. In immunopräzipitierter Proteinkinase C aus Hemozoin-haltigen Makrophagen wurden ProteinkinaseC-Hydroxynonenal-Komplexe nachgewiesen. Die Hemmung der Proteinkinase C (und anderer bisher nicht untersuchter Enzyme und Prozesse) durch Hydroxynonenal könnte die Hemozoineffekte auf den 'oxydativen burst' und die Phagozytose erklären. Der Phorbolester-induzierte 'oxydative burst' ist irreversibel gehemmt in Monozyten, die entweder Hemozoin oder aber Hemozoin-haltige, infizierte Erythrozyten phagozytiert haben. Die Hemmung der NADPH-Oxydase, das für den 'oxydativen burst' verantwortliche Enzym, durch intrazelluläres Hemozoin, sollte beträchtlich zur 'burst'-Hemmung beitragen. Monozyten phagozytieren Hemozoin-haltige, infizierte Erythrozyten oder isoliertes Hemozoin , sind danach jedoch unfähig, erneut zu phagozytieren, wie es Monozyten nach Phagozytose und Verdau von nicht-infizierten Erythrozyten physiologischerweise tun.

Schließlich ist die Expression von Membranantigenen, die für die Immunantwort von Bedeutung sind, in Hemozoin-haltigen Monozyten vermindert. Die Induktion des für die Präsentation externer Antigene verantwortlichen Histokompatibilitätskoplexes (MHC) Klasse II durch Interferon-gamma ist in Hemozoin-beladenen Monozyten aufgehoben. Sowohl das'Interzelluläre Adhäsionsprotein 1'(CD54) als auch p150,95 Integrin (CD11c) sind in Hemozoin-haltigen Monozyten vermindert Oberflächen-exprimiert. Trotz der verschiedenen funktionellen Einschränkungen sind Hemozoin-beladene Phagozyten vital.

Bei Plasmodium-falciparum-Malaria enthält ein hoher Anteil von Gewebsmakrophagen und zirkulierender Monozyten und Leukozyten beträchtliche Mengen Hemozoin. Wichtige Funktionen, wie 'oxydativer burst', Phagozytose und die Expression von MHC Klasse II, sind in Hemozoin-beladenen Phagozyten gestört. Es scheint deshalb gerechtfertigt, die Hemozoin-Beladung als wichtigen Faktor in der gestörten Immunantwort bei der P.falciparum-Malaria zu betrachten.

Abstract

Malaria pigment hemozoin is generally considered to be a non-toxic, high-molecular-weight, parasitic storage form of undigested,toxic, host-hemoglobin-heme.Crude pigment, as present in infected erythrocytes and shed after schizont rupture, may be considered the 'natural diet' ingested by macrophages in malaria-infected hosts. After ingestion by macrophages hemozoin persists in the lysosomes without being degraded. The heme-degrading enzyme, the heme-oxygenase, is not induced. Hemozoin is a powerfull source of radicals that generates lipoperoxides and derived, toxic hydroxyaldehydes such as 4-hydroxynonenal. High concentrations of 4-hydroxynonenal, which have been detected in hemozoin-fed macrophages, inhibit protein kinase C. Complexes between hydroxynonenal and protein kinase C have been detected in immunoprecipitated protein kinase C from hemozoin-fed macrophages. Hydroxynonenal-mediated inhibition of protein kinase C (and of other as yet unidentified enzymes and processes) may explain hemozoin-mediated effects on oxidative burst and phagocytosis. The phorbol ester-eliceted oxidative burst is irreversibly suppressed in monocytes fed with hemozoin or hemozoin-containing, infected erythrocytes. The inhibition of NADPH-oxidase, the enzyme responsible for oxidative burst, by ingested hemozoin should considerably contribute to burst inhibition. Monocytes avidly ingest infected hemozoin-containing erythrocytes or isolated hemozoin but are unable to repeat the phagocytic cycle as monocytes do after phagocytosis and digestion of non-infected erythrocytes. Finally , the expression of membrane antigens involved in the immune response is decreased in hemozoin-loaded monocytes. The induction of the major histocompatibility complex (MHC) class II by interferon-gamma, that is responsible for presentation of external antigens, is abrogated in hemozoin-loaded monocytes. The intercellular adhesion molecule 1 (CD54) as well as the p150,95 integrin (CD11c) are decreased on the surface of monocytes containing hemozoin. Despite multiple functional impairments, hemozoin-loaded phagocytes remain alive.

In Plasmodium-falciparum malaria large portions of resident macrophages and circulating monocytes and leukocytes contain massive amounts of hemozoin. Important functions like oxidative burst, phagocytosis and the expression of MHC class II are severely impaired in hemozoin-fed phagocytes. It seems therefore likely that hemozoin loading may play an important role in the impairment of the immune response seen in P.falciparum malaria.

Schlagwörter:

Malaria,Hemozoin,Phagozytose,Immunsuppression

Keywords:

malaria,hemozoin,phagocytosis,immune suppression

Gliederung

I. Zusammenfassung der publizierten Forschungsergebnisse

1. Thematik

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Der asexuelle Parasiten-Zyklus

2.2. Das Malariapigment Hämozoin

2.3. Zur Rolle peripherer Monozyten bei der Malaria

3. Methodische Grundlagen und Neuentwicklungen

3.1. Zellen und Hämozoin

3.2. Quantifizierung von Häm

3.3. Hämfreisetzung aus Lysosomen

4. Hämozoin und die Phagozytenfunktion

4.1. Die Phagozytose von parasitierten Erythrozyten in vitro und die Persistenz von Hämozoin im Monozyten. Die Aktivität der Häm-Oxygenase

4.2. Die Hemmung der Phagozytose durch intrazelluläres Hämozoin

4.3. Die Hemmung des 'oxydativen burst' durch intrazelluläres Hämozoin

4.4. Die Hemmung der Interferon-induzierten Expression von MHC Klasse II

4.5. Die Hemmung der Expression von ICAM-1 und CD11c

4.6. Vitalität der Hämozoin-beladenen Monozyten

5. Molekulare Targets für Hämozoin

5.2. Die Protein Kinase C

5.1. Die NADPH-Oxydase

6. Molekulare Mechanismen der Hämozoin-Effekte

6.1. Die Lipidperoxydation

6.2. Die Bildung von 4-Hydroxynonenal und Hydroxynonenal-Addukten

6.3. 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE)

7. Einordnung der Ergebnisse in die gegenwärtige Malaria-Forschung

8. Referenzen

8.1. Eigenzitate

8.2. Fremdzitate

II. Publizierte Forschungsergebnisse

I. Zusammenfassung der publizierten Forschungsergebnisse

1. Thematik

Das Ausbleiben eines wirksamen Impfstoffes gegen den Malariaparasiten und der weltweite Anstieg der Resistenz des Parasiten und des Vektors gegen herkömmliche und bezahlbare Antimalariamittel und Insektizide erklärt aus gesundheitspolitischer Sicht das Wiederaufleben des Interesses an der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Malaria in den letzten Jahren.

Das Hauptaugenmerk richtet sich dabei auf Plasmodium falciparum, den virulentesten der vier humanpathogenen Malariaerreger. Die lebensbedrohlichen Komplikationen der Malaria, Cerebralmalaria, 'respiratory distress syndrome' und Malaria-Anämie, werden durch die Infektion mit P. falciparum ausgelöst und kosten jährlich wenigstens 2 Millionen Menschen das Leben.

Der Notwendigkeit eines besseren Verständnisses der Pathophysiologie der Malaria wird in der Grundlagenforschung Rechnung getragen. Neben der Aufklärung des Parasiten-Genoms nehmen Arbeiten zur Biochemie und Zellbiologie des Plasmodium und zur Wechselwirkung des Parasiten mit dem Immunsystem des Menschen einen wichtigen Platz ein.

Das Monozyten/Makrophagen-System stellt die 'first line of defense' bei der Malariainfektion dar. Infizierte Erythrozyten und freie Parasitenformen werden erkannt und phagozytiert. Periphere Monozyten und residente Makrophagen Malariaerkrankter sind dementsprechend angefüllt mit infizierten Erythrozyten und Malariapigment. Die Kapazität des retikulo-endothelialen Systems für als 'fremd'erkannte Erythrozyten ist sehr groß, wie man in der Fava-Krise sehen kann, bei der innerhalb von 2 Tagen 50-75 % aller peripheren Erythrozyten aus dem Blut entfernt werden. Umso erstaunlicher ist es, daß eine permanente, niedrige Parasitämie im peripheren Blut der Bewohner endemischer Gebiete nachweisbar ist. Eine Funktionseinschränkung der Phagozyten, ausgelöst durch den Parasiten bzw. dessen Produkte schien naheliegend.

Tatsächlich wurden nach initial hohen Plasma-Neopterin-Spiegeln und hoher Fc-Rezeptor-Expression auf Milzzellen bei Erstinfektion mit Plasmodium ein Absinken beider

Funktionsparameter von Phagozyten proportional zur Dauer der Infektion und bei wiederholten Infektionen festgestellt (Brown et al.,1990; Ho et al.,1990). Im Gegensatz dazu sprachen erhöhte Plasma-TNF-Spiegel bei an Malaria Erkrankten eher für eine hohe Monozytenaktivität (Kwiatkowski et al.,1990).

Das Anliegen meiner Arbeit ist die Beschreibung des Funktionszustandes der Monozyten nach Phagozytose von Plasmodium falciparum oder seines Häm-Ablagerungsproduktes Hämozoin, beide natürliche Phagozytose-Targets für den Monozyten während der Infektion.

Zur Erleichterung der Lektüre werden im Abschnitt 2 einige grundlegende Fakten zur Malaria, sowie der themenrelevante Kenntnisstand zur Malaria-Immunologie kurz zusammengefaßt. Im Abschnitt 3 werden diejenigen methodische Grundlagen vorgestellt, die entweder für das Grundverständnis der Ergebnisse wesentlich sind, wie die Beschreibung der Zell-Modelle, oder die von mir selbst entwickelte und eigenständig publizierte Methode der auf Chemilumineszenz-basierenden Häm-Analyse. Für die breite Palette der ansonsten angewandten und für die biologische Fragestellung stark modifizierten Methoden soll auf meine Originalarbeiten verwiesen werden.

Die Ergebnisse zu den Einschränkungen im Häm-Abbau, der Phagozytose, dem 'oxydativen burst' und der Antigen-Präsentation im ansonsten vitalen Monozyten werden im Abschnitt 4 vorgestellt. Die Funktionseinschränkungen der Zelle werden im Abschnitt 5 auf Hämozoin-bedingte Defekte der NADPH-Oxydase und der Protein Kinase C zurückgeführt.

Im Abschnitt 6 werden molekulare Mechanismen des Hämozoins, die zur Modifikation der Enzyme und ihrem Aktivitätsverlust führen, diskutiert. Der zusammenfassende Abschnitt 7 schließlich ordnet die Ergebnisse des Autors in die aktuelle Malariaforschung ein.

Der Leser wird in den Überschriften der Abschnitte durch Nummernangaben auf die relevanten, wissenschaftlichen Originalarbeiten des Autors verwiesen, welche im Abschnitt 8.1. unter diesen Nummern verzeichnet und im Kapitel II komplett angefügt wurden

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Der asexuelle Parasiten-Zyklus

Durch den Stich der Anopheles-Mücke gelangt der Malaria-Parasit, das einzellige Plasmodium, als Sporozoit in die Blutbahn des Menschen. Der Sporozoit dringt sofort in den Hepatozyten ein, um den Attacken des Immunsystems des Wirtes zu entgehen. Hier vermehrt er sich intrazellulär und prägt einen Phänotyp aus, der ihn nach Verlassen des Hepatozyten befähigt, die eigentliche Wirtszelle, den Erythrozyten zu befallen. Der aus dem Hepatozyten freigesetzte Merozoit wird in einem Endozytose-ähnlichen Prozeß in den Erythrozyten aufgenommen und beginnt seinen 48 Stunden währenden asexuellen intraerythrozytären Vermehrungszyklus, an dessen Ende 16-32 neue Merozoiten die Wirtszelle verlassen, um in neue Erythrozyten einzudringen. Während dieser 48 Stunden durchläuft der Parasit morphologisch gut abgrenzbare Entwicklungsstadien. In den ersten 18-24 Stunden erscheint er als in das erythrozytäre Zytosol eingebetteter Ring, was ihm seinen Namen gab. Er beginnt seine eigene Plasmamembran und die ihn umgebende Erythrozytenmembran für einen regen Stoffaustausch mit der Wirtszelle umzustrukturieren und baut seine 'food vacuole' auf, in der Aufnahme und Verdau von Hämoglobin stattfinden werden. Nach 18-24 Stunden tritt der Parasit in eine regere mRNA- und Proteinsynthese ein und baut nun in seinen 'food vacuoles' intensiv Wirtszellhämoglobin ab. Er wird ab jetzt als reifer Trophozoit bezeichnet und ist vom Ringstadium abgrenzbar durch eine Reihe neu auf der Erythrozytenmembran exprimierter Parasiten-Antigene und die Präsenz des braunen pseudokristallinen Malariapigments (Hämozoin), dem Hämablagerungsprodukt des Parasiten. Vielfältige Stoffwechselprozesse sichern die Synthese der Membran für den wachsenden Parasiten.

Während die aus dem Globinabbau des Hämoglobins stammenden Aminosäuren sofort für die eigene Proteinsynthese wiederverwendet werden, kann der Parasit die Hämkomponente nicht abbauen, da ihm die Häm-Oxygenase-Aktivität fehlt, die in Eukarionten gemeinhin den Häm-Abbau zu Biliverdin unter Freisetzung von CO und freiem Eisen katalysiert. Das in erheblichen Mengen beim Hämoglobinabbau freigesetzte Häm wäre jedoch zytotoxisch für den Parasiten (Fitch et al., 1982), so daß er evolutionär erfolgreich die Strategie der Ablagerung von Häm in unlöslicher Form entwickelt hat. Häm wird als monomeres

Ferriprotoporphyrin-Hydroxid (Brémard et al.,1993) oder aber als polymeres β-Hämatin (Slater et al.,1991; Bohle et al., 1997) dicht gepackt als Pseudokristall in den 'food vacuoles' des Trophozoiten abgelagert und verbleibt in den 'food vacuoles' bis während der Kernteilung nach 36 Stunden (Schizogonie, deren Resultat der Schizont ist) die Fusion der 'food vacuoles' zu einer einzigen großen Residual-Vacuole erfolgt, die sämtliches Hämozoin einschließt (Olliaro und Goldberg,1995). Diese Vacuole wird spontan freigesetzt und rupturiert, wenn der reife Schizont 48 Stunden nach Infektion des Erythrozyten aufplatzt und die infektionsfähigen Merozoiten herausschleudert. Die bei der Vakuolenruptur freigesetzten 'residual bodies' enthalten neben aggregiertem Hämin eine Anzahl angelagerter Komponenten (Lipide, Phospholipide, Proteine) parasitären oder Wirts-Ursprungs. Jeweils zum Zeitpunkt der Schizontenruptur tritt beim Wirt einer der charakteristischen Fieberschübe auf.

Es sind die Blut-Stadien des Plasmodiums, Ringform, Trophozoit, Schizont, Merozoit und die 'residual bodies', die während der Malariainfektion mit dem Monozyten/ Makrophagen- System in Wechselwirkung treten. Die Ringform ist durch Hämozoin-Freiheit und eine begrenzte Anzahl von Oberflächen-Antigenen, der Trophozoit und der Schizont hingegen sind durch Hämozoin-Präsenz und eine stark modifizierte Erythrozyten-Oberfläche durch das massenhafte Auftreten von 'Malaria-Antigenen' charakterisiert.

2.2. Das Malariapigment Hämozoin

Das als Malaria-Pigment bezeichnete Hämozoin wird allgemein als die inerte, nicht toxische hochmolekulare Speicher- oder besser Ablagerungsform des Häms aus dem Abbau des Hämoglobins der Wirtszelle betrachtet.

Während der 48-stündigen Entwicklung des Plasmodium im Erythrozyten baut der Parasit die Globinketten von etwa 75% des Wirtszell-Hämoglobins proteolytisch in seiner sauren 'food vacuole' ab. Dabei wird eine Flut von Häm (ca.15 mM) freigesetzt, welches aufgrund seiner Wechselwirkung mit Membran und DNA für den Parasiten letal wäre. Die 'Entgiftung' des Häms ist für den Parasiten überlebenswichtig, nur fehlt ihm scheinbar, wie

erwähnt, die in Eukarionten für diese Aufgabe zuständige Häm-Oxygenase-Aktivität. Deshalb entwickelte der Malariaparasit in der Evolution die Strategie, Häm als unlösliche pseudo-kristalline Aggregate in seiner 'food vacuole' abzulagern. Wenn etwa 20 Stunden nach Eindringen in die Wirtszelle der Hämoglobinabbau in der 'food vacuole' des Parasiten ein entsprechendes Ausmaß erreicht hat, werden diese Häm-'Kristalle' lichtmikroskopisch als dunkelbraune Aggregate, als das Malaria-Pigment oder Hämozoin, in den reifen Trophozoiten sichtbar.

Obwohl zahlreiche frühe Studien Ferriprotoporphyrin IX als wichtigen Bestandteil des Hämozoins beschrieben haben (Deegan und Maegraith,1956), existieren bis heute widersprüchliche Ansichten zum Kristallisationsprozeß und zur exakten molekularen Struktur des Eisenporphyrins im Hämozoin. In der Regel wurde isoliertes Hämozoin diversen recht unterschiedlichen Extraktionsmethoden unterworfen, ehe die analytische Arbeit am dennoch einheitlich als Hämozoin bezeichneten Material zum Teil widersprüchliche Resultate zu Tage förderte (review 8). Modernere Arbeiten, die natives Hämozoin mit Resonanz-Raman Mikrospektrometrie, elektronenparamagnetischer Resonanzspektrometrie und magnetischer Suszeptibilitätsmessung untersuchten, beschreiben Ferriporphyrin IX als high-spin Monomer von Eisen(III)-protoporphyrin-Hydroxid (Brémard et al.,1993). Während des Globinabbaus in der sauren 'food vacuole' müssen also voluminöse, sperrige Substituenten die räumliche Isolierung der Häm-Moleküle sichern, um die μ-oxo-Dimerisierung des Häms zu verhindern, die sonst zwangsläufig bei der Autoxidation von Hämoglobin auftritt. Als Abstandhalter kämen die Nicht-Häm-Bestandteile im nativen Hämozoin in Frage, d.h. die 65 Gewichts-prozent Protein, die 5,9 Gewichtsprozent Kohlenhydrat und 0,1 Gewichtsprozent Lipid und Nukleinsäuren. Als 'Apoprotein' im Hämozoin wurden bisher sowohl partiell proteolytisch abgebaute Globinketten des Hämoglobins (Goldie et al.,1990) als auch vom Parasiten neu synthetisierte Eisen- bzw. Häm-bindende Proteine (Ashong et al.,1989) beschrieben. Die Frage bleibt, ob diese Bestandteile des Hämozoins von funktioneller Relevanz während seiner Entstehung sind oder ob sie nachträglich oder sogar artifiziell während der Hämozoinisolierung dank ihrer hohen Affinität zum Häm angelagert wurden. Die kürzlich von Sullivan et al. (1996) gefundenen Histidin-reichen Proteine HRP I und II im Plasmodium geben Anlaß zu der Vermutung, daß es sich dabei um funktionell notwendige Häm-bindende Proteine handelt. Ihr Nachweis im Hämozoin steht jedoch noch aus.

Im Gegensatz zu Brémards monomeren high-spin-Ferriporphyrin-Modell als

Grundstruktur des Hämozoins steht das allgemein akzeptierte Strukturmodell, demzufolge das zentrale high-spin Eisen eines Porphyrinringes mit der Carboxylgruppe des Propionylrestes des nächsten Porphyrinringes eine schwache Bindung eingeht und so Hämscheibe über Hämscheibe stapelnd das Längenwachstum von β-Hämatin erfolgt. Kristallografische und spektroskopische Untersuchungen an synthetischen β-Hämatin lassen Wasserstoffbrücken zwischen den freien Propionylresten benachbarter Häminketten vermuten (Bohle et al., 1997). Im Unterschied zum zuvor beschriebenen Kristallisationsmodell, in dem Häm-bindende Proteine die Rolle von Kristallisationskeimen übernehmen, könnten im 'Bohle-Modell' Carboxylsäuren und/oder Aminosäuren in der 'food vacuole' des Parasiten die Solubilisierung und den Phasenübergang von Hämatin zu β-Hämatin bewirken (Adams et al.,1996).

Die Aufklärung der Struktur und des Syntheseprozesses von Hämozoin sind von großem Interesse, da Hämozoin in drei grundlegenden Prozessen der Malaria eine zentrale Rolle eingeräumt wird und man sich therapeutische Ansätze verspricht.

Erstens wird Hämozoin in Verbindung gebracht mit den 'Malaria-Toxinen', welche im Wirt die Produktion endogener Pyrogene, wie TNF, MIP-1α und MIP-1β induzieren und damit die periodischen Fieberschübe verursachen (Sherry et al.,1995) aber auch die Komplikationen der Malaria auslösen, wie die TNF-verursachte Hemmung der Erythropoiese als Ursache der Malaria-Anämie (Martiney, personal communication). Hämozoin selbst induziert in isolierten Monozyten/Makrophagen die Bildung der Cytokine und nimmt Einfluß auf die Thermoregulation. Bislang gibt es keinen klaren experimentellen Beleg, daß das Merozoiten-Membran-assoziierte Glycosylphosphatidylinositol-Toxin, welches in Makrophagen die Zytokinfreisetzung induziert (Schofield et al, 1993), bei der Hämozoin-bedingten Zytokin-Produktion eine Rolle spielt .

Zweitens ist Hämozoin die Überlebensstrategie des Parasiten. Herkömmliche Anti-Malariamittel wie Chlorochin behindern die Anlagerung von Häm an wachsendes Hämozoin durch Bindung an Häm und setzen zusätzlich Häm aus Hämozoin frei. Die erhöhte freie Hämkonzentration führt zur Lyse der Membran im Schizonten und zur Hemmung der Proteasen des Parasiten (Pandey und Chauhan, 1998).

Drittens, und dieses wird Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein, ist Hämozoin nicht nur inertes Ablagerungsprodukt von Häm sondern ein wirksames Mittel des Parasiten, die

Immunantwort des Wirtes zu kontrollieren.

2.3. Zur Rolle peripherer Monozyten bei der Malaria

Die Zell-vermittelte Immunität in nicht-immunen Malariapatienten wird von peripheren, zirkulierenden Blut- und residenten Gewebsphagozyten getragen, diese Phagozyten stellen die vorderste Front in der Immunabwehr des Menschen gegen den Parasiten dar. Sie erkennen den parasitierten Erythrozyten als fremd und attackieren ihn mit den ihnen eigenen und gegen jeden Fremdkörper gerichteten Abwehrprozessen: die Produktion von Sauerstoffradikalen für die extrazelluläre Schädigung bzw.Vernichtung und die Phagozytose (Allison and Eugui,1983; Perrin et al.,1982). Im peripheren Blut im Tiermodell und in Gewebsschnitten bei P. falciparum-Malaria wurden sogenannte 'crisis-forms' der Parasiten nachgewiesen. Das sind verklumpte, aggregierte intraerythrozytäre Parasiten, die durch das Einwirken von Radikalen morphologisch beschädigt wurden (Ockenhouse et al., 1984). Zudem wurden bei P. falciparum-Malaria im peripheren Blut, in Milz, Niere, Lunge, Leber, im Knochenmark und im Cerebralendothel Phagozyten gefunden, die vollgestopft mit parasitierten und nicht-parasitierten Erythrozyten waren (Pongponratn et al.,1987; Aikawa et al.,1980). Die Phagozytose von Parasiten läßt sich leicht durch den Gehalt an dunkelbraunen Hämozoinkristallen im Monozyten nachweisen. Hämozoin gelangt bei der Phagozytose von Hämozoin-haltigen Trophozoiten oder ’residual bodies’ als natürliche Phagozytosetargets in den Monozyten.

Hinweise über den Aktivitätszustand des Monozyten/Makrophagen-Systems im Menschen kommen vor allen aus klinischen Studien. Im Serum von Patienten mit akuter Malaria wurden erhöhte Konzentrationen von Syntheseprodukten aktivierter Phagozyten, wie Sauerstoffradikale (Descamps-Latscha et al., 1987) und Zytokine (Urquhart, 1994) gefunden.

Die Produktion von TNF-α und IL-1 durch aktive Makrophagen und Monozyten wird als Startpunkt der Entzündungsreaktion bei der Malaria betrachtet. TNF induziert Fieber, die Produktion von Akut-Phasen-Proteinen, die Aktivierung von Monozyten und Neutrophilen, die Expression der endothelialen Leukozyten-Adhäsionsmoleküle, die Proliferation von Lymphozyten, führt zur Produktion von IL-1 und IL-8 (Chemotaxin für

Neutrophile) durch Makrophagen , Monozyten und Endothelzellen und triggert die Degranulation der Neutrophilen und den 'oxydativen burst'. IL-1 induziert die hepatozytären Akut-Phasen-Proteine, endotheliale Zellmembranrezeptoren für Neutrophile, beeinflußt die Endothelpermeabilität und löst die spezifische T- und B-Zell-Proliferation nach Antigenkontakt aus. Schließlich induzieren IL-1 und TNF gemeinsam die Produktion des 'platelet aggregation factor' (PAF) und chemotaktisch aktiver Arachidonsäuremetaboliten im Endothel, was zur Akkumulation von Neutrophilen und zur erhöhten Koagulationsbereitschaft führt. Die aufgeführten TNF- bzw. IL-1-abhängigen Prozesse fördern die Vernichtung des Parasiten durch das Immunsystem des Wirtes, werden allerdings bei überschießender Aktivität erheblich zum Pathomechanismus der Malariakomplikationen beitragen.

Die Phagozytenaktivität ist bei Erstinfektion mit Malaria am höchsten und sinkt mit jeder weiteren Infektion ab (Brown et al., 1990), was wir mit der Akkumulation von Hämozoin in den Phagozyten und der damit verbundenen Funktionseinschränkung in Zusammenhang bringen. Im Tiermodell wurde der gleiche Verlauf der Immunantwort gefunden (Jayshree et al., 1989).

Jüngere Studien zur Zytokinfreisetzung aus Hämozoin-beladenen Monozyten demonstrieren die vermehrte Freisetzung von TNF-α, MIP 1-α und -β und IL-1β, aber auch von IL-10 und IL-12 nach Hämozoinphagozytose (Pichyangkul et al., 1994, Sherry et al., 1995; Mordmüller et al., 1998) und korrelieren den Schweregrad der Erkrankung mit der Hämozoinbeladung peripherer Leukozyten.

Monozyten/ Macrophagen sind befähigt, parasitäre Antigene über den MHC Klasse II-Komplex zu präsentieren. Eine beeinträchtigte zelluläre Immunantwort während der Malaria läßt sich aus der verminderten T-Zell-Proliferation in Malaria-infizierten Mäusen ableiten (Greenwood et al., 1971). In alten Studien von Warren und Weidanz (1976) wurde eine Hemmung der akzessorischen Funktion der Milz-Makrophagen/Monozyten von akut Malaria-Infizierten beobachtet, was zur Hemmung der T-Zell-Proliferation beitragen könnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Literatur reichlich Daten zur veränderten Immunantwort während der akuten Malaria-Erkrankung liefert, welche sehr komplexe Prozesse erfassen, die zweifelsohne von großem Wert für die Beschreibung der Krankheit

sind. Studien auf zellulärer Ebene hingegen sind rar, nur diese jedoch sind aus meiner Sicht geeignet, die komplizierte und komplexe Wechselwirkung zwischen Parasit und Wirt grundlegend zu erhellen, um gezielt und erfolgreich zu intervenieren.

3. Methodische Grundlagen und Neuentwicklungen

3.1. Zellen und Hämozoin (1-11)

Plasmodien

Für sämtliche Arbeiten mit Plasmodium falciparum wurden die Stämme FCR-3 und Palo Alto aus in vitro-Kulturen genutzt. Diese Parasiten dienten als Ausgangsmaterial sowohl für die Reife-Separation der Parasiten über Percoll als auch für die Isolierung des Malariapigmentes Hämozoin nach Lyse der Trophozoiten oder Schizonten im hypotonen Puffer. Bei der Isolierung und Vorbereitung des Hämozoins für die Phagozytose durch den Monozyten

wurde Wert darauf gelegt, Material zu gewinnen, welches dem nach Schizontenruptur freigesetzten Hämozoin physikalisch und chemisch nahe kommt und während der Malariainfektion der Phagozytose unterliegt. Um eine gute Modellsubstanz für 'in vivo-Hämozoin' zu erzeugen, wurde auf die in der Regel angewandte Extraktion von Proteinen und Lipiden durch Behandlung des Hämozoins mit Proteasen und SDS verzichtet. Die Lagerung erfolgte in Gegenwart von Radikalfängern und unter Sauerstoffausschluß.

Makrophagenmodell

Voruntersuchungen an der relativ differenzierten humanen monozytären Zellinie THP-1 zur Intaktheit der Zellfunktionen ergaben eine unzureichende Stimulierbarkeit des 'oxidativen burst'. Auch die langzeitige Behandlung der Zellen mit niedrigdosierten Phorbolester konnte, entgegen der in der Literatur beschriebenen Effekte, eine nur sehr

mäßige 'burst'-Kapazität induzieren. Für Studien von monozytären Prozessen, die von Peroxydationen beeinflußt werden, schieden diese Zellen mithin als Modell aus. Alle übrigen getesteten humanen monozytären Zell-Linien wichen in ihren funktionellen Eigenschaften stärker von den Monozyten ab als THP-1 und kamen somit nicht in Betracht.

Alle Untersuchungen wurden deshalb ausschließlich an Monozyten durchgeführt, die aus dem peripheren Blut des Menschen isoliert wurden. Um ruhende, gut stimulierbare, Lymphozyten-arme und wenig Oberflächen-modifizierte Monozytenpräparationen zu erhalten kamen nach initaler Routineseparation von peripheren mononukleären Zellen schließlich 3 Methoden zur Anwendung: 1. Separation über diskontinuierliche Dichte-Gradienten. 2. Dichtetrennung unter hypertonen Bedingungen. 3. Separation basierend auf Oberflächen-Antigen- Erkennung.. Die Monozyten wurden in vitro in Suspension auf Teflon-dishes oder adherent im Serum-freien Medium bis zu 7 Tagen im 5% CO2/Luft-Gemisch im Zell-Inkubator bei 37 °C gehalten. Diese Zellen dienten uns als Modell für zirkulierende periphere Monozyten bzw. residente Makrophagen des Menschen. Adhärente, in vitro aus Monozyten entstandene Makrophagen wie auch resuspendierte Monozyten zeigten die gleichen Hemmeffekte durch Hämozoin, lediglich die Basisiaktivität des 'burst' war in adhärenten Zellen geringer. Da keine qualitativen Unterschiede zwischen suspendierten und adhärenten Zellen nachweisbar waren, wird in der vorliegenden Arbeit generell von Monozyten gesprochen, ungeachtet der Tatsache, daß die Ergebnisse an beiden Zellqualitäten gewonnen wurden, wie im Detail in den Originalarbeiten ausgeführt wird. An dieser Stelle sei auf die in den Originalarbeiten beschriebenen neuen Protokolle zur Langzeit-Kultivierung der Monozyten in Suspension verwiesen (1,6,9).

3.2. Quantifizierung von Häm (4)

Für die Quantifizierung von Häm-haltigen Substanzen oder Zellen, wie Hämozoin oder Erythrozyten, entwickelte ich eine auf Luminol-abhängiger Lumineszenz basierende quantitative Analysetechnik für Häm. Häm katalysiert die Übertragung eines Elektrons von dem relativ stabilen tert-Butylhydroperoxid auf Luminol, welches dadurch zum

chemilumineszenten Luminol-Anion wird. Die gemessenen Chemilumineszenz verhält sich proportional zur Menge des eingesetzten Häms. Dieses Verfahren zeichnet sich durch hohe Empfindlichkeit und Zeitökonomie aus. Außerdem ermöglicht es die präzise Quantifizierung von Häm-haltigen Verbindungen im Monozyten nach ihrer Phagozytose und zwar unabhängig von der Integrität der phagozytierten Zelle, was einen erheblichen analytischen Vorteil gegenüber der zeitaufwendigen mikroskopischen Analytik bietet, die nur weitestgehend intakte intramonozytäre Erythrozyten zu erfassen vermag. Die Empfindlichkeit der Analytik erlaubt es ebenfalls, die exakte Anzahl der adhärenten Monozyten im 'well' zu bestimmen, da der Cytochromgehalt die Quantifizierung über Häm gestattet. Deshalb wurde die Lumineszenz-Methode für die Quantifizierung der Phagozytose von Erythrozyten oder Hämozoin durch die Monozyten adaptiert.

3.3. Hämfreisetzung aus Lysosomen

An dieser Stelle sei auf die in den Originalarbeiten beschriebenen neuen Protokolle zur Immunpräzipitation der PKC des Monozyten (7) und zur Isolierung von Lysosomen aus Hämozoin-beladenen Monozyten und der Freisetzung von Häm aus isolierten monozytären Lysosomen (10) verwiesen.

4. Hämozoin und Phagozytenfunktion

Hämozoin wird als inert und unschädlich betrachtet, solange es eingeschlossen in der parasitären 'food-vacuole' vorliegt. Es gibt jedoch keine Studien zu Hämozoin-bedingten Schäden in der letzten Entwicklungsphase des Parasiten. Hämozoin wird bei der Phagozytose von Trophozoiten oder nach Schizontenruptur als 'residual body' in den Phagozyten aufgenommen.

4.1. Die Phagozytose von parasitierten Erythrozyten in vitro und die Persistenz von Hämozoin im Monozyten. Zur Rolle der Häm-Oxygenase (1,10)

Humane Monozyten phagozytieren unter Kulturbedingungen genauso gut wie in vivo parasitierte Erythrozyten und freies Hämozoin. Das Ausmaß der Phagozytose wird vom Reifegrad des Parasiten bestimmt. Ein Monozyt phagozytierte etwa 4 Ringe oder 10 reife Trophozoiten oder Hämozoin in einer Menge, die 10 Erythrozyten, bezüglich des Häm-Gehaltes entspräche.

Der Verdau der aufgenommenen parasitierten Erythrozyten wurde mit dem von nicht-parasitierten Kontroll-Erythrozyten verglichen, die entweder durch oxidativen Stress (Diamid-Inkubation) Oberflächen-modifiziert und nach Opsonisierung via Fc-oder Komplement-Rezeptor (CRI) phagozytiert wurden oder durch anti-D IgG-Opsonisierung ausschließlich über den Fc-Rezeptor aufgenomen wurden. Der Verdau der phagozytierten Erythrozyten bzw. des Hämozoins wurde als Häm-Abbau gemessen.

Im Unterschied zu beiden Kontrollen, deren Häm-Abbau erwartungsgemäß sehr schnell war (90% der Erythrozyten wurden mit einer Halbwertszeit von unter 30 min abgebaut, 10% mit

10 h), zeigen parasitierte Erythrozyten in Abhängigkeit von ihrem Hämozoin-Gehalt eine viel langsamere Abbaukinetik. So wurden reife Hämozoin-haltige Trophozoiten nur zu 21% mit einer Halbwertszeit von 1 h abgebaut, während 79% des Häms über 2 Tage nahezu stabil im Monozyt verblieb. Phagozytiertes isoliertes Hämozoin wurde im Monozyten abgelagert ohne nachweisbaren Häm-Abbau. Hämozoin-freie Ringe hingegen unterliegen in etwa der gleichen Abbau-Kinetik wie Kontroll-Erythrozyten.

Offensichtlich ist Hämozoin im Monozyten nicht abbaubar, obwohl Trophozoiten oder isoliertes Hämozoin 20 min nach ihrer Phagozytose regulär mit dem Lysosom fusionieren und das Hämozoin für wenigstens 7 Tage im Lysosom nachweisbar bleibt (Confocal-Mikroskopie, unveröffentlicht, Schwarzer). Der von einigen Parasiten genutzte 'escape'-Mechanismus, der intrazellulären Verdauung durch Hemmung der Fusion zwischen Endo- und Lysosom zu entgehen, spielt für Plasmodium falciparum keine Rolle. Was hindert den Monozyten also am Hämozoinabbau?

Mit Kontroll-Erythrozyten in das Lysosom gelangtes Hämoglobin unterliegt nach

Aktivierung der lysosomalen Protonenpumpe dem proteolytischen Abbau, bei dem Häm in erheblichen Konzentrationen freigesetzt wird, was einerseits das Häm-abbauende Enzym, die Hämoxygenase-1 (HO-1), induziert, und welches andererseits als Substrat der mikrosomalen HO-1 von dieser zu Biliverdin abgebaut wird. Ich unternahm einige Anstrengungen , um vom regulären Abbau abweichende Prozesse in Hämozoin-beladenen Monozyten zu finden.

1. Das Porphyrin im von uns isolierten Hämozoin besteht ausschließlich aus nicht-modifiziertem Häm, was spektrophotometrisch abgesichert wurde. Darüberhinaus erwies sich in vitro solubilisiertes Hämozoin als gutes Substrat für aus Rattenleber isolierte, Co-induzierte, mikrosomale HO-1. Der Nachweis erfolgte über die Messung der HO-1-Aktivität als Syntheserate des Bilirubins. Bilirubin wurde differentialspektrophotometrisch quantifiziert und nach erfolgter Reaktion spektralanalytisch nachgewiesen.

2. Die HO-1 wird in Monozyten 6 h nach Phagozytose von Kontroll-Erythrozyten induziert und erscheint in der mikrosomalen Zellfraktion, nachweisbar im Western blot und im Confocal-Mikroskop mit spezifischen Antikörpern. Diese Induktion unterbleibt vollständig, wenn analoge Häm-Mengen in Form von Hämozoin phagozytiert werden. Auch Trophozoiten sind nicht in der Lage, die HO-1 zu induzieren. Hämozoin-beladene Monozyten können aber sehr wohl die HO-1 exprimieren, wenn ihnen exogenes Häm oder exogen solubilisiertes Hämozoin zugesetzt wird. Hämozoin interferiert mithin nicht mit Induktion und Expression der HO-1.

3. Die fehlende Induktion der HO-1 in Hämozoin-beladenen Monozyten wird offensichtlich durch die ausbleibende Freisetzung von Häm aus Hämozoin verursacht.

In vitro-Studien zur Häm-Freisetzung aus isolierten Hämozoin-haltigen Lysosomen, die aus Monozyten präpariert wurden, die Hämozoin phagozytiert hatten, bestätigten die ausbleibende Häm-Freisetzung. Hingegen wird während der in vitro-Inkubation aus Erythroyzten-haltigen Lysosomen reichlich Häm freigesetzt. Die ausbleibende Freisetzung des Häms aus Hämozoin kann lysosomal bedingt oder Hämozoin-immanent sein.

4. Die Hämozoin-beladenen Lysosomen sind funktionell intakt hinsichtlich ihrer Protonenpumpe, die zur regulären Ansäuerung führt (Confocal-Studie mit DAMP, was sich im sauren Kompartiment anreichert, unpubliziert, Schwarzer) und hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivität. Die an Hämozoin angelagerten Proteine sind 24 h nach

Phagozytose komplett abgebaut (elektrophoretischer Nachweis), trotzdem erfolgt keine Häm-Freisetzung.

5. Die Struktur des Hämozoins selbst sollte für die Stabilität des Hämozoins gegen seinen Abbau verantwortlich zu machen sein. Den Proteinen des Hämozoins scheint keine Bedeutung für die Stabilität des Häm-Kernes zuzukommen. Wie schon im intralysosomalen Protein-Verdau gezeigt, sind Hämozoin-Proteine auch im in vitro-Verdau von Hämozoin in Gegenwart von Cathepsinen, Nukleasen und Carboxypeptidasen unter lysosomalen Bedingungen gut abbaubar. Es gibt auch in vitro bei saurem pH keine Freisetzung von Häm aus Hämozoin, wohl aber aus unter gleichen Bedingungen inkubiertem Hämoglobin. Hämozoin, im Unterschied zu Hämoglobin disaggregiert nicht unter lysosomalen Bedingungen, um Häm freizusetzen, welches das Lysosom verlassen und an der endosomalen HO-1 katabolisiert werden könnte. Die Stabilität des Hämozoins im Lysosom sollte allein den physikalischen Eigenschaften von aggregiertem Häm zuzuschreiben sein, dessen Löslichkeitsprodukt keine Freisetzung von Häm bei leicht saurem pH zuläßt.

Die Intaktheit sämtlicher Häm-Abbauprozesse in Hämozoin-beladenen Monozyten eröffnet die Möglichkeit des Einsatzes von Substanzen, die lysosomal zur Auflösung des Hämozoins führen, was von therapeutischem Wert sein könnte.

4.2. Die Hemmung der Phagozytose durch intrazelluläres Hämozoin (1)

Die Ablagerung von Hämozoin im Lysosom hat für den Monozyten erhebliche funktionelle Konsequenzen. Die initiale Phagozytose von Hämozoin-haltigen Trophozoiten oder von isolierten Hämozoin führte zur Beladung der Lysosomen mit Hämozoin, infolgedessen die Zelle keinen neuen Phagozytose-Zyklus aufnehmen konnte. 24, 48 oder 72 Stunden nach initialer Phagozytose wurden den Monozyten erneut Kontroll-Erythrozyten zugesetzt und die Phagozytose durch Quantifizierung des intramonozytären Häm-Gehaltes bestimmt. Initial zugesetzte Kontroll-Erythrozyten waren nach 24 h komplett abgebaut, und über Fc-und CRI-Rezeptoren wurde die initiale

Phagozytosekapazität von 4 Erythrozyten per Monozyt in jedem weiteren Phagozytosezyklus erreicht. Analog dazu sind Monozyten nach initialer Ring-Phagozytose nach 24 h wieder vollständig Phagozytose-bereit, und nehmen in jedem Zyklus etwa 4 Erythrozyten per Monozyt auf, die sie komplett abbauen. Die Beladung der Monozyten mit Hämozoin im initialen Phagozytosezyklus führt hingegen zum vollständigen Verlust der Phagozytosefähigkeit über den gesamten Untersuchungszeitraum von 72 h ohne Tendenz zur Reversibilität der Funktionseinschränkung. Das heißt nach einmaliger Phagozytose von reifen Malaria-Parasiten ist der Monozyt oder Makrophage weder in der Lage, weitere Malariaparasiten, noch Bakterien, Pilze oder andere Parasiten im Rahmen von Sekundärinfektionen durch Phagozytose zu attackieren. Unsere These wurde aufgegriffen und fand unter Kulturbedingungen Bestätigung (Fiori et al., 1993).

4.3. Die Hemmung des 'oxydativen burst' durch intrazelluläres Hämozoin (1,2)

Die initiale 'burst'- Aktivität des Monozyten ist Ausdruck der Sauerstoffradikal-Freisetzung im Prozess der Phagozytose und kann als Luminol-abhängigen Lumineszenz quantitativ erfaßt werden. Die Phagozytose von Kontroll-Erythrozyten durch die Monozyten wurde von einem 30-minütigen geringen, aber meßbaren Anstieg der Luminol-abhängigen Lumineszenz begleitet, was auf eine geringfügige Sauerstoffradikal-Produktion hinwies. Demgegenüber löste die Phagozytose von Hämozoin eine 6-fach höhere und vergleichsweise langanhaltende (bis zu 2 Stunden) Radikalproduktion aus. Nach dieser Zeit sinkt die Radikalproduktion auf basale Werte. Die massive initiale Radikalbelastung des Monozyten während der Phagozytose von Hämozoin muß als eine wichtige Ursache der intrazellulären Modifikationen, die zum Funktionsausfall der Hämozoin-beladenen Monozyten führen, angesehen werden.

Die Fähigkeit des Monozyten auf Stimulation mit einer erhöhten Sauerstoffradikal-Produktion und -Freisetzung zu antworten, wurde durch Zusatz von diversen löslichen Agonisten überprüft, die zur Monozytenaktivierung führen. Ein gutes Maß für die Kapazität der Zelle zu 'bursten', unabhängig von eventuellen Strukturveränderungen an der

Membran, ist der Phorbolester (PMA)-induzierte burst. Unter Umgehung der Membranprozesse in der Signal-übertragung wird mit Phorbolestern die Protein Kinase C direkt aktiviert, was die maximale Aktivierung der NADPH-Oxydase und damit die Superoxid-Radikal-Produktion zur Folge hat, die als Luminol-abhängige Lumineszenz quantifiziert wurde und um 1-2 Größenordnungen über der des 'initialen bursts' liegt . In den ersten 10 min der Phagozytose war die 'burst'-Kapazität gleich der von ruhenden Monozyten und sank in allen phagozytierenden Monozyten, unabhängig vom phagozytierten Material, kontinuierlich von 30 min bis 4 h nach Phagozytose auf 50% des Ausgangswertes. Während die 'burst'-Kapazität in Monozyten, die Kontroll-Erythrozyten phagozytiert hatten, nach 4 h wieder anstieg, um nach 24 h ihren Ausgangswert von vor der Phagozytose zu erreichen, fiel der PMA-induzierte 'burst' in Hämozoin-beladenen Monozyten bis 12 h nach Phagozytose auf 25% ab und zeigte während 48 h keine Erholungstendenz. Der nahezu vollständige Verlust der Induzierbarkeit des 'burstes' geht einher mit der Unfähigkeit des Hämozoin-beladenen Monozyten, das extrazelluläre Wachstum von Mikroorganismen zu kontrollieren, wie Fiori et al. 1993 in vitro zeigen konnten.

4.4. Die Hemmung der Interferon-induzierten Expression von MHC Klasse II (9)

Eine der immunologischen Funktionen der Monozyten/Makrophagen ergibt sich aus seiner Fähigkeit, Antigene über MHC Klasse II-Moleküle auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Wir überprüften in vitro den Einfluß von Hämozoin auf die Expression von MHC Klasse II auf der Zell-Oberfläche des Monozyten nach geeigneter Stimulation. Der Monozyt phagozytierte im experimentellen Ansatz Hämozoin, Kontrollmonozyten hingegen Latexpartikel oder Erythrozyten. Nach 48-stündiger Stimulation mit Interferon-gamma (γ-IFN) wurde die Expression der MHC Klasse II-Moleküle auf der Zell-Oberfläche mittels Antikörpern im Durchflußzytometer quantifiziert. Während in Monozyten nach Latex- oder Erythrozyten-Phagozytose die MHC II-Expression nach Interferon erwartungsgemäß stark zugenommen hatte, blieb sie in Hämozoin-beladenen Zellen nach γ-IFN-Stimulation basal niedrig. Aufgrund der konstanten Expression anderer Oberflächenmarker können wir ausschließen, daß ein Phagozytose-bedingter Oberflächenverlust die Ursache für das

vollständige Ausbleiben der Stimulierbarkeit der MHC II-Expression nach Hämozoin-Aufnahme in den Monozyten ist. Vielmehr konnten wir mittels quantitativer RT-PCR nachweisen, daß in Hämozoin-beladenen Zellen die Induktion von MHC Klasse II-spezifischer mRNA durch γ-IFN ausblieb. Die Expression der MHC II-spezifischen mRNA lag in γ-IFN-stimulierten Kontroll-Monozyten wenigstens 3-fach höher als in stimulierten Hämozoin-beladenen Zellen. In bakteriellen oder parasitären Erkrankungen sollte die Stimulierbarkeit der Expression von MHC II für die korrekte und effiziente Antigen-Präsentation und die adäquate T_H-Zell-Proliferation von Bedeutung sein, um die Erkrankung und Sekundärinfektionen erfolgreich zu kontrollieren.

Die gefundene deutliche Reduktion der Expressionsmöglichkeit von MHC II durch Interferon in Hämozoin-beladenen Monozyten sollte eine Erklärung liefern für den bei Malaria beobachteten Defekt in der T-Zell-Aktivierung. Die eingeschränkte Funktion der Monozyten als Antigen-präsentierende Zelle während der Malaria könnte Konsequenzen für die Kontrolle der Infektion haben, wie in weiterführenden Experimenten zu zeigen sein wird.

4.5. Die Hemmung der Expression von ICAM-1 und CD11c (12)

Die Expression einer Reihe von Oberflächen-Antigenen des Monozyten, denen Aufgaben in der Phagozytose zukommen, wie CD16 und CD32 (niedrig-affine Fc-Rezeptoren, effektive Bindung von Immunkomplexen), CD64 (hochaffiner Rezeptor für IgG), CD 11b (Rezeptor für Complement iC3b/CR3), CD35 (Rezeptor für Complement C3b und C4b/ CR1) und CD36 (non-class-A scavenger Rezeptor) oder in der Monozyt-Lymphozyt - Wechselwirkung beteiligt sind (MHC Klasse I, CD54 (ICAM-1) und CD11c (p150,95 integrin), wurde in Hämozoin-beladenen Monozyten überprüft.

Hämozoin-abhängige Effekte wurden nur in der Expression von CD54 (ICAM-1) und CD11c (p150,95 integrin) gefunden.

Hämozoin bewirkte in Monozyten die 'down-Regulation' von CD11c auf der Zelloberfläche. CD11c gehört zur den beta-Integrinen und wurde kürzlich als Ligand für ICAM-1 charakterisiert.

In Hämozoin-beladenen Monozyten war die reifungsabhängige Zunahme der Expression von ICAM-1, wie sie in Kontroll-Monozyten beobachtet wurde, vollständig aufgehoben. ICAM-1 trägt als Adhäsionsmolekül zur effizienten Interaktion zwischen der Antigen-präsentierenden Zelle und dem Lymphozyten bei, und verstärkt das Signal des T-Zell-Rezeptors, was eine stärkere Proliferation der T-Zelle zur Folge hat. Die Hämozoin-bedingte niedrige Expression von ICAM-1 im Monozyten könnte eine weitere Erklärung für die mangelhafte T-Zell-Proliferation bei der Malaria darstellen.

Unter dar Annahme einer ähnlich verminderten Expression von ICAM-1 im Endothel nach Hämozoin-Endozytose, würde dies zusätzlich einen wirksamen Hämozoin-bedingten Schutzmechanismus für den Wirt darstellen. Ockenhouse et al. verwiesen 1992 auf die mögliche Rolle von endothelialem ICAM-1 bei der Bindung parasitierter Erythrozyten während der Pathogenese der Cerebralmalaria. Infolge der Störung des Gleichgewichtes zwischen Parasit und Wirt, beispielsweise durch überschießende Zytokinproduktion, wird ICAM-1 vermehrt im Endothel exprimiert und es kommt zum Verstopfen der Kapillaren durch parasitierte Erythrozyten und zur schwer verlaufenden Cerebral-Malaria.

4.6. Vitalität der Hämozoin-beladenen Monozyten (1,8)

Ehe die Ursache für die Hämozoin-bedingte Funktionseinschränkungen behandelt werden, bedarf es der Erklärung, daß die mit Hämozoin beladenen Zellen selbstverständlich vital sind, was aus dem Adhärenz-Verhalten, den stabilen intrazellulären Konzentrationen von ATP und DNA und einer intensiven Protein-de novo-Synthese abgeleitet werden kann. Bis zu 3 Tagen waren keine Anzeichen von Apoptose in Hämozoin-beladenen Monozyten nachweisbar.

5. Molekulare Targets für Hämozoin

Einmal in das Phagolysosom des Monozyten in seiner nativen, nicht aufgereinigten Form aufgenommen, kann Hämozoin für den Monozyten gefährlich werden, es besitzt alle Bestandteile eines potenten Radikalproduzenten: aggregiertes Hämin, ungesättigte Fettsäuren und in Spuren freigesetztes Eisen. Da eine generalisierte, unspezifisch-toxische Wirkung des Hämozoins auf die Zelle wegen der nachgewiesenen Vitalität auszuschließen war, suchte ich nach einer Schädigung oxydationsempfindlicher Enzyme, die eine Schlüsselposition in den gehemmten Stoffwechselwegen Phagozytose, 'burst' und MHC II-Expression einnehmen.

5.1. Die NADPH-Oxydase (6)

Der 'oxydative burst' ist abhängig von der Synthese von Superoxid-Radikalen durch die NADPH-Oxydase (NOX). Das Enzym besteht aus den 3 membranständigen Untereinheiten des Cytochrom b558, welches das aktive Zentrum der NOX enthält. Die NOX wird aktiviert, indem ihre cytosolischen Untereinheiten $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und $p21^{rac}$ als Aktivierungskomplex zur Membran transloziert werden und an Cytochrom b558 binden. Die Phosphorylierung der $p47^{phox}$ durch die Protein Kinase C (PKC) ist in intakten Zellen für den regelrechten Zusammenbau und die Aktivierung der NOX essentiell, kann aber in vitro im Zell-Lysat durch SDS-Aktivierung umgangen werden. Die SDS-stimulierbare NOX-Aktivität wird als maximale NOX-Aktivität definiert und photometrisch gemessen.

Hämozoin bewirkt parallel zum Abfall des PMA-induzierbaren 'burst' die Reduktion der maximalen NOX-Aktivität um 50% in den ersten 2 h nach Phagozytose. Die NOX-Aktivität sank nicht weiter, während der 'oxydative burst' auf 25% der Kontrollaktivität bis 12 h nach Phagozytose abfiel. In Rekonstitutionsexperimenten mit Zellkompartimenten konnte ich die Ursache für den Aktivitätsverlust der NOX einer cytosolischen Untereinheit zuordnen.

Phosphorylierungsexperimente in intakten Monozyten mit (^{32}P)-Orthophosphat oder in

Zellkompartimenten mit (gamma-^{32}P)-ATP ergaben, daß die p47^{phox}-Untereinheit bis 12 h regulär PKC-abhängig phosphoryliert wurde. Zu einem späteren Zeitpunkt ließ sich keine Phosphorylierung mehr nachweisen. Exogene PKC ist jedoch in der Lage, die p47^{phox}-Phosphorylierung vollständig zu rekonstituieren.

Meine Befunde zeigen:

1. Eine schnelle Modifikation an einer cytosolischen Untereinheit durch Hämozoin führt zum fehlerhaften Zusammenbau an der Membran und Aktivitätsverlust der NOX.

2. Diese Schädigung betrifft nicht die Phosphorylierungsstelle der p47^{phox}.

3. Es gibt einen Langzeitdefekt der p47^{phox}-Phosphorylierung in der Zelle, der PKC-bedingt sein sollte.

4. Die zusätzliche Inhibition der PKC durch Hämozoin erklärt die differenten Kinetiken der 'burst'- und NOX-Hemmung.

5.2. Die Protein Kinase C (3,7)

Die Protein Kinase C (PKC) kontrolliert im Monozyten maßgeblich die Aktivität des 'oxydativen burst' und der Phagozytose und spielt bei der Regulation der Expression des MHC Klasse II- Komplexes eine Rolle. Wegen ihrer zentralen Stellung in der Regulation und ihrer Empfindlichkeit gegen Oxydation zogen wir sie als Target für die Hämozoin-Wirkung in Betracht. Die Aktivierung der PKC erfolgt durch intrazelluläre Translokation vom Zytosol zur Membran, ihre Inaktivierung durch proteolytische Spaltung an der Membran.

Ich konnte zeigen, daß die Membran-assoziierte PKC nach nur 30-minütigem Anstieg nach Hämozoin-Phagozytose im Monozyten schnell und irreversibel inaktiviert wurde. Nach einstündiger Hämozoin-Präsenz war nur noch 40% der initial membranständigen PKC nachweisbar und ab 5 h nur noch 20%. Auf diesem Niveau verblieb die membranständige PKC über 24 h ohne Tendenz zum Wiederanstieg. Aus der Phagozytose von Kontroll-Erythrozyten resultierte hingegen eine bedeutend längere initiale Ativierungsphase der PKC mit einem sich anschließenden Aktivitätsabfall über 5 h. Nach

12 h werden die Ausgangswerte der PKC wieder erreicht.

Der Gehalt und die Translozierbarkeit der zytosolische PKC, die als Reservoir für die Aktivierung der PKC in der Zelle aufzufassen ist, blieb über 12 h nach Hämozoin-Phagozytose unverändert und war nach 24 h drastisch reduziert. Der Einsatz von Radikalfängern und Antioxydantien läßt als Ursache für die Verminderung aktiver, membranständiger PKC einen erhöhten Abbau der kontinuierlich translozierten PKC an der Membran vermuten, was durch Radikal-bedingte Modifikationen in den Cystein-reichen Regulationsdomänen der PKC erklärbar ist. Eine artifizielle Modifikation der PKC, wie sie bei Zellaufschluß in Gegenwart von Hämozoin wahrscheinlich wäre, ist durch die Messung der PKC mittels (^{3}H)-Phorbolester in intakten Monozyten ausgeschlossen.

Die Verringerung des aktiven PKC-pools gibt eine gute Erklärung für die Funktionsausfälle in 'burst', Phagozytose und MHC II- Expression des Monozyten nach Hämozoin-Phagozytose.

6. Molekulare Mechanismen der Inhibition durch Hämozoin

Hämozoin mit seinem eisenreichen, kompakten Porphyrinkern, umgeben von angelagerten Lipiden, bietet beste strukturelle Voraussetzungen für die Bildung von Sauerstoffradikalen, zumal im Lysosom Spuren von Eisenionen freigesetzt werden, wie ich im in vitro-Modell-Versuch belegen konnte (weniger als 1% des Gesamteisens im Hämozoin werden initial pro Stunde freigesetzt). Hinzu kommt die vergleichsweise hohe Produktion von Superoxidradikalen während des initial die Hämozoin-Phagozytose begleitenden 'burst'. Via Haber-Weiss-Reaktion können so Hydroxyl-Radikale und Singulett-Sauerstoff entstehen, die zur Lipid-Peroxydation führen.

6.1. Die Lipidperoxydation (1,7,8)

Die antioxydativen Mechanismen des Monozyten sind überlastet und es erfolgt eine überschießende Lipid-Peroxydation, nachdem Hämozoin in den Monozyten aufgenommen wurde. Tatsächlich stieg im Monozyten der Lipoperoxidgehalt auf das 6-fache während der ersten 12 h nach Hämozoin-Phagozytose und blieb über 2 Tage unverändert hoch. Monozyten, die unter gleichen Bedingungen Kontroll-Erythrozyten in vergleichbaren Mengen bezüglich des Häm-Gehaltes phagozytiert hatten, zeigten einen moderaten (2-fachen), transienten Anstieg, der nur bis 12 h nach Phagozytose nachweisbar war. 24 h nach Phagozytose wurde der basale Wert von ruhenden Monozyten wieder erreicht.

Auch in vitro war die Hämozoin in Gegenwart von Wasserstoffperoxid ein potenter Induktor der Lipid-Peroxydation in Erythrozyten-'ghosts' oder Liposomen. Die Lipid-Peroxydation konnte erfolgreich durch Eisenkomplexierung mit Desferrioxamin verhindert werden.

Die Rolle von freiem Eisen bei den Funktionseinschränkungen wird unterstrichen durch die Experimente mit Hämozoinkristallen, von deren Oberfläche Eisen partiell abgereichert wurde. Dieses so behandelte Hämozoin war ein schwächerer Inhibitor des 'oxydativen burst' als natives Hämozoin. Die Entfernung von labil gebundenem Eisen konnte die Hemmung des 'burst' jedoch nicht komplett aufheben. Freies Eisen spielt im Peroxydationsprozess mithin eine potenzierende Rolle, wohingegen das in der Porphyrinstruktur des Hämozoins gebundene Fe^{3+} den größeren Anteil an den Peroxydations-bedingten Hemm-Effekten hat. Es wird also nicht ausreichend sein, Eisen-Komplexbildner für die Aufhebung der Funktionseinschränkung einzusetzen, sondern das Ziel muß die Depolymerisation des Hämozoins sein.

6.2. Die Bildung von 4-Hydroxynonenal und Hydroxynonenal-Addukten (7)

Zwangsläufiges Folgeprodukt der Lipid-Peroxydation von omega-vielfachungesättigten Fettsäuren wie Linol-, Arachidon- oder gamma-Linolensäure in Zellen ist das

4-Hydroxynonenal (4-HNE), welches hochreaktiv an Thiol- oder Aminogruppen bindet und dadurch biochemische Effekte auf enzymatischer, subzellulärer und zellulärer Ebene verursacht.

Hämozoin-Beladung von Monozyten führt folgerichtig nach einem raschen Anstieg in der Konzentration der Lipoperoxide zu einer drastischen Erhöhung des gebildeten 4-HNE. Quantifiziert wurde 4-HNE nach Zellextraktion, Reextraktion nach TLC-Separation und HPLC-Auftrennung. Bei vereinfachter Annahme einer Gleichverteilung des 4-HNE im Monozyten, würden Konzentrationen von 8 µM, 46 µM und 16 µM nach 2, 5 und 12 Stunden der Hämozoin-Präsenz im Monozyten erreicht. Der Referenzwert im ruhenden Monozyten lag bei 1µM und ist repräsentativ für das Gleichgewicht von Synthese und Abbau des 4-HNE in dieser Zelle. Die hohen Werte im Hämozoin-beladenen Monozyten sind erstaunlich, da der stoffwechselmäßig gut an oxydative Belastungen angepaßte Monozyt im allgemeinen in der Lage ist, die mit jeder Phagozytose einhergehende Sauerstoffradikalproduktion und die daraus resultierende Lipid-Peroxydation und 4-HNE-Synthese gut zu kontrollieren. Die Phagozytose von Kontroll-Erythrozyten hebt den HNE-Spiegel in der Zelle tatsächlich nur auf maximal 4 µM an. Es muß an dieser Stelle eingefügt werden, daß die lokalen HNE-Konzentrationen natürlich erheblich höher sein könnten, da HNE aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in der Membran akkumulieren sollte (experimentell nicht belegt).

Eine hohe initiale katabolische Aktivität für HNE von 24 nmol/min/1 Mio Zellen (gemessen als Abnahme des exogen den Monozyten zugesetzten HNE) macht ein alleiniges Überschreiten der Abbaukapazität durch vermehrte 4-HNE-Synthese im Hämozoin-beladenen Monozyten unwahrscheinlich. Vielmehr spricht die Abbaukinetik im Hämozoin-beladenen Monozyten für die zusätzliche Hemmung des HNE-Katabolismus durch Hämozoin, was den 50-fachen Anstieg des HNE-Spiegels in diesen Zellen erklärt. Der schnelle Anstieg des HNE-Spiegels nach Hämozoinphagozytose läuft zeitlich parallel mit der Hemmung des PMA-induzierten 'oxidativen burst' und der Hemmung der PKC im Monozyten.

Ich konnte zeigen, daß HNE konzentrationsabhängig die PKC-Aktivität hemmt, gemessen als Histon-Phosphorylierung im in vitro-assay. Die PKC wurde bei Zusatz von nur 10 nM 4-HNE um 30 % gehemmt, eine Konzentration, die in ruhenden Zellen lokal durchaus zu erwarten ist, was deshalb in der PKC-Regulation unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen dürfte. HNE in Konzentrationen von über 10 µM hemmen die PKC-Aktivität

zu über 95 %. Diese Konzentrationen sind in der oxydativ gestreßten Zelle durchaus plausibel. 4-HNE hat je nach Zelltyp und Konzentration die verschiedensten Auswirkungen auf das Wachstum und die Proliferation von Zellen und auf die Gen-Expression.

Ich konnte erstmals das vermehrte Auftreten von intrazellulären Addukten zwischen PKC und HNE in Hämozoin-beladenen Zellen nachweisen (Immunpräzipitation der PKC und Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern gegen 4-HNE-Histidin/Lysin-Addukte).

Die vergleichsweise höheren Affinität des 4-HNE zur Thiol-Gruppe des Cysteins im Vergleich zu Lysin oder Histidin erlaubt den Schluß, daß in Hämozoin-beladenen Zellen auch die Thiol-Gruppe der PKC mit 4-HNE reagiert. Die PKC besitzt einige für ihre Funktion essentielle Thiolgruppen, die im reduzierten Zustand vorliegen müssen, um die enzymatische Aktivität aufrechtzuhalten. Die von uns in vitro beobachtete Hemmung der PKC durch 4-HNE sollte deshalb durch die Bindung des 4-HNE an diese SH-Gruppen entstehen.

Die von mir beobachtete Addukt-Bildung sollte mithin der Schlüssel zum molekularen Verständnis der PKC-Hemmung im Hämozoin-beladenen Monozyten sein.

6.3. 15-Hydroxyeicosatetraensäure [15-HETE] (11)

Der PMA-induzierte 'oxydative burst' ist 20 min nach Phagozytose von nativem Hämozoin zu 50-60 % gehemmt bezogen auf den Ausgangswert. Die schnelle Hemmung sollte durch einen Bestandteil der Lipidfraktion des Hämozoins ausgelöst werden, da die Phagozytose von delipidierten Hämozoin zu einem langsameren und weniger ausgeprägten Abfall des 'burst' führt .

Die Lipidfraktion des isolierten Hämozoins enthält Derivate der Linolen- und Arachidonsäure, deren Verteilungsmuster typisch für die Häm-katalysiert Oxydation der erythrozytären Membranfettsäuren ist. Die Trennung des 15-HETE-peaks aus der SP-HPLC ergab in der Chiral-Phasen-HPLC eine Gleichverteilung der R- und S-Enantiomere, was die Lipoxygenase-unabhängige Häm-Katalyse unterstreicht. Bei einem Gehalt von 0.24 mmol bioaktiven 15S-HETE per mol Häm im Hämozoin würde eine Hämozoin-

Phagozytose in der Größenordnung von 10 Erythrozyten-Äquivalenten per Monozyt eine intrazelluläre Konzentration von 10 μM ergeben. Ich konnte zeigen, daß eine HETE-Konzentration von 0.8 μM ausreicht, den PMA-induzierten 'burst' in Monozyten zu 40-50% zu hemmen. Mithin sollte das Molekül stromab der PKC in die Signaltransduktion eingreifen. Bei Hämozoin-Phagozytose in die monozytäre Plasmamembran diffundierendes 15-HETE sollte Ausfälle des oxydativen 'burst' verursachen, wie wir sie beschrieben haben.

7. Einordnung der Ergebnisse in die gegenwärtige Malariaforschung

Der Autor beschreibt Hämozoin erstmals als aktiv in die Regulation der Immunabwehr des Wirtes eingreifende Substanz, was den Blickwinkel auf die Rolle von Hämozoin während der Pathogenese der Malaria doch erheblich verändert. Bisher war man der Ansicht, daß es sich bei dem Malariapigment Hämozoin um die inerte, ausschließlich der Ablagerung dienende 'entgiftete' Hämstruktur handelt (Slater, 1992). Hingegen wird der Monozyt durch die erstmalige Phagozytose von Hämozoin (ein Prozess, der während der Malariainfektion ständig abläuft) in vielen seiner immunologischen Funktionen stark eingeschränkt, was zum Verlust der Fähigkeit zur Phagozytose, 'oxydativem burst' und Antigen-Präsentation führt. Mithin hat der Malariaparasit eine weitere erfolgreiche Strategie entwickelt, den Angriffen des Immunsystems des Wirtes zu entkommen.

Das Phänomen der Semiimmunität im endemischen Gebiet, d.h. die Unfähigkeit des Immunsystems bei wiederholten Malariainfektionen eine vollständige Immunität gegen die Malaria aufzubauen, hingegen niedrige periphere Parasitämien bei geringer oder nicht vorhandener Krankheitssymptomatik zuzulassen, wird bisher nicht gut verstanden. Es ist bekannt, daß sich der Parasit im Trophozoiten-Stadium durch Zytoadhärenz am mikrovaskulären Endothel dem Zugriff der zellulären Abwehr entzieht, indem er die Zytokinausschüttung des Wirtes kontrolliert, die zur Induktion der Endothelzell-Rezeptoren führen (Hommel, 1997). Desweiteren wird im Prozess des 'rosetting ' die antigene Oberfläche eines parasitierten Erythrozyten durch die dichte Anlagerung von

nicht-parasitierten Erythrozyten abgeschirmt. Und schließlich sollten repetitive Sequenzen in P. falciparum Oberflächen-Antigenen sowie Sequenzvielfalt in nicht-repetitiven Regionen und Antigen-Varianz von Oberflächenmolekülen dazu beitragen, daß der Parasit dem Inmmunangriff erfolgreich entgeht (Ramasamy, 1998).

Die von mir beschriebenen Funktionseinschränkungen des Hämozoin-beladenen Monozyten/ Makrophagen erklären gut das Versagen des Immunsystems, die Parasiten vollständig zu eliminieren, da erstens die monozytäre Abtötung der Blutstadien eingeschränkt ist, zweitens aber auch die Interaktion zwischen Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen uneffektiv erfolgt.

In der jüngeren Vergangenheit sind Arbeiten erschienen, die Hämozoin als Induktor der Zytokinsynthese des Monozyten verstehen. Besonderes Interesse gilt dabei der erhöhten TNF-alpha-Produktion (Pichyangkul et al.,1994; Mordmüller et al., 1998) und der MIP-1-Synthese (Sherry et al.,1995). Zieht man die Daten zu Zytokin-Spiegeln im Serum von Patienten hinzu, gewinnt man den Eindruck, daß die Monozyten aktivierenden Zytokine und infolgedessen γ-IFN entscheidend zur Pathogenese der Malaria beitragen. Beispielsweise führt eine überschießende γ-IFN- Produktion zur vermehrten Expression von ICAM-1 im Cerebral-Endothel, was zur Anheftung und Aggregation von zirkulierenden infizierten und nicht infizierten Erythrozyten führt und im kausalen Zusammenhang mit der oft letal verlaufenden Cerebral-Malaria steht (Rudin et al., 1997).

Neben der pathogenetischen Rolle des Hämozoins sollten wir seine Wirt-protektive Seite nicht außer acht lassen. Wir verstehen die Einschränkung der Reaktionsbereitschaft des Monozyten durch Hämozoin als 'intelligenten' Schutz des Wirtes durch den Parasiten vor Überreaktivität, die zum Untergang des Wirtes führen würde und evolutionär zur Vernichtung des Parasiten geführt hätte. Mittels Hämozoin kann das Gleichgewicht zwischen Wirt und Parasit hergestellt werden, das zwar die Klärung der Parasitämie durch den Wirt verhindert aber bis auf Ausnahmen im Störungsfall beide Seiten überleben läßt.

In der Literatur werden eine Reihe von Mechanismen beschrieben, wie Mikroorganismen wie Leishmania, Mykobakterium oder Listeria auf molekularer Ebene mit Immunzellen interagieren, um ihre Immunfunktionen zu unterbinden. Wegen ihrer zentralen Stellung bei immunologischen Prozessen ist die PKC häufiger Angriffspunkt der Hemmung (Reiner, 1994). Wir fügen hier einen neuen Mechanismus der Hemmung hinzu, der von

Plasmodium falciparum genutzt wird: die oxydativ durch Hämozoin ausgelöste Modifikation der PKC durch 4-HNE im Monoyzten.

Die Beschreibung der Funktionseinschränkung des Monozyten und der wahrscheinlichen molekularen Mechanismen ergeben zwei therapeutische Ansatzpunkte, die beide die Reduktion des intramonozytären Häm-Gehaltes zum Ziel haben, um die Parasiten durch die Immunabwehr erfolgreicher zu bekämpfen. Erstens bietet sich der Einsatz von Substanzen an, die selektiv in parasitierten Erythrozyten (aufgrund der veränderten Membranpermeabilität) oxydativ wirksam werden. Diese Behandlung würde die Phagozytose zugunsten der Hämozoin-freien Ringformen verschieben und damit zum Erhalt der normalen phagozytären Aktivität führen. Die zweite Strategie baut auf die intralysosomale Auflösung von Hämozoin, was vermutlich zur Regeneration des Monozyten und zur erneuten Funktionsaufnahme führen würde.

8. Referenzen

8.1. Eigenzitate

(1) Schwarzer, E., F.Turrini, D. Ulliers, G. Giribaldi, H. Ginsburg, and P. Arese.1992. Impairment of macrophage functions after ingestion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. J. Exp. Med. 176: 1033-1041.

(2) Turrini, F, E. Schwarzer, and P. Arese. 1993. The involvement of hemozoin toxicity in the depression of cellular immunity. Parasitol. Today 9: 297- 300.

(3) Schwarzer, E., F.Turrini, G. Giribaldi, M. Cappadoro, and P. Arese. 1993. Phagocytosis of P.falciparum malarial pigment hemozoin by human monocytes inactivates monocyte protein kinase C. Biochim. Biophys. Acta 1181: 51-54.

(4) Schwarzer, E., F. Turrini, and P. Arese. 1994. A luminescence method for the quantitative determination of phagocytosis of erythrocytes, of malaria- parasitized erythrocytes and of malarial pigment. Br. J. Haematol. 88: 740-745.

(5) Schwarzer, E., F. Turrini, G. Giribaldi, D. Ulliers, L. Sinauridse, and P. Arese. 1995. Malarial pigment hemozoin, the secrete weapon of Plasmodium falciparum. It. Biochem Soc Trans 6: S4-7.

(6) Schwarzer, E. and P.Arese. 1996. Phagocytosis of malarial pigment hemozoin inhibits NADPH-oxidase activity in human monocyte-derived macrophages. Biochim. Biophys. Acta. 1316: 169-175.

(7) Schwarzer, E., O. Müller, P. Arese, W.G. Siems, and T. Grune. 1996. Increased levels of 4-hydroxynonenal in human monocytes fed with malarial pigment hemozoin. FEBS-Lett. 388:119-122.

(8) Arese, P. and E. Schwarzer. 1997. Malarial pigment (haemozoin): a very active 'inert' substance. Ann. Trop Med Parasitol. 91:501-516.

(9) Schwarzer, E., M. Alessio, D. Ulliers, and P. Arese. 1998. Phagocytosis of malarial pigment, haemozoin, impairs the expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. Infect. Immun. 66:1601-1606.

(10) Schwarzer, E., F. De Matteis, G. Giribaldi, D. Ulliers, E. Valente, and P. Arese. 1999. Hemozoin stability and dormant induction of heme oxygenase in hemozoin-fed monocytes. Molec. Biochem. Parasitol. 100:61-71.

(11) Schwarzer, E.,P. Ludwig, E. Valente, and P. Arese. 1999. 15(S)-hydroxyeicosateraenoic acid (15-HETE), a product of arachidonic acid peroxidation, is an active component of hemozoin toxicity to monocytes. Parassitologia. 411:199-202.

8.2. Fremdzitate

Adams, P.A., Egan, T.J., Ross, D.C., Silver, J., Marsh, P.J. 1996. The chemical mechanism of β-haematin formation studied by Mössbauer spectroscopy. Biochem. J. 318:25.

Aikawa, M., Suzuki, M., Gutierrez, Y. 1980. Pathology of malaria. In Malaria, Vol. 2, ed. Kreier, J.P. 47-102. New York: Academic Press.

Allison, A.C., Eugui, E.M. 1983. The role of cell-mediated immune responses in resistence to malaria, with special reference to oxidant stress. Annu. Rev. Immunol.1:361.

Ashong, J.O., Blench, I.P., Warhurst, D.C. 1989. The composition of haemozoin from plasmodium falciparum. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 83:167.

Baynyal, H.S., Phillips, G., Pfaller, M.A., Krogstad, D.J. 1982. Lysis of plasmodium falciparum by ferriprotoporphyrin IX and a chloroquine-ferriprotoporphyrin IX complex. Antimicrob. Agents Chemother. 21:819.

Bohle, D.S., Dinnebier, R.E., Madsen, S.K., Stephens, P.W. 1997. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malaria late trophozoites by X-ray diffraction. J. Biol. Chem. 272:713.

Brémard, C., Girerd, J.J., Kowalewski, P., Merlin, J.C., Moreau, S. 1993. Spectroscopic investigations of malaria pigment. Appl. Spectrosc 47:1837.

Brown, A.E., Webster, H.K., Teja-Isavadaharm, P., Keeratihakul, D. 1990. Macrophage activation in falciparum malaria as measured by neopterin and interferon-gamma. Clin. Exp. Immunol. 82:97.

Deegan T., Maegraith B.G. 1956. Studies on the nature of malarial pigment (Haemozoin) II. The pigment of the human species, Plasmodium falciparum and P. malariae. Ann. Trop. Med. Parasitol. 50:212.

Descamps-Latscha, B., Lunel-Fabiani, F., Karabinis, A., Druilhe, P. 1987. Genration of reactive oxygen species in whole blood from patients with acute malaria. Parasite Immunol. 9:275.

Fiori, P.L., Rappelli, P., Mirkarimi, S.N., Ginsburg, H., Cappuccinelli, P., Turrini, F. 1993. Reduced microbicidal and anti-tumor activities of human monocytes after ingestion of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. Parasite Immunol. 15:647.

Fitch, C.D., Chevli, R., Banyal, H.S., Phillips, G., Pfaller, M.A., Krogstadt, D.J. 1982. Lysis of plasmodium falciparum by ferriprotoporphyrin IX and a chloroquine-ferriprotoporphyrin IX complex. Antimicrob. Agents Chemother.21:819.

Goldie, P., Roth, E.F., Jr., Oppenheim, J., Vanderberg, J.P. 1990. Biochemical characterization of plasmodium falciparum hemozoin. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43:584.

Greenwood, B.M., Playfair, J.H.L., Torrigiani, G. 1971. Immunosuppression in murine malaria. I. General characteristics.Clin. Exp. Immunol.8:467.

Ho, M., White, N.J., Looareeswan, S., Wattanagoon, Y., Lee, S.M., Walport, M.J., Bunnag, D., Harinasuta, T. 1990. Splenic Fc-receptor function in host defence and anemia in acute plasmodium falciparum malaria. J. Infect. Dis. 161:555.

Hommel M. 1997. Modulation of host cell receptors: a mechanism for the survival of malaria parasites. Parasitology 115Suppl:S45.

Jayshree, R.S., Ganguly, N.K., Sethi, A.K., Mahajan, R.C. 1989. Changes in the superoxide anion generating capacity and respiratory burst enzymes of oeripheral blood monocytes of monkeys during acute Plasmodium knowlesi infection. Parasite Immunol. 11:503.

Kwiatkowski, D., Hill, A.V.S., Sambou,I.1990. TNF-concentrations in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria.Lancet 336:1201.

Mordmüller, B., Turrini, F., Long, H., Kremsner, P.G., Arese, P. 1998. Neutrophils and monocytes from subjects with Mediteranian G6PD variant: effect of Plasmodium falciparum hemozoin on G6PD activity, oxydative burst and cytokine production. Eur. Cytokine Netw. 9:239.

Ockenhouse, C.F., Shulman, S., Shear, H.L.1984. Induction of crisis forms in the human malaria parasite Plasmodium falciparum by γ-interferon-activated monocyte-derived macrophages. J. Immunol.133:1601.

Ockenhouse, C.F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K.E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M., Lobb, R.R. 1992. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. J. Exp. Med.176:1183.

Olliaro, P.L., Goldberg, D.E. 1995. The plasmodium digestive vacuole : Metabolic headquarters and choice drug target. Parasitol. Today 11:294.

Pandey, A.V., Chauhan,V.S. 1998. Heme polymerization by malarial parasite: A potential target for antimalarial drug development. Curr. Sc. 75:911.

Perrin, L.H., Mackey, L.J., Miescher, P.A. 1982. The hematology of malaria in man. Semin.Hematol. 19:70.

Pichyangkul S, Saengkrai P, Webster HK. 1994. Plasmodium falciparum pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin–1beta. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51:430.

Pongponratn, E., Riganti, M., Bunnag, D., Harinashuta, T. 1987. Spleen in falciparum malaria: Ultrastructural study. South-east Asian J. Trop. Med. Public Health 18:491.

Ramasamy, R. 1998. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. Biochim. Biophys. Acta 1406:10.

Reiner, N.E. 1994. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. Immunol. Today 15:374.

Rudin, W., Favre, N., Bordmann, G., Ryffel, B. 1997. Interferon-gamma is essential for the development of cerebral malaria. Eur. J. Immunol. 27:810.

Schofield, L., Hackett, F. 1993. Signal transduction in host cells by a glycosyl phosphatidylinositol toxin of malaria parasites. J. Exp. Med.177:145.

Sherry, B.A., Alava, G., Tracey, K.J., Martiney, J., Cerami,A., Slater, A.F.G. 1995. Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1α, and MIP-1β) in vitro, and altered thermoregulation in vivo. J. Inflamm. 45:85.

Slater, A.F.G., Swiggard, W.J., Orton, B.R., Flitter W.D., Goldberg, D.E., Cerami, A., Henderson, G.B. 1991. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 88:325.

Slater, A.F.G. 1992. Malaria pigment. Exper. Parasitol. 74:362.

Sullivan, D.J., Gluzman, J.Y., Goldberg, D.E. 1996. Plasmodium hemozoin formation mediated by histidin-rich proteins. Science 271:219.

Urquhart, A.D. 1994. Putative pathophysiological interactions of cytokines and phagocytic cells in severe human falciparum malaria. Clin. Infect. Dis. 19:117.

Warren, H.S., Weidanz, W.P. 1976. Malarial immunodepression in vitro: adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes. Eur. J. Immunol.6:816.

II. Publizierte Forschungsergebnisse

1) Schwarzer, E., F.Turrini, D. Ulliers, G. Giribaldi, H. Ginsburg, and P. Arese.1992. Impairment of macrophage functions after ingestion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. J. Exp. Med. 176: 1033-1041.

2) Turrini, F, E. Schwarzer, and P. Arese. 1993. The involvement of hemozoin toxicity in the depression of cellular immunity. Parasitol. Today 9: 297- 300.

3) Schwarzer, E., F.Turrini, G. Giribaldi, M. Cappadoro, and P. Arese. 1993. Phagocytosis of P.falciparum malarial pigment hemozoin by human monocytes inactivates monocyte protein kinase C. Biochim. Biophys. Acta 1181: 51-54.

4) Schwarzer, E., F. Turrini, and P. Arese. 1994. A luminescence method for the quantitative determination of phagocytosis of erythrocytes, of malaria- parasitized erythrocytes and of malarial pigment. Br. J. Haematol. 88: 740-745.

5) Schwarzer, E., F. Turrini, G. Giribaldi, D. Ulliers, L. Sinauridse, and P. Arese. 1995. Malarial pigment hemozoin, the secrete weapon of Plasmodium falciparum. It. Biochem Soc Trans 6: S4-7.

6) Schwarzer, E. and P.Arese. 1996. Phagocytosis of malarial pigment hemozoin inhibits NADPH-oxidase activity in human monocyte-derived macrophages. Biochim. Biophys. Acta. 1316: 169-175.

7) Schwarzer, E., O. Müller, P. Arese, W.G. Siems, and T. Grune. 1996. Increased levels of 4-hydroxynonenal in human monocytes fed with malarial pigment hemozoin. FEBS- Lett. 388:119-122.

8) Arese, P. and E. Schwarzer. 1997. Malarial pigment (haemozoin): a very active 'inert' substance. Ann. Trop Med Parasitol. 91:501-516.

9) Schwarzer, E., M. Alessio, D. Ulliers, and P. Arese. 1998. Phagocytosis of malarial pigment, haemozoin, impairs the expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. Infect. Immun. 66:1601-1606.

10) Schwarzer, E., F. De Matteis, G. Giribaldi, D. Ulliers, E. Valente, and P. Arese. 1999. Hemozoin stability and dormant induction of heme oxygenase in hemozoin-fed monocytes. Molec. Biochem. Parasitol. 100:61-71.

11) Schwarzer, E.,P. Ludwig, E. Valente, and P. Arese. 1999. 15(S)-hydroxyeicosateraenoic acid (15-HETE), a product of arachidonic acid peroxidation, is an active component of hemozoin toxicity to monocytes. Parassitologia. 41:199-202.