

Aus dem Institut für Tropenmedizin Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

Einfluß von Genen der MHC-Klasse II und anderer polymorpher Gene auf Epidemiologie und klinische Manifestationen der Plasmodieninfektion

zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Tropenmedizin

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dr. med. Jürgen May

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Rolf Horstmann
2. Prof. Dr. Gisela Jacobasch

eingereicht: 20. November 2000

habilitiert: 2. Oktober 2001

1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	2
2.1. Asymptomatische Infektion mit Plasmodien	4
2.2. Milde und schwere Malaria	5
2.3. Pathophysiologie der schweren Malaria	6
2.4. Mischinfektionen mit verschiedenen Plasmodienspezies	10
2.5. Immunität bei Malaria	14
2.6. Parasit-Wirt-Beziehung und Selektionsdruck durch Malaria	20
2.7. HLA-Gene und erworbene Immunität bei Malaria	23
2.8. Polymorphe Nicht-HLA-Gene und erworbene Immunität bei Malaria	30
2.8.1. Tumornekrosisfaktor-Alpha	30
2.8.2. Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1	31
2.8.3. Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase	32
2.9. Polymorphe Erythrozytenvarianten und angeborene Immunität bei Malaria	33
2.9.1. Sichelzellanämie	33
2.9.2. α -Thalassämie	35
2.9.3. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel	36
2.9.4. Blutgruppen	39
3. Methodische Grundlagen und Studiengruppen	40
3.1. Probanden und Aufbau der Studiengruppen	40
3.1.1. Studiengruppe aus Nigeria	40
3.1.2. Studiengruppe aus Gabun	41
3.2. Material und Methoden	42
3.2.1. HLA-Typisierung	42
3.2.2. Sonstige Methoden	43
3.3. Auswertung der Ergebnisse und statistische Berechnungen	45
3.3.1. Computergestützte Auswertung der Typisierungssignale ("BLOT")	45

3.3.2.	Auswertung von Genfrequenzen, Aminosäuremotiv-Frequenzen und Haplotypfrequenzen der Genvarianten ("FAST")	47
4.	Einordnung der Ergebnisse in die gegenwärtige Malariaforschung	49
4.1.	Epidemiologische und malariologische Daten der Studiengruppe aus Nigeria	49
4.2.	Epidemiologische und malariologische Daten der Studiengruppe aus Gabun	51
4.3.	HLA-Polymorphismus und Malaria	52
4.4.	Polymorphismen von Nicht-HLA-Genen und Malaria	59
4.4.1.	Tumornekrosisfaktor-Alpha	59
4.4.2.	Interzelluläres Adhäsions-Molekül 1	60
4.4.3.	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase	61
4.5.	Polymorphismen von Erythrozytenvarianten und Malaria	63
4.5.1.	Sichelzellanämie	63
4.5.2.	α -Thalassämie	64
4.5.3.	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel	65
4.5.4.	Blutgruppen	67
4.6.	Koevolution von Wirt und Parasit	68
5.	Referenzen	69
6.	Anhang	89
6.1.	Abkürzungen	89
6.2.	Programm-Code zur Auswertung der Typisierungssignale ("BLOT")	91
6.3.	Programm-Code zur Berechnung von Allelfrequenzen polymorpher Genloci ("FAST")	95
6.4.	Bibliographie der zitierten eigenen Veröffentlichungen	108

1. Einleitung

Die Malaria gehört bezüglich Mortalität und Morbidität zu den weltweit wichtigsten Infektionserkrankungen. Über ein Drittel der Weltbevölkerung lebt in Regionen, in denen Malaria endemisch oder epidemisch auftritt. Jährlich erkranken 300 bis 500 Millionen Menschen, von denen 1,5 bis 2,7 Millionen sterben. Die lebensbedrohliche Form der Malaria, die Malaria tropica, wird durch das Protozoon *Plasmodium falciparum* verursacht. Drei weitere humanpathogene Plasmodienspezies verursachen eine Malaria mit einem meist milden Krankheitsbild: *P. vivax* und *P. ovale* sind die Erreger der Malaria tertiana und *P. malariae* der Erreger der Malaria quartana. Bei einer Mortalität der Malaria tropica von 1-2% rechnet man allein in Afrika mit mehr als einer Million Todesfällen pro Jahr; die weitaus meisten dieser letalen Krankheitsverläufe treten bei Kindern unter fünf Jahren auf [WHO 1996, WHO 1997, Trigg & Kondrachine 1998]. Die Infektion mit *P. falciparum* verläuft individuell unterschiedlich [White 1996]. Während manche der Infizierten rasch an einer komplizierten Malaria tropica versterben, erkranken andere trotz jahrelang bestehendem Parasitenbefall nicht [Greenwood et al. 1987]. Warum nur ein Teil der mit *P. falciparum* Infizierten an einer schweren Malaria erkrankt und was diese Individuen von den anderen, asymptomatisch Infizierten unterscheidet, ist bisher nicht endgültig geklärt [Greenwood et al. 1991]. Ein Teil der hier zusammengefaßten Arbeiten beschäftigt sich mit der Frage, ob und welche genetischen Faktoren von Infizierten einen Einfluß auf den klinischen Verlauf und die Epidemiologie der Plasmodieninfektion haben können.

Humanpathogene Malariaparasiten existieren seit mehreren tausend Jahren [Ruwende et al. 1995]. Die älteste Nachweise von Plasmodienantigenen wurden aus Proben von Mumien geführt, die etwa 3200 a.D. bestattet wurden [Miller et al. 1994]. In dem langen Zeitraum bis heute hat eine kontinuierliche Auseinandersetzung zwischen Mensch und Parasit stattgefunden, die zur Entwicklung von Resistenz- und Evasionsmechanismen geführt hat. Diese für Mensch und Parasit überlebenswichtigen Anpassungsvorgänge haben ihre Spuren in den Genomen beider Organismen hinterlassen [Kwiatkowski 2000, Taylor et al. 2000]. Ein Ziel der hier zusammengefaßten Arbeiten war es, Beziehungen

zwischen Parasit und Mensch auf genetischer Ebene zu untersuchen und den Einfluß polymorpher Gene auf die Epidemiologie und den klinischen Verlauf einer Plasmodieninfektion, hier im wesentlichen der Infektion mit durch *P. falciparum*, zu beschreiben.

2. Theoretische Grundlagen

Sir Ronald Ross hat 1897 gezeigt, daß Malariaerreger über Moskitos der Gattung *Anopheles* übertragen werden [Ross 1923]. Dabei gelang es ihm, den Anteil des Parasitenzyklus, der in der Überträgermücke stattfindet, zu identifizieren und damit die Grundlage für die Beschreibung des gesamten Parasitenzyklus zu schaffen. Durch den Stich der weiblichen Mücke, die Blut für die Entwicklung ihrer Eier benötigt, gelangen im Median 15 bis 25 der für den Wirt infektiösen Parasitenstadien (Sporozoiten) in die Blutbahn, von wo aus sie innerhalb der ersten 15-45 min in Leberzellen eindringen. Innerhalb einer Woche entwickeln sich in einem infizierten Hepatozyten bis zu 30000 Merozoiten, die nach Ruptur der Zelle freigesetzt werden, in die Blutbahn gelangen und dann rasch Erythrozyten befallen. Über Vermehrungsstadien (Trophozoiten und Schizonten) werden erythrozytäre Merozoiten gebildet, die nach Zerstörung der Zelle erneut Erythrozyten infizieren. Aus einer Subpopulation der Parasiten entstehen nach mehreren Vermehrungszyklen sexuelle Stadien (männliche und weibliche Gametozyten), die dann von den Überträgermücken aufgenommen werden können. Innerhalb der Mücke findet eine Paarung der Gametozyten und eine weitere Entwicklung über Zygote und Oozysten zu Sporozoiten statt [Sherman 1998]. Mit der Injektion der Sporozoiten in die Blutbahn eines anderen Menschen schließt sich der Zyklus.

In einem hochendemischen Gebiet, in dem eine über das gesamte Jahr epidemiologisch stabile Malaria vorkommt, ist ein großer Teil der Bevölkerung mit *P. falciparum* infiziert. Während die meisten der Infizierten dabei ohne klinisch relevante Symptome bleiben, entwickelt ein Teil der Betroffenen eine Malaria mit einer milden klinischen Symptomatik; bei einem geringen Anteil der Infizierten verläuft die Erkrankung mit schweren Komplika-

tionen, von denen insbesondere Kinder betroffen sind [Greenwood 1987]. Die wichtigsten Komplikationen der Malaria bei Kindern sind eine schwere Anämie und eine zerebrale Manifestation. Daneben kann es zu weiteren schweren Schädigungen verschiedener Organe kommen. Infektionen durch die Plasmodienspezies *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* sind im äquatorialen Afrika seltener und verursachen meist keine oder nur milde klinische Erscheinungen. In hochendemischen Gebieten sind große Teile der Bevölkerung - wiederum besonders Kinder - mit mehreren der humanpathogenen Plasmodienspezies infiziert.

Die Auseinandersetzung zwischen Wirt und Parasit ist von exogenen (z. B. Klima, Vektorpopulationsdichte, Endemizität) und endogenen Faktoren (Parasitenvariabilität, wirtsabhängigen genetischen Resistenzfaktoren, Immunstatus) abhängig. Diese Faktoren entscheiden über Morbidität und Mortalität der Erkrankung. In endemischen Malariagebieten entwickelt sich nach zahlreichen abortiven und/oder manifesten Erkrankungen bereits im Kindesalter eine sogenannte Semiimmunität, d.h. eine zunehmende Infektionsimmunität und eine Krankheitsimmunität, die einen relativen Schutz vor schweren Komplikationen und letalen Verläufen verleiht. Unter den endogenen Faktoren spielen die genetischen Determinanten, die sowohl an angeborenen (nichtadaptiven) als auch an erworbenen (spezifischen) Resistenz- und Immunmechanismen beteiligt sind, eine besondere Rolle [Hill 1998]. Der genetische Polymorphismus in humanen Populationen beeinflusst die genetische Vielfalt in Plasmodienpopulationen; umgekehrt hat die genetische Variabilität der Parasiten einen Einfluß auf den genetischen Polymorphismus humaner Populationen. Diese evolutionäre Interaktion zwischen Parasit und Wirt ist durch ausgeprägte Selektion gekennzeichnet. Das Verständnis der Pathogenese der Malaria sowie der Entstehung bestimmter Krankheitsmanifestationen kann durch Studien über die Koevolution von Wirt und Parasit erweitert werden [Taylor et al. 2000]. Die Analyse der Interaktion verschiedener genetischer Resistenzfaktoren des Menschen mit bestimmten genetischen Faktoren des Parasiten *P. falciparum* ist Teil der hier zusammengefaßten Arbeiten.

2.1. Asymptomatische Infektion mit Plasmodien

In hochendemischen Gebieten Afrikas ist ein großer Teil der Bevölkerung ab einem bestimmten Alter asymptomatisch mit *P. falciparum* infiziert. Die Parasitenlast im Blut (Parasitämie) ist bei diesen asymptomatischen *P.-falciparum*-Infektionen meist sehr niedrig und dauert Wochen bis Monate an [Gilles 1986]. Bei der Diagnose von chronischen, asymptomatischen Infektionen ist die Sensitivität der üblicherweise eingesetzten mikroskopischen Untersuchung limitiert. Die Sensitivität der Bestimmung subklinischer Parasitämien wird durch den zusätzlichen Einsatz einer Spezies-spezifischen Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) erheblich gesteigert [Snounou et al. 1993].

Ob submikroskopische Infektionen eine Bedeutung für den Gesundheitszustand eines Patienten haben, wird seit langem diskutiert [Greenwood 1987]. Für eine solche Bedeutung spricht die Erkenntnis, daß durch den Einsatz von Bettnetzen, die vor den nächtlichen Stichen des übertragenden Mückenvektors schützen, sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern subklinische Infektionen verhindert und in der Folge die allgemeine Morbidität und Mortalität reduziert wird [Payne et al. 1976]. Eine chronische asymptomatische Infektion kann eine unspezifische Verschlechterung des Allgemeinzustandes oder eine Veränderung des Immunstatus zur Folge haben, die dann für den Verlauf einer symptomatischen Infektion bedeutsam werden können. Insbesondere wurde z. B. beobachtet, daß eine anhaltende niedrige oder submikroskopische Parasitämie zu einer Anämie führen kann [Abdalla et al. 1980]. Mögliche Pathogenitätsmechanismen sind eine Hemmung der Erythropoese und eine vermehrte Destruktion der Erythrozyten, z. B. durch Aktivierung des Makrophagen-Monozyten-Systems und Hypersplenismus. Über eine verstärkte Zerstörung von nicht-parasitierten Erythrozyten für einen gewissen Zeitraum nach einer akuten Malariaepisode - wahrscheinlich durch Hypersplenismus - ist berichtet worden [Woodruff et al. 1979]. Immunologische Faktoren könnten auch bei der Pathogenese der Anämie während submikroskopischer Infektionen eine Rolle spielen [Greenwood 1987]. Inwieweit dabei andere Plasmodienspezies als *P. falciparum* involviert sind, ist bisher unklar (s. u.). Insbesondere bei Personen mit Ernährungsdefiziten kann eine zusätzliche Belastung durch

beschleunigten Abbau der Erythrozyten zu einer Verschlechterung hämatologischer Parameter führen. Unklar ist weiterhin, inwieweit rekurrierende, asymptomatische Plasmodieninfektionen zu einer Beeinflussung des Eisenmetabolismus führen.

Eine Bedeutung der asymptomatischen, submikroskopischen Parasitämie für andere Erkrankungen wird diskutiert, z. B. für die Inzidenz der hyperreaktiven Splenomegalie bei Malaria (HMS), das nephrotischen Syndrom bei einer Infektion mit *P. malariae* oder die Entstehung des Burkitt-Lymphoms [Greenwood 1987]. Ein immunmodulatorischer Einfluß durch wiederholte Infektionen mit unterschiedlichen Plasmodienstämmen ist auch bei niedrigen Parasitämien wahrscheinlich. So ist bei dauerhaft niedrigen Parasitämien eine erhöhte Prävalenz sekundärer Infektionen, z. B. mit *Salmonella typhi*, beschrieben worden [Mabey et al. 1987].

2.2. Milde und schwere Malaria

Eine Infektion mit *P. falciparum* nimmt einen individuell unterschiedlichen Verlauf innerhalb eines Spektrums, das von einer asymptomatischen Infektion bis zu schwersten Komplikationen reicht [Marsh 1999]. Dieser Verlauf der *P.-falciparum*-Infektion ist bei Kindern und Erwachsenen sehr unterschiedlich und vor allem abhängig vom Immunstatus des Infizierten. Daher verläuft die Malaria bei erwachsenen Europäern, die von einer Reise wiederkehren, völlig anders als die Malaria bei Kindern aus Afrika. In Afrika sind Kinder im Alter über fünf Jahren trotz Infektion oft asymptomatisch. Kommt es zu einer klinischen Manifestation, handelt es sich in den meisten Fällen um eine relativ milde, unspezifische fieberhafte Erkrankung, die - insbesondere bei rasch einsetzender Therapie - schnell vorübergeht. Bei der Entwicklung einer klinisch relevanten Erkrankung kommt es zu grippeähnlichen Symptomen, Husten, zunehmender Anämie, Splenohepatomegalie, abdominalen Schmerzen, Erbrechen und milder Diarrhoe [Marsh 1999].

Bei sehr jungen Kindern mit einer zu schwachen Immunität kann es zu schweren Komplikationen kommen. Die wichtigsten Komplikation der Malaria tropica bei Kindern aus hoch-

endemischen Gebieten Afrikas sind zerebrale Malaria und schwere Anämie. Um zerebrale Malaria handelt es sich, wenn Patienten einen schmerzhaften Stimulus nicht mehr lokalisieren können [Warrell *et al.* 1982]. Eine schwere Anämie ist gekennzeichnet durch einen Hämoglobinwert von unter 50 g/l oder einem Hämatokrit unter 15%. Weitere häufige Komplikationen bei Kindern sind Hypoglykämie (Glukose unter 40 mg/dl), Hyperparasitämie ($\geq 20\%$ bei semiimmunen Kindern, $\geq 4\%$ bei nicht-immunen Kindern) [Marsh 1999].

Die WHO definiert eine schwere Malaria als Erkrankung mit einer Parasitämie (asexuelle Stadien) ohne Hinweis auf eine andere Krankheit mit mindestens zwei der folgenden klinischen Symptome: Sitz- oder Trinkschwäche (bei Kindern), Bewußtseinseintrübung, respiratorische Insuffizienz (Kußmaul-Atmung), Krämpfe, Kreislaufkollaps, pulmonale Ödeme (radiologisch gesichert), abnormale Blutungen, Ikterus, Hämoglobinurie, schwere Anämie [WHO 2000].

2.3. Pathophysiologie der schweren Malaria

Insgesamt scheinen die Komplikationen bei Malaria das Resultat verschiedener pathogener Prozesse zu sein: Zytokininduktion durch die Freisetzung von toxischen Parasitenprodukten; verschlechterter Blutfluß durch Sequestration infizierter Erythrozyten; Hochregulierung der Expression von Adhäsionsmolekülen durch Zytokine oder die Adhäsion parasitierter Erythrozyten; Sekretion von Stickstoffmonoxid (NO) aus Endothelzellen und anderen Zellen [White 1998]. Zu einer schweren Malaria kommt es vermutlich dann, wenn eine Parasitensequestration und andere pathologische Prozesse durch eine überschießende Zytokinproduktion gefördert werden. Diese Prozesse werden durch die Konstellation von Wirtsgenotyp, Immunstatus und Parasitenstamm in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst. Es ist allerdings unklar, warum der Großteil der Kinder in einem für Malaria endemischen Gebiet keine oder wenige klinische Symptome zeigt und lediglich ein kleiner Teil eine schwere Symptomatik entwickelt und welche Faktoren im einzelnen den Verlauf der Malaria bestimmen.

Fieber und Zytokine. Es wurde lange vermutet, daß Plasmodien ein Toxin enthalten, das während der Schizontenruptur freigesetzt wird und das die für die Infektion charakteristischen Paroxysmen auslöst. Ein solches parasitäres Toxin wurde bisher nicht gefunden; allerdings bewirken die Parasiten die Freisetzung von Zytokinen, die ähnliche proinflammatorische Wirkungen wie Exotoxine haben können [Kwiatkowski & Greenwood 1989b]. Heute ist bekannt, daß Parasitenprodukte, Wirtszellmaterial, Hämazoin und Antikörperkomplexe Endothelzellen und Zellen des Makrophagen-Monozyten-Systems zur Sekretion von Zytokinen stimulieren. Schwere Malaria ist mit der Freisetzung von Gamma-Interferon [IFN- γ], Tumornekrosisfaktor [TNF] Interleukin 6 [IL-6] und IL-1 β und somit vor allem mit einer Th1-gerichteten Zytokinsekretion assoziiert [Grau & De Kossodo 1994].

Eine Folge der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine bei Malaria ist Fieber. Zu den Zytokinen, bei denen ein Einfluß auf die thermostatische Regulation durch den Hypothalamus nachgewiesen wurde oder vermutet wird, gehören TNF α [Kap. 2.8.1], IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IFN- α , LT α und das *macrophage inflammatory protein-1* [Kwiatkowski & Perlmann 1999]. Diese inflammatorischen Zytokine haben allein durch ihre Fieber-provozierenden Wirkungen eine wichtige Funktion bei der antiparasitären Abwehr [Brandts et al. 1997]. Allerdings sind deren Wirkungen auch für die Pathologie der Erkrankung von Bedeutung. Neben diesen Zytokinen mit direkt pyrogenen Eigenschaften gibt es andere, wie IFN- γ und IL-1, die durch Stimulierung pyrogener Mediatoren indirekt Fieber hervorrufen.

Zytoadhärenz und Rosettenbildung. Für die Pathogenese der zerebralen Malaria werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht: Intrazerebrale Mikrozirkulationsstörungen durch Gefäßokklusionen; Zirkulationsstörungen durch untereinander verklebte Erythrozyten ("*sludging*"); Ausbildung eines zerebralen Ödems durch Veränderungen der Gefäßpermeabilität; Immunologische Prozesse [WHO 2000]. Eine besondere Bedeutung bei der Mikrozirkulationsstörungen bei zerebraler Malaria hat die Sequestration von *P.-falciparum*-infizierten, aber auch von nicht-infizierten Erythrozyten, in peripheren Blutgefäßen [Berendt et al. 1994, Wahlgren et al. 1999]. Infizierte Erythrozyten adhärieren an Endothelzellen (Zytoadhärenz) und nicht-infizierte Erythrozyten binden an infizierte (*Rosetting*). Durch

diese Mechanismen wird die Mikrozirkulation Gehirn - aber auch in Lunge, Leber und Plazenta - direkt beeinträchtigt und das Organ geschädigt. Verstärkte Adhäsion von parasitierten Erythrozyten an Endothelzellen wird insbesondere für die Pathogenese der zerebralen Malaria verantwortlich gemacht [Coppel et al. 1998]. Bei Patienten, die an zerebraler Malaria verstorben sind, finden sich erheblich mehr mit parasitierten Erythrozyten verstopfte Gefäße als bei Patienten, die an einer anderen Komplikation gestorben sind [MacPherson et al. 1985]. Durch die Mikrozirkulationsstörungen kommt es zur lokalen Hypoxie, Azidose und lokalen Sekretion von Zytokinen (z. B. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-6, IL-10), Adhäsionsmolekülen (z. B. *intercellular adhesion molecule 1* [ICAM-1]) und anderen bioaktiven Molekülen (z. B. NO, Endothelin) [Wahlgren et al. 1999].

Voraussetzung für die Zytoadhärenz der Erythrozyten ist die Expression von Neoantigenen parasitären Ursprungs auf deren Zelloberfläche [Hommel & Semoff 1988]. Das wichtigste bisher bekannte Neoantigen ist das PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) [Baruch et al. 1995], das im Bereich von elektronendichten submembranösen Strukturen, sogenannten "knobs", auf der Oberfläche von *P.-falciparum*-infizierten Erythrozyten gebunden ist. Im Bereich dieser Protrusionen kommt es zu Interaktionen der infizierten Zellen mit anderen Erythrozyten und Endothelzellen [Aikawa et al. 1983, Scholander et al. 1998].

Auf den Endothelzellen der peripheren Gefäße werden Proteine exprimiert, die als Rezeptoren für die Neoantigene parasitierter Erythrozyten wirken. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, daß insbesondere ICAM-1 bei der Adhäsion von parasitierten Erythrozyten an Endothelzellen beteiligt ist [Kap. 2.8.2] [Wahlgren et al. 1999]. Neben ICAM-1 sind die wichtigsten bisher identifizierten Adhäsionsmoleküle CD36, CD31/PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cellular adhesion molecule-1*), E-Selektin, CSA (*circumsporozoite surface antigen*) und Thrombospondin. Der hauptverantwortliche Ligand der parasitierten Erythrozyten ist das PfEMP-1, das mit einem Teil seiner konservierten Kopfstruktur an CD36 und ICAM-1 bindet [Wahlgren et al. 1999].

Ein anderer Teil der PfEMP1-Kopfstruktur ist für das *Rosetting* mitverantwortlich, das die lokale Anhäufung von Erythrozyten begünstigt. "*Rosetting*" bezeichnet die Bildung von Zellverbänden aus parasitierten und nicht-infizierten Erythrozyten. Dieses Phänomen ist mit schwerer *P.-falciparum*-Malaria assoziiert [Carlson et al. 1990, Kun et al. 1998] und tritt vor allem bei sequestrierenden Parasiten während der Schizogonie auf [David et al. 1988, Udomsangpetch et al. 1989]. Die funktionelle Bedeutung der Rosettenbildung ist nicht bekannt. Es wird spekuliert, daß durch die räumliche Nähe der nicht-infizierten Erythrozyten zu den infizierten Erythrozyten die Invasion der Merozoiten nach Schizontenruptur erleichtert wird [Wahlgren et al. 1999].

Anämie. Eine schwere normozytäre Anämie ist eine häufige Komplikation bei schwerer Malaria. Sie betrifft vor allem Kinder im Alter zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr [Weatherall et al. 1983, Phillips & Pasvol 1992] und ist in Gegenden mit sehr hoher *P.-falciparum*-Transmission die dominierende Malariakomplikation. Die Pathogenese der Anämie bei Malaria ist komplex und multifaktoriell. Die wichtigsten pathogenetischen Faktoren sind die direkte Zerstörung der parasitierten Erythrozyten durch Schizontenruptur, eine erhöhte und verfrühte Zerstörung nicht-infizierter Erythrozyten durch Hypersplenismus und immunologische Prozesse sowie die verminderte Erythropoese durch Suppression des blutbildenden Knochenmarks [Abdalla et al. 1980]. Diese Mechanismen werden durch genetische Konstellationen wie Sichelzellanämie oder α -Thalassämie beeinflusst. Weitere Einflußfaktoren in malariaendemischen Regionen sind Eisen- oder Folsäuremangel sowie begleitende Infektionen (z. B. Hakenwurminfektion).

Infizierte Erythrozyten werden natürlicherweise bei der Schizontenruptur zerstört. Der Anteil der so zerstörten Erythrozyten kann aber aufgrund der oft niedrigen Parasitämien (< 1%) in den meisten Fällen die schwere Anämie nicht allein erklären [Looareesuwan et al. 1987b]. Eine besondere Rolle bei der Beseitigung von intakten parasitierten Erythrozyten wird der Milz zugeschrieben [Kwiatkowski & Perlmann 1999]. Im Körper können neu exprimierte oder veränderte körpereigene Antigene der Erythrozytenmembran von IgM-Antikörpern erkannt und die so markierten Zellen von Phagozyten in der Milz zerstört werden. Ein

Beispiel für eine solche antigenetische Veränderung ist die frühzeitige Exposition von Bande-3-Antigenen an der Membranoberfläche *P.-falciparum*-infizierter Erythrozyten [Sherman & Winograd 1990]. Ein solcher Mechanismus kann eine immungesteuerte Vernichtung von infizierten Erythrozyten erklären.

Die Bedeutung von Immunmechanismen bei der Zerstörung nicht-infizierter Zellen wird kontrovers diskutiert und Studien aus unterschiedlichen Regionen haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt [Facer *et al.* 1979, Merry *et al.* 1986]. Es muß aber eine immunabhängige Destruktion von nicht-infizierten Erythrozyten geben, da diese Zellen auch nach medikamentöser Parasiteneradikation zerstört werden. Eine Bindung von Komplementfaktoren (C3 und C4) und Immunglobulinen (IgG und IgA) an nicht-infizierte Erythrozyten wird *in vitro* beobachtet und die Bindung von IgG1 an rote Blutzellen war in einer Studie aus Gambia mit Anämie assoziiert [Facer 1980].

Verschiedene Beobachtungen sprechen für eine Hemmung der Erythrozytenbildung durch eine Knochenmarkssuppression bei *P.-falciparum*-Malaria. Einerseits bleibt die reaktive Bildung von Retikulozyten, die normalerweise in der Folge einer Hämolyse stattfindet, bei einer Malaria-assoziierten Anämie aus oder ist nur schwach ausgeprägt [Woodruff *et al.* 1979]. Andererseits sind Knochenmarkszellen von Kindern mit Malaria pathologisch verändert [Abdalla *et al.* 1980] und es kommt zu einer abnormalen Erythrozytenproliferation [Wickramasinghe *et al.* 1982]. Als Mediator einer Knochenmarkssuppression bei Malaria wird vor allem TNF verantwortlich gemacht [Kwiatkowski & Perlmann 1999]. TNF und andere proinflammatorische Zytokine inhibieren erythrozytäre Progenitorzellen in Knochenmarkskulturen [Roodman *et al.* 1987]. Eine Suppression der Erythropoese konnte auch im Tierversuch nachvollzogen werden [Johnson *et al.* 1989].

2.4. Mischinfektionen mit verschiedenen Plasmodienspezies

Neben *P. falciparum* gibt es noch drei weitere humanpathogene Plasmodienarten, die in unterschiedlicher Häufigkeit und Verbreitung vorkommen: *P. vivax*, *P. malariae* und

P. ovale. In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, daß in endemischen Gebieten Mehrfachinfektionen mit verschiedenen Plasmodienspezies häufig sind [Richie 1988]. Mit hochsensitiven Detektionsmethoden wie der PCR wurde gezeigt, daß Mehrfachinfektionen weitaus häufiger sind als bisher vermutet wurde [Snounou et al. 1993] und die einzelnen Spezies häufig in submikroskopischen Mengen vorkommen [Snounou et al. 1993].

Interaktionen zwischen verschiedenen Spezies. Die Frage, ob beim Menschen die Infektion mit einer Parasitenspezies den Verlauf einer Infektion mit einer anderen Spezies verändert, ist lange Zeit wenig beachtet worden. Bei einer Interaktion zwischen verschiedenen Spezies wäre prinzipiell eine gegenseitige Begünstigung oder Inhibition denkbar. Für beide Möglichkeiten gibt es experimentelle und epidemiologische Hinweise.

Für eine gegenseitige Begünstigung mehrerer Spezies spricht, daß eine latente *P.-vivax*-Infektion durch eine Infektion mit *P. falciparum* aktiviert wird [Hill et al. 1943]. Hierfür könnte eine Immunsuppression durch die vorhergehende Infektion verantwortlich sein [Richie 1988]. Auch im Tierexperiment wurde gezeigt, daß die Infektion mit einer Plasmodien-spezies die Infektiosität einer anderen Spezies erhöhen kann [Collins et al. 1975]. Es ist vorstellbar, daß spezielle immunevasive Mechanismen, z. B. die Expression bestimmter Gene, eine Koexistenz der Spezies erleichtern [Richie 1988]. Eine weitere Erklärung für ein vermehrt gemeinsames Vorkommen verschiedener Plasmodienarten in einem Wirt wäre eine generell erhöhte Exposition solcher Personen in einem Gebiet.

Andere Beobachtungen sprechen für eine Suppression einer simultanen Infektion mit einer anderen Erregerart. In einer Studie in Thailand war nach Behandlung der Malaria tropica das Auftreten von *P. vivax* (wahrscheinlich im Sinne eines aktivierten Rückfalls) erhöht [Looareesuwan et al. 1987a]. Diese Situation kann als Beseitigung einer vorherigen Suppression gedeutet werden. In einer neueren Studie aus Melanesien wurden Mischinfektionen mit *P. falciparum* und *P. vivax* seltener als statistisch erwartet gefunden [Maitland et al. 1996].

Heterologe Kreuzimmunität. Ein möglicher Mechanismus, der zu einer gegenseitigen Hemmung verschiedener Parasitenspezies in einem gemeinsamen Wirt führen könnte,

wäre eine protektive Kreuzimmunität. Bei den humanpathogenen Parasitenspezies gibt es nur wenige Daten bezüglich einer protektiven Kreuzimmunität bei multiplen Infektionen. Diese beziehen sich fast ausschließlich auf eine Interaktion zwischen *P. falciparum* und *P. vivax*; über solche zwischen *P. ovale*/*P. malariae* und *P. falciparum* liegen kaum Berichte vor. Es wird kontrovers diskutiert, ob eine Kreuzimmunität zwischen verschiedenen Spezies bei Tieren existiert (zusammengefaßt in [Richie 1988, Maitland et al. 1997]).

Mehrere klinische und experimentelle Studien haben gezeigt, daß beim Menschen eine Immunität gegen eine bestimmte Malariaspezies keinen Schutz gegen eine der anderen Spezies vermittelt. Ein Teil dieser Erkenntnisse wurde in älteren Untersuchungen gewonnen, in denen bei Patienten mit Neurosyphilis Behandlungsversuche durch experimentelle simultane Inokulation von *P. falciparum* und *P. vivax* vorgenommen wurden [Yorke & McFie 1924]. Einige epidemiologische Studien haben ebenfalls keine Kreuzimmunität zwischen diesen beiden Erregern nachweisen können [Jeffery 1966].

Andererseits wurde gezeigt, daß es im Verlauf von Mehrfachinfektionen zur Prädominanz einer Spezies kommen kann [Richie 1988]. In Studien über induzierte Malaria wurde beobachtet, daß nach einer simultanen Inokulation mit *P. falciparum* und *P. vivax* meist *P. falciparum* den initialen klinischen Verlauf dominierte, wobei die *P.-vivax*-Malaria solange subklinisch blieb, bis die *P.-falciparum*-Parasitämie absank [Boyd & Kitchen 1937]. Hierfür könnte eine Kreuzreaktivität gemeinsamer Antigenepitope der Plasmodien verantwortlich sein. Eine prospektive Studie aus Sri Lanka hat Hinweise für eine Kreuzimmunität zwischen *P. vivax* und *P. falciparum* ergeben [Gunewardena et al. 1994].

Es wurde argumentiert, daß Parasitenspezies, die den selben Wirt befallen, wahrscheinlich nicht identische immunogene Antigene produzieren, da der Wirt bei dem Erwerb einer protektiven Immunität gegen eine Art das Überleben der anderen ebenfalls beeinträchtigen würde [Richie 1988]. Daraus wurde gefolgert, daß die Parasiten zu einer Antigendivergenz tendieren müßten und Immunität daher Spezies-spezifisch sei. Diese Hypothese wurde weder *in vitro* noch *in vivo* bewiesen; die Überlegungen zeigen zumindest, daß eine - wie auch immer beschaffene - Interaktion zwischen verschiedenen Parasitenspezies in einem

gemeinsamen Wirt sehr wahrscheinlich ist. Für einen Mechanismus, der ein gemeinsames Auftreten verschiedener Spezies in einem Wirt erschwert, spricht die Beobachtung, daß in vielen endemischen Gebieten die Spezies saisonal versetzt auftreten [Molineaux et al. 1980, Maitland et al. 1996].

Andere Autoren halten es für wahrscheinlich, daß es unter verschiedenen Spezies gemeinsame Antigene gibt und daß Kreuzimmunität in einem gewissen Ausmaß existiert [Butcher 1998]. Das Vorkommen gemeinsamer antigener Epitope wird z. B. bei den tierpathogenen Parasiten *P. cynomolgi bastianelli* und *P. cynomolgi cynomolgi* angenommen [Maitland et al. 1997]. *In vitro* wurde allerdings gezeigt, daß es auch über andere Wege zu einer Interaktion zwischen Spezies kommen kann. Eine IgM-vermittelte Kreuzimmunität gegenüber einem Exotoxin wurde bei *P. falciparum* und *P. vivax* beobachtet [Bate et al. 1992]. Dieses Protein induziert die Ausschüttung von TNF [Kwiatkowski et al. 1989a], das an der Pathogenese der schweren Malaria beteiligt ist [Grau et al. 1989, Kwiatkowski et al. 1990].

Nicht-spezifische Interaktionsmechanismen. Neben einer immunogenen Interaktion zwischen verschiedenen Spezies ist auch eine länger anhaltende, nicht-spezifische Inhibition von erythrozytären Stadien einer Spezies durch Leberstadien einer anderen Spezies vorstellbar [Butcher 1998]. Eine nicht-spezifische Resistenz kann auch durch eine Milzvergrößerung entstehen, die durch die Infektion mit einer Parasitenspezies verursacht wurde und die Vermehrung einer anderen Spezies behindert [Richie 1988]. Ein Beispiel für eine weitere von der Immunantwort unabhängige Interaktion ist eine durch eine chronische Infektion mit *P. falciparum* hervorgerufene Anämie, die zur Retikulozytose führt und dadurch die Umweltbedingungen für die Retikulozyten-spezialisierten Parasiten *P. ovale* und *P. vivax* verbessert. Tatsächlich wurde in einer Studie in Nigeria, deren Ergebnisse wesentliche Teile der vorgelegten Arbeit darstellen, beobachtet, daß der Grad einer subklinischen Anämie mit der Komplexität der Infektion ansteigt [May et al. 2000a]. Dreifachinfektionen mit *P. falciparum*, *P. ovale* und *P. malariae* waren mit niedrigeren Hämoglobinwerten assoziiert als Doppelinfektionen und Einfachinfektionen.

Zusammenfassende Hypothese. Während einer Infektion mit Plasmodien scheinen sich Perioden effektiver und supprimierter Immunität abzuwechseln, so daß sowohl Begünstigung als auch Suppression von Mehrfachinfektionen alternierend vorkommen können. Zusätzlich wird die Interaktion zwischen verschiedenen Parasitenspezies durch Umweltfaktoren beeinflusst. Zu diesen gehören klimatische Bedingungen, Höhenlage, Ernährung, Arthropodenvektoren, Medikamenteneinsatz und Medikamentenresistenzen in einer bestimmten Region [Richie 1988]. Dieser Umstand könnte regionale Unterschiede der Prävalenz von Mischinfektionen erklären.

Eine hypothetische Erklärung für die Beobachtung, daß sowohl Begünstigung als auch Behinderung von Mehrfachinfektionen vorkommen kann, wurde von Molineaux geliefert [Molineaux et al. 1980]: Genetische Unterschiede der Wirtspopulation könnten zur Konzentration verschiedener Spezies in empfänglichen Wirten führen; gleichzeitig könnte eine gegenseitige Hemmung der Erreger ein Überwiegen einer Spezies begünstigen. Da genetische Resistenzfaktoren des Wirtes regional unterschiedlich verbreitet sind, könnte diese Hypothese auch geographische Unterschiede in dem Vorkommen von Mischinfektionen erklären.

Für die Durchführung von Malariakontrollprogrammen ist die Kenntnis von der Interaktion verschiedener Parasitenspezies untereinander und mit dem Wirt, insbesondere ihre Bedeutung für den Verlauf einer *Malaria tropica*, von Bedeutung. So könnte das Risiko schwerer Malariaverläufe durch Interventionen, die zu einer Reduktion einzelnen Spezies führen, provoziert werden [Maitland et al. 1997].

2.5. Immunität bei Malaria

In Gebieten, die für *P. falciparum* hochendemisch sind, haben Jugendliche und Erwachsene eine funktionelle, gegen die Krankheit schützende Immunität entwickelt, die aber die Parasiten nicht vollständig eliminiert. Für die Entwicklung und Beibehaltung dieser "antitoxischen" Immunität ist ein kontinuierlicher Kontakt mit dem Parasiten durch häufige,

sukzessive Infektionen erforderlich [Snow *et al.* 1999]. Die Immunität ist unvollständig und kann sich bei länger fehlendem Kontakt mit dem Erreger zurückbilden; diese Form der Immunität wird daher als Semiimmunität bezeichnet. Es ist nicht vollständig geklärt, durch welche Faktoren ein Schutz vor schwerer Malaria vermittelt wird. Protektion scheint Folge komplexer Vorgänge zu sein, bei denen zum einen die angeborene Immunität, bei der Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen eine besondere Rolle spielen, und zum anderen die erworbene Immunität, die durch Th1- und Th2-Lymphozyten reguliert wird, beteiligt sind.

Der Ausgang einer Infektion mit *P. falciparum* ist von verschiedenen Bedingungen des Wirtes und des Parasiten abhängig [Gupta *et al.* 1994, Hill *et al.* 1997]. *In-vitro*-Studien und Tierexperimente haben gezeigt, daß auf Seiten des Wirtes angeborene und erworbene Mechanismen an einer Immunreaktion gegenüber dem Parasiten beteiligt sind [Greenwood *et al.* 1991]. Die Immunitätslage des Wirtes wird neben der genetischen Disposition unter anderem durch Alter, vorangegangene Infektionen und allgemeine körperliche Verfassung beeinflußt. Bisher ist nicht genau geklärt, welche Mechanismen darüber entscheiden, ob und wie schwer ein Infizierter mit ungenügender Immunität erkrankt [Greenwood *et al.* 1991].

Die Semiimmunität gegen *P. falciparum* ist spezies- und stadienspezifisch. Die Entwicklung einer protektiven Immunität dauert viele Jahre und erfordert eine ständige Erregerexposition [Snow *et al.* 1999]. Je nach Parasitenstadium sind unterschiedliche Immunmechanismen beteiligt. In den ersten Minuten nach einer Infektion können Anti-Sporozoit-Antikörper ein Eindringen der infektiösen Stadien in die Hepatozyten verhindern [Nardin & Zavala 1998]. Im weiteren Verlauf einer Infektion scheint eine Immunantwort gegen die Stadien, die sich kurz nach der Infektion im Hepatozyten entwickeln, von besonderer Bedeutung für den Schutz vor hohen Parasitämien zu sein [Good & Doolan 1999]. Nach Lyse der Hepatozyten kommt es zur Infektion der Erythrozyten und zur exponentiellen Vermehrung der Erreger mit Proliferationszyklen. Die Protektion gegen die erythrozytären Stadien ist vor allem Antikörper-abhängig, aber auch mit IFN- γ -Produktion und T-Zellproliferation assoziiert

[*Good et al. 1998, Miller et al. 1998*]. Eine Immunität gegen Gametozyten ist für die Verbreitung der Erreger und Erhaltung der Endemizität der Malaria, nicht aber für den individuellen Gesundheitszustand von Bedeutung [*Kaslow 1998*].

Die langsame Entwicklung der protektiven Immunität bei Malaria läßt darauf schließen, daß eine spezifische Immunität gegen viele natürlich vorkommende Parasitenantigenvarianten, die untereinander nicht kreuzreaktiv sind, aufgebaut werden muß [*Saul 1999, Snow et al. 1999*]. So sind CD4-positive und CD8-positive T-Zellen, die Sporozoitenantigene und Blutstadienantigene erkennen, in der Regel Varianten-spezifisch [*Plebanski & Hill 2000*]. Während sich eine protektive Immunität gegen Parasitenstadien mit der Dauer der Exposition aufbaut, gibt es Hinweise darauf, daß ein relativer Schutz gegen schwere Krankheitskomplikationen schon nach ein oder zwei Infektionen besteht [*Gupta et al. 1999*]. Der Erwerb einer Wirtsimmunität wird durch parasitäre Evasionsmechanismen supprimiert [*Plebanski et al. 1997a, Gilbert et al. 1998, Plebanski et al. 1999, Urban et al. 1999*]. Diese Mechanismen behindern T-Zellantworten bei Infizierten generell und führen dazu, daß Blutstadien-spezifische T-Zellen bei natürlich exponierten Personen nicht regelmäßig gefunden werden.

Immunität gegen Leberstadien. Seit der Beobachtung, daß durch den Stich Plasmodienhaltiger, UV-bestrahlter Moskitos eine Protektion gegenüber einer erneuten Infektion erreicht werden kann [*Mulligan et al. 1941*], ging man lange Zeit davon aus, daß dieser Schutz durch eine Immunität gegen Sporozoiten vermittelt wird. Inzwischen mehren sich die Hinweise, daß für diese Protektion eigentlich eine Immunität gegen hepatozytäre Stadien verantwortlich ist [*Druilhe & Marchand 1989*]. Die intrahepatozytären Parasitenstadien sind Ziel einer Reihe von zellulären und humoralen Immuneffektormechanismen. Im Tiermodell führt die Inokulation von bestrahlten Sporozoiten in der Leber zur Bildung von Granulomen, die Makrophagen, T-Zellen, Neutrophile und Eosinophile enthalten [*Hoffman et al. 1989*]. Die Funktionsweise der Abwehr von präerythrozytären Stadien ist unklar. Etwa die Hälfte der Sporozoiten erreichen Hepatozyten und durchlaufen eine Schizogonie, obwohl

Leberstadien sich durch eine starke Immunogenität auszeichnen und eine Reihe von Mechanismen bekannt sind, die Invasion und Entwicklung der Parasiten blockieren können. Im Gegensatz zu erythrozytären Stadien kommen Leberstadien nur kurz und in niedriger Anzahl im Körper vor. Es wurde geschätzt, daß bei Infizierten Antigene von Erythrozytenstadien um den Faktor 10^{10} bis 10^{12} häufiger sind als solche von Leberstadien [Druilhe et al. 1998]. Trotzdem sind Leberstadienantigene im Vergleich zu Erythrozytenantigenen hoch immunogen. Die vier am besten untersuchten Antigene, die von hepatozytären Stadien exprimiert werden, sind LSA-1 (*liver stage-specific antigen 1*) [Guerin-Marchand et al. 1987], LSA-3, STARP (*sporozoite threonine and asparagine-rich protein*) [Fidock et al. 1994a] und SALSA (*sporozoite and liver stage antigen*) [Bottius et al. 1996b]. Die Immunogenität dieser Antigene im Sinne einer B-Zellaktivierung wurde in mehreren Studien nachgewiesen [Druilhe et al. 1986, Fidock et al. 1994b, Bottius et al. 1996b, Pasquetto et al. 1997, Druilhe et al. 1998]. Die Höhe der Antikörpertiter ist prinzipiell von der Höhe der Transmission von Parasiten abhängig. Antikörper können direkt oder in Zusammenwirken mit Kupffer- oder NK-Zellen oder auch im Rahmen einer antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) wirken [Rénia et al. 1990]. Einerseits können Antikörper die Penetration von Hepatozyten verhindern [Hollingdale et al. 1984]; meist ist dieser Effekt allerdings nicht vollständig [Mellouk et al. 1986]. Andererseits kann die intrahepatozytäre Entwicklung gehemmt werden [Nudelman et al. 1989, Pasquetto et al. 1997].

Neben humoralen Mechanismen sind auch zelluläre Effektormechanismen bei der Immunabwehr von hepatozytären Stadien bedeutsam. Zur Induktion einer T-Zellantwort gegenüber Leberstadien ist die HLA-vermittelte (HLA, humane Leukozytenantigene) Präsentation von Parasitenantigenen gegenüber T-Zellrezeptoren (*T cell receptor*, TCR) notwendig. Humane Hepatozyten exprimieren sowohl HLA-Klasse-I- als auch -Klasse-II-Moleküle [Franco et al. 1988]. Nach Aktivierung der T-Zellen kommt es zu einer Kaskade von Immunreaktionen mit Sezernierung von Zytokinen, von denen das $\text{IFN-}\gamma$ einen besonderen Stellenwert einnimmt [Luty et al. 1999]. Ein durch $\text{IFN-}\gamma$ vermittelter Schutz

gegen Leberstadien wird durch CD4-positive T-Zellen, NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen vermittelt [Plebanski & Hill 2000]. Allerdings exprimieren Hepatozyten normalerweise keine für eine T-Zellaktivierung notwendigen kostimulatorischen Moleküle [Croft 1994]. Hohe IL-10-Plasmaspiegel in der Leber erschweren zusätzlich die Wiedererkennung von Antigen durch T-Zellen in den Leberzellen [Le Moine et al. 1999].

Die Rolle von CD4-positiven T-Zellen bei der Abwehr von hepatozytären Stadien ist nicht klar definiert. Im Tierversuch hat der Transfer von CD4-positiven T-Zellklonen und die Induktion von CD4-positiven T-Zellen durch Immunisierung mit definierten Leberstadiumspezifischen Peptiden gezeigt, daß diese Zellen eine sterile Immunität gegen Sporoziten vermitteln können [Rénia et al. 1993]. Beim Menschen wurden zytotoxische CD4-positive T-Zellklone von Freiwilligen isoliert, die mit irradierten Sporoziten immunisiert waren [Moreno et al. 1991]. Es wird vermutet, daß diese Zellen parasitäre Leberstadien direkt durch einen IFN- γ -abhängigen Weg eliminieren können [Zevering et al. 1994].

Gegen infizierte Hepatozyten können protektive CD8-positive zytotoxische T-Zellantworten generiert werden [Hoffman et al. 1989]. Im Gegensatz zu B-Zellantworten sind T-Zellantworten gegen Leberstadien in einem geringeren Maße von der Transmissionsstärke abhängig. Im allgemeinen werden in peripheren mononukleäre Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) von natürlich exponierten Personen nur wenige Leberstadiumspezifische zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T cells*, CTL) gefunden [Plebanski et al. 1997b]. Dennoch wird in endemischen Gebieten eine hohe Prävalenz an positiven T-Zellantworten beobachtet [Fidock et al. 1994c, Bottius et al. 1996b]. So sind für das LSA-1-Molekül starke, über CD8-positive T-Zellen vermittelte, lymphoproliferative und IFN- γ -Antworten in PBMC nachgewiesen worden [Connelly et al. 1997].

Immunität gegen Blutstadien. An der Entwicklung einer Immunität gegen erythrozytäre Stadien sind unspezifische sowie spezifische zelluläre und humorale Mechanismen beteiligt [Mohan & Stevenson 1998]. Einen Hinweis auf die Existenz unspezifischer Immunmechanismen lieferte die Beobachtung, daß bei ungehinderter Parasitenvermehrung bei nicht-immunen Infizierten nach 7 bis 12 Tagen - also innerhalb der Zeit, in der sich normaler-

weise eine spezifische Immunität entwickelt - theoretisch alle Erythrozyten infiziert sein müßten; tatsächlich sind es durchschnittlich etwa 0,1 % [Druilhe & Perignon 1994]. An der unspezifischen Immunität gegen Plasmodien sind v. a. Makrophagen, NK-Zellen und Neutrophile beteiligt [Ferrante et al. 1990, Orago & Facer 1991]. Durch Zellen des Makrophagen-Monozyten-Systems werden asexuelle Blutstadien, Merozoiten und Mikroaggregate phagozytiert [Sheagren et al. 1970]. Eine besondere Rolle spielt dabei die Milz als dasjenige Organ, in dem Makrophagen in engen Kontakt mit infizierten Erythrozyten kommen [Weiss 1990]. Neben direkter Phagozytose bekämpfen Blutmonozyten und Gewebemakrophagen die Parasiten einerseits durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, Lipid-Peroxiden, Stickstoffradikalen und lysosomalen Enzymen, andererseits durch die Expression von Komplement- und Fc-Rezeptoren [Ferrante et al. 1990]. Diese Effektorfunktionen von Makrophagen werden durch Zytokine wie IFN- γ und TNF α moduliert. Zusammen mit Anti-Plasmodium-Antikörpern agieren Monozyten auch im Rahmen einer Antikörper-abhängigen zellulären Inhibition, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer klinischen Immunität spielt [Bouharoun-Tayoun et al. 1990].

Die Bedeutung humoraler Immunmechanismen bei der Abwehr von Erythrozytenstadien ist seit langem bekannt [Cohen et al. 1961]. Die Übertragung von gereinigtem hyperimmunen IgG von Westafrikanern auf Probanden aus Thailand hat zu einer Reduktion der Parasitenlast geführt, ohne jedoch zu einer sterilen Immunität zu führen [Sabchareon et al. 1991]. *In-vitro*-Untersuchungen haben unterschiedliche inhibitorische Wirkungen von IgG aus dem Blut von Probanden bestimmter geographischer Regionen auf Parasiten anderer Regionen gezeigt [McGregor & Wilson 1988]. Kontrovers wird diskutiert, welche Antikörper eine Protektion gegen Plasmodien vermitteln können und inwieweit die Höhe der Antikörperspiegel oder die Qualität der Antikörper ein Maß für eine Immunität oder einer vorherigen Exposition sind [Mohan & Stevenson 1998].

Immunität gegen sexuelle Blutstadien umfaßt Antikörper-abhängige und Antikörper-unabhängige zelluläre Mechanismen [Cohen et al. 1961]. Obwohl gezeigt wurde, daß CD4-positive T-Zellen an Immunantworten beteiligt sind und eine zentrale Rolle bei der zellulären

Immunantwort gegen Plasmodien spielen [Troye-Blomberg 1994], ist es schwierig, T-Zellproliferation und Zytokinantworten bei immunen Probanden nachzuweisen. Während in einigen Studien eine inverse Korrelation zwischen Lymphozytenaktivierung und niedriger Parasitenlast beobachtet wurde, war es in anderen Untersuchungen oft nicht möglich, bei Probanden aus endemischen Regionen eine Lymphoproliferation festzustellen [Ho & Webster 1989, Riley et al. 1991]. Verantwortlich gemacht wurden hierfür eine Sequestration von T-Zellen im peripheren Gefäßbett, eine erhöhte Anzahl an CD8-positiven Suppressorzellen oder eine verminderte IL-2-Produktion [Cohen et al. 1961]. Es wird vermutet, daß CD4-positiv T-Zellen für die Aufrechterhaltung einer erworbenen Immunität gegen Plasmodien essentiell und daher die Definition von T-Zellantigenen und -epitopen für die Entwicklung einer Malariavakzine von besonderer Bedeutung sind [Good & Miller 1990]. Effektormechanismen von CD4-positiven T-Zellen umfassen die Induktion von *Memory*-Zellen, eine direkte Zytotoxizität und die Produktion von Zytokinen. Die Sekretion von IFN- γ ist mit einer protektiven Immunität gegenüber erythrozytären Stadien assoziiert. Zum einen bewirkt die IFN- γ -Produktion durch Erythrozytenantigen-spezifische CD4-positiv T-Zellen eine Protektion gegen Reinfektionen mit Plasmodien [Luty et al. 1999]. Zum anderen ist IFN- γ bei der Induktion von zytophilen IgG-Antikörpern gegen Blutstadien sowie der Entwicklung einer Antikörper-abhängigen zellulären Immunität beteiligt [Bouharoun-Tayoun et al. 1995].

2.6. Parasit-Wirt-Beziehung und Selektionsdruck durch Malaria

Epidemiologische Studien zeigen, daß genetische Einflußfaktoren des Wirtes bei der Manifestation der Plasmodieninfektion eine Rolle spielen. So ist bekannt, daß *P. vivax* - obwohl weltweit die zweithäufigste humanpathogene Parasitenspezies - in Westafrika nicht verbreitet ist, weil in dieser Region nur Duffy-Blutgruppe-negative Menschen leben und Erythrozyten dieser Personen gegen die Invasion von *P. vivax* resistent sind. Dieses Beispiel zeigt, daß monogene Varianten einen entscheidenden Effekt auf die Epidemiologie von Plasmodien haben können [Miller et al. 1975]. Ein weiteres Beispiel ist die

Beobachtung, daß das Risiko der *P.-falciparum*-Infektion und die Erkrankungshäufigkeit an Malaria und Schwere bei den Fulani kleiner ist als bei benachbarten Westafrikanischen Populationen [Modiano et al. 1996]. Diese epidemiologische Beobachtung wurde durch *in-vitro*-Untersuchungen unterstützt, bei denen gezeigt wurde, daß Antikörperspiegel gegen verschiedene Plasmodienantigene bei dem Stamm der Fulani höher waren als bei benachbarten Populationen, obwohl die epidemiologische Situation bei den untersuchten Bevölkerungsgruppen vergleichbar war [Riley et al. 1992].

In Regionen, in denen die Bevölkerung über Generationen dem Risiko einer letal verlaufenden Malaria ausgesetzt war, sind solche Genvarianten bedeutsam, die die Resistenz gegenüber der Erkrankung gestärkt haben. Fortbestand und Verbreitung dieser Varianten hängen davon ab, ob die Mortalität bei Malaria herabgesetzt wird. Eine Genmutation kann sich auch dann durchsetzen, wenn sie für den Träger auch Nachteile, z. B. im Sinne einer Prädisposition oder Manifestation einer anderen Erkrankung, zur Folge hat. Dies ist dann der Fall, wenn die biologische Fitneß, d. h. die Fähigkeit zu überleben und sich fortzupflanzen, unter den gegebenen Umweltbedingungen höher ist als die von den Individuen, die die betreffende Genvariation nicht aufweisen. Theoretisch können derartige Faktoren in jedem Stadium der Parasitenentwicklung wirksam werden. Bislang sind vorwiegend solche protektiven Mechanismen bekannt geworden, die mit Membran- und Stoffwechseleigenschaften der Erythrozyten in Zusammenhang stehen.

Ausgangspunkt der sogenannten "Malariahypothese" war die Beobachtung, daß bestimmte vererbare Erythrozytendefekte in polymorphen Genfrequenzen nur in Regionen vorkommen, in denen Malaria endemisch ist oder war [Haldane 1949]. Da die Nachteile der homozygoten Ausprägung pathologisch relevanter Erythrozytenanomalien (Sichelzellanämie, Ovalozytose, Thalassämie, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel [G6PD-Mangel]) durch den Vorteil einer partiellen Protektion bei einer Plasmodieninfektion nicht ausgeglichen werden, wurde postuliert, daß die erhöhte biologische Fitneß bei heterozygoten Genträgern wirksam werden muß (balancierter Genpolymorphismus). Für das Sichelzellhämoglobin und die Ovalozytose wurde das Postulat der Malariahypothese

vielfach belegt [Allison 1954, Flint et al. 1986]. Die Vermutung, daß auch der G6PD-Mangel mit einer relativen Resistenz gegen Malaria einhergehen könnte, wurde erstmals 1960 von Allison und Motulsky geäußert. Sie beschrieben eine hochsignifikante geographische Übereinstimmung zwischen der Prävalenz von Malaria tropica und dem G6PD-Mangel. Bezüglich der α -Thalassämie sind die bisherigen Ergebnisse uneinheitlich.

Unter den genetischen Faktoren, die eine Resistenz gegen schwere Verlaufsformen der Malaria tropica vermitteln, wurden auch bestimmte HLA-Genotypen beschrieben [Hill et al. 1991, Hill et al. 1992]. Eine Zwillingsstudie aus Gambia hat einen Effekt von im Bereich des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) gelegenen Genen auf das Risiko von Fieber bei Malaria beschrieben [Jepson et al. 1995, Jepson et al. 1997]. Die Assoziationen von HLA-Faktoren mit bestimmten Ausprägungsformen der Malaria tropica stellen - im Gegensatz zu den Erythrozytendefekten - Resistenzmechanismen im Rahmen einer spezifischen erworbenen Immunantwort dar. Eine Reihe anderer polymorpher Gene, die in die Entwicklung einer spezifischer Immunität involviert und damit von Bedeutung für den Verlauf einer Malaria sind, wurden ebenfalls identifiziert [Kwiatkowski 2000]. Zu diesen gehören u. a. IFN- γ , TNF α , IL-10, ICAM-1, iNOS [s. u.].

Neuere molekularbiologische und statistische Techniken ermöglichen durch Segregationsanalysen die Identifizierung von Kandidatengen, die für die Pathophysiologie der Malaria bedeutsam sind [Abel et al. 1992, Lander & Schork 1994]. Auf der Basis solcher Studien wurde unter anderem nachgewiesen, daß die Höhe einer *P.-falciparum*-Parasitämie mit Genvarianten des Chromosomenbereichs 5q31-q33 assoziiert ist [Garcia et al. 1998, Rihet et al. 1998]. Eine neuere Studie aus Papua Neuguinea hat mit Segregationsanalysen gezeigt, daß Antikörperhöhe und Lymphozytenproliferation dem Einfluß Mendelscher Effekte unterworfen sind [Stirnadel et al. 1999].

2.7. HLA-Gene und erworbene Immunität bei Malaria

Die Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes wurden ursprünglich durch Transplantationsexperimente mit Inzuchtstämmen von Mäusen definiert. Auch beim Menschen spielen sie eine Rolle im Zusammenhang mit Organtransplantationen. Ihre physiologische Bedeutung liegt in der Antigenpräsentation und Vermittlung der spezifischen Immunantwort bei Infektionen und letztlich der Unterscheidung von "Selbst" und "Nicht-Selbst" bei einem einzelnen Individuum. Von jedem Elternteil stammt ein Haplotyp des MHC, dessen Genloci Proteine aus der Gruppe der menschlichen Leukozytenantigene kodieren.

HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren CD8-positiven Zellen Antigene, die innerhalb körpereigener Zellen produziert und prozessiert werden. Während der Prozessierung werden intrazytoplasmatische Proteine zu Peptiden mit spezifischer Länge (8-10 Aminosäuren) und charakteristischem C-Terminus degradiert. Diese Peptide werden durch bestimmte Proteine vom Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum transportiert und binden dort an die HLA-Klasse-I-Moleküle. Der HLA-Peptidkomplex gelangt dann aktiv an die Zelloberfläche und wird dort CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen präsentiert. Die Folge ist die klonale Expansion der erkennenden T-Zelle.

HLA-Klasse-II-Moleküle sind in die Immunabwehr von Antigenen involviert, die von spezialisierten, Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) phagozytiert, prozessiert und präsentiert werden. Zu den APC gehören vor allem B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Gefäßendothelzellen, aktivierte T-Lymphozyten sowie verschiedene epitheliale und mesenchymale Zellen [Kappes & Strominger 1988]. Unter bestimmten Umständen können auch Zellen, die nicht zu den "professionellen" APC gerechnet werden, HLA-Klasse-II-Moleküle exprimieren. Im Zusammenhang mit Malaria ist besonders bedeutsam, daß Hepatozyten nach IFN- γ -Stimulation die Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen induzieren [Franco et al. 1988].

Im Rahmen der Prozessierung werden die aufgenommenen Proteine in Phagolysosomen zu Peptiden spezifischer Länge (13-24 Aminosäuren) verdaut. Nach der Fusion der Phagolysosomen mit HLA-Klasse-II-haltigen Vesikeln werden die HLA-Peptidkomplexe

aktiv an die Zelloberfläche transportiert und CD4-positiven T-Zellen präsentiert [Babbitt et al. 1985]. Die Bildung eines trimolekularen Komplexes aus HLA-Molekül, antigenem Peptid und TCR führt zu einer T-Helferzell-Aktivierung, die Voraussetzung für die Entwicklung einer spezifischen Immunantwort ist [Zinkernagel & Doherty 1979]. Aktivierte T-Zellen regulieren vor allem durch die Sekretion von Zytokinen und Vermittlung spezifischer Zelladhäsionen Wachstum und Differenzierung anderer Immunzellen, insbesondere die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten [Abbas et al. 1994]. Der TCR kann allerdings keine gelösten Fremdpeptide erkennen, sondern nur solche, die von APC durch HLA-Moleküle präsentiert werden (sog. HLA-Restriktion) [Zinkernagel & Doherty 1974]. Proteine der HLA-Klasse II sind außerdem an der Selektion des T-Zellrepertoires in der Thymusdrüse beteiligt [Kappler et al. 1987].

Genomische Organisation des MHC. HLA-Moleküle sind Heterodimere, deren Hauptanteil von Genen kodiert wird, die auf Chromosom 6 im Bereich des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes lokalisiert sind. Über 220 Gene, zum großen Teil mit immunologischen Funktionen, wurden bisher in mehreren lokalen Anhäufungen innerhalb des MHC gefunden [Aguado et al. 1999]. Die am besten charakterisierten Genloci werden in zwei Klassen eingeteilt, die sich in ihrem Aufbau unterscheiden: Eine Klasse-I-Region mit über 30 Loci am telomeren Ende des MHC und eine Klasse-II-Region mit ebenfalls mindestens 30 Loci am zentromeren Ende [Orr et al. 1979]. Beide Gruppen von Genen enthalten neben kodierenden Sequenzen eine Anzahl von Genfragmenten und Genen, die aufgrund von Mutationen keine funktionellen Proteine kodieren (Pseudogene) [Serenius et al. 1984]. Eine heterogene Ansammlung von über 35 Genen wird als MHC-Klasse-III-Komplex bezeichnet. Einige dieser Gene kodieren für Komplementfaktoren, das Hitzeschockprotein (Hsp 70), das Lymphotoxin (LT), das Lymphotoxin β (LT β) und die Tumornekrosisfaktoren. Ein Großteil der Gene des MHC kodiert Proteine, deren Funktion noch unbekannt ist. Insgesamt nimmt der MHC des Menschen ein DNA-Segment von über 3500 Kilobasenpaaren (kbp) ein [Aguado et al. 1999].

Innerhalb der Klasse-II-Region sind bisher die sechs D-Familien DM, DN, DO, DP, DQ und DR beschrieben worden [Aguado et al. 1999], die jeweils eine α - und eine oder mehrere β -Ketten kodieren. Dazwischen liegen Gene, die vor kurzem entdeckt wurden und deren Produkte in Peptidgenerierung und Antigenprozessierung von APC einbezogen sind. Am 5'-Ende der HLA-D-Gene liegen Nukleotidsequenzen, die an der Genregulation wie Initiierung, transkriptioneller Aktivierung und Modulation der Expression beteiligt sind. Das erste Exon kodiert die Führungs- und Signalsequenz, die den gerichteten Transport des entstehenden Proteins aus dem Endoplasmatischen Retikulum sicherstellt und später abgespalten wird. Die zweiten - in der vorliegenden Arbeit untersuchten - variablen Exons kodieren jeweils die Antigenbindungsregion. Am 3'-Ende des Locus liegen das Exon, das die externe Domäne kodiert und die Exons, welche die transmembrane und zytoplasmatische Region kodieren [Korman et al. 1985].

Innerhalb des zweiten Exons unterscheidet man konservierte von hypervariablen Regionen. Die hypervariablen Regionen unterscheiden sich bei einzelnen Individuen durch Basenaustausche, die die verschiedenen Allele definieren und so den genetischen Polymorphismus des Locus bedingen.

Polymorphismus des MHC. Ein Hauptcharakteristikum des MHC ist die große Zahl von Allelen, die in natürlichen Populationen an einzelnen Loci vorkommen. Erstmals wurde der HLA-Polymorphismus in den 50er Jahren von *Payne*, *Dausset* und anderen bei HLA-A-Antigenen beschrieben [Dausset 1954]. Bei Vertebraten gehört der MHC zu den Genregionen mit dem stärksten Polymorphismus. Dieser genetische Polymorphismus macht durch die unterschiedliche Ausprägung der Genorte bei verschiedenen Individuen Assoziationsuntersuchungen dieses Bereiches möglich. Innerhalb des MHC sind bisher (Oktober 2000) 185 HLA-A, 381 HLA-B, 91 HLA-C, 5 HLA-E, 1 HLA-F und 14 HLA-G (Klasse-I-Allele) und 2 DRA1-, 317 DRB1-, 20 DQA1-, 45 DQB1-, 19 DPA1-, 89 DPB1-, 4 DMA-, 6 DMB-, 8 DOA- und 8 DOB-Allele (Klasse-II-Allele) identifiziert worden [<http://www.anthonynolan.com/HIG/index.html>]. Weitere monomorphe oder oligomorphe MHC-Loci sind bekannt.

Gene der β -Kette (DRB, DQB1, DPB1) weisen eine größere allelische Vielfalt auf als α -Ketten-Gene (DRA1, DQA1, DPA1).

Der Genpolymorphismus ist im allgemeinen bei Afrikanern weit ausgeprägter als bei Kaukasiern [*Cannings & Cavalli-Sforza* 1973]. Auch der Polymorphismus im Bereich des MHC ist bei afrikanischen Populationen besonders ausgeprägt [*Hurley* 1993, *Meyer et al.* 1994, *Meyer et al.* 1994, *May et al.* 1996, *Schnittger et al.* 1996, *Schnittger et al.* 1997, *May et al.* 1998a]. Hierfür wird besonders der Selektionsdruck von Infektionskrankheiten wie der Malaria mit einem schweren - oft tödlichen - Verlauf vor dem Reproduktionsalter verantwortlich gemacht [*Haldane* 1949]. Für eine Selektion von Genvarianten im MHC spricht die Beobachtung, daß nicht-synonyme Mutationen von MHC-Genen (Mutationen, die zu Aminosäureaustauschen führen), häufiger als synonyme Mutationen sind (Mutationen, die nicht zu Aminosäureaustauschen führen) [*Hughes & Nei* 1988].

Die große Anzahl ähnlich strukturierter Loci des MHC scheint durch eine Reihe von Duplikationen aus einem Vorläufergen infolge von Rekombinationen entstanden zu sein. Verschiedene Mechanismen haben an der Entstehung der allelischen Vielfalt der einzelnen Loci mitgewirkt. Mutationen, Rekombinationen, Inversionen und Genkonversionen sind für diesen Bereich beschrieben worden [*Erlich & Gyllensten* 1991].

Auch für den Erhalt des MHC-Polymorphismus werden unterschiedliche Prozesse verantwortlich gemacht. Eine wichtige Rolle wird Mechanismen zugeschrieben, die als überdominante Selektion und frequenzabhängige Selektion bezeichnet werden [*Klein* 1986]. Bei überdominanter Selektion vermutet man einen Vorteil heterozygoter Individuen (sog. *heterozygote advantage*), weil diese ein breiteres Spektrum an Antigenen binden und präsentieren können, und dadurch theoretisch eine größere Vielfalt an Infektionserregern abwehren können [*Klein & Figueroa* 1986]. Eine frequenzabhängige Selektion wird bei Individuen angenommen, die in der Population relativ selten vorkommende und daher wahrscheinlich in jüngerer Zeit entstandene Allele tragen. Diese Individuen werden dadurch bevorteilt, daß Infektionserreger nicht genügend Zeit hatten, sich ihrerseits dem erfolgreichen Abwehrmechanismus des Allelträgers anzupassen [*Bodmer* 1972]. Bei der

Maus wurde ein gerichtetes Paarungsverhalten beobachtet, das Inzucht und dadurch homozygote MHC-Kombinationen vermeidet (sog. reproduktive Selektion). Als Signalstoffe für die Erkennung verwandter Tiere wurden MHC-abhängige Geruchsstoffe verantwortlich gemacht [*Yamazaki et al.* 1976].

Wie ein solch ausgeprägter Polymorphismus sich gerade in der MHC-Region im Gegensatz zu anderen Bereichen des Genoms entwickeln konnte, war lange Zeit umstritten. Bis vor kurzem wurde die Allelvielfalt als Folge einer erhöhten Mutationsrate und spezieller Rekombinationsmechanismen im Bereich des MHC, sowie eines erhöhten Selektionsdrucks dieser Gene gedeutet. Wie inzwischen bekannt ist, liegt die durchschnittliche Rekombinationshäufigkeit im gesamten MHC so hoch wie im übrigen menschlichen Genom.

Entstehung und Erhalt des Polymorphismus können vor allem aus zeitlichen Gründen kaum innerhalb einer Spezies vollzogen worden sein [*Gyllensten & Erlich* 1989]. Besondere Rekombinationsmechanismen, die zu einer schnelleren Bildung des Polymorphismus führen könnten, sind in diesem Bereich nie nachgewiesen worden. Daher wurde ein Modell entwickelt, nach dem der Allelpolymorphismus von einer Spezies auf die folgende Spezies weitergegeben wird. Nach dieser sogenannten "Transspezieshypothese" hat sich der Polymorphismus in mehreren Millionen Jahren durch natürliche Selektion und ohne besondere Mechanismen entwickeln können [*Klein* 1987].

Struktur der HLA-Klasse-II-Moleküle. HLA-Klasse-II-Moleküle setzen sich aus einer ähnlich strukturierten α - (32 bis 34 kD) und β -Kette (29 bis 32 kD) zusammen und sind als heterodimere Glykoproteine an der Zellmembran nicht-kovalent gebunden [*Kaufman et al.* 1984]. Die beiden α - und β -Polypeptidketten liegen mit dem in Richtung des Carboxy-Endes der Aminosäuresequenz (C-terminal) gelegenen Anteil intrazellulär und mit den in Richtung des Amino-Endes (N-terminal) gelegenen zwei Dritteln extrazellulär [*Giles & Capra* 1985]. Röntgenkristallographische Analysen haben die dreidimensionale Struktur des HLA-Moleküls erstmals bei Klasse-I-Proteinen aufgedeckt [*Bjorkman et al.* 1987]. HLA-Klasse-II-Moleküle sind in ihrer Struktur den HLA-Klasse-I-Molekülen sehr ähnlich [*Brown et al.*

1993]. Man kann eine Antigenbindungsregion (*antigen binding site*, ABS), eine Immunglobulin-ähnliche, eine transmembrane und eine zytoplasmatische Region unterscheiden, die den entsprechenden kodierenden Sequenzen der MHC-Klasse-II-Gene zuzuordnen sind. Aufgrund der großen Strukturhomologie der konstanten Domänen zu den Immunglobulinen werden Klasse-II-Moleküle zur Immunglobulin-Superfamilie gezählt [Travers *et al.* 1984].

Der extrazelluläre Abschnitt der HLA-Klasse-II-Proteine wird in vier Segmente aus etwa 90 Aminosäuren unterteilt, die α 1- und α 2-Domäne bzw. β 1- und β 2-Domäne genannt werden. Die α 1- und β 1-Domänen bilden zusammen die N-terminal gelegene ABS, eine seitlich offene Furche aus einer achtsträngigen β -Faltblattstruktur als Basis und zwei antiparallelen α -Helices als seitliche Ränder [Brown *et al.* 1993]. Die Aminosäuresequenz in der ABS und die Struktur des gebundenen Peptids bestimmen in hohem Maße die Spezifität der gebundenen Antigene und somit die Antigenerkennung durch den TCR [Bjorkman & Parham 1990]. Die ABS wird von einer Genregion mit ausgeprägtem Polymorphismus kodiert, dem zweiten variablen Exon (α 1- bzw. β 1-Exon). Der genetische Polymorphismus des zweiten Exons beeinflusst so die chemisch-physikalische Oberfläche der Furche und damit Spezifität und Affinität von Peptidbindung und T-Zellerkennung.

Die übrigen Domänen der HLA-Klasse-II-Moleküle werden in eine Immunglobulin-ähnliche Region (α 2- und β 2-Domäne) mit geringfügigen Unterschieden des kodierenden α 2- und β 2-Locus, in eine hydrophile transmembrane Region und in eine hydrophile zytoplasmatische Region eingeteilt.

Assoziationen von MHC-Klasse-II-Allelen mit Erkrankungen. In Assoziationsstudien wird die Häufigkeit polymorpher Marker bei Patienten mit deren Häufigkeit in einer Kontrollgruppe verglichen. Die signifikante Assoziation eines untersuchten Allels mit einer Erkrankung deutet entweder auf eine ursächliche Beteiligung dieses Gens oder auf eine Kopplung des Markerallels mit einem disponierenden Allel hin. Der Nachweis einer Assoziation bietet somit einen wertvollen Hinweis auf ein mögliches, für eine Krankheit disponierendes Gen.

In den 70er Jahren häuften sich die Berichte, daß MHC-Gene nicht nur für Transplantatabstoßungen verantwortlich sind, sondern auch mit bestimmten Erkrankungen des Menschen assoziiert sind. Die meisten Assoziationen wurden bisher bei Autoimmunerkrankungen nachgewiesen [*Klein 1986, Heard 1994*].

Bedeutung von HLA-Varianten bei tropenmedizinischen Infektionen. Beziehungen zwischen bestimmten HLA-Varianten und klinischen Manifestationen von Infektionserkrankungen sind schwer zu bestimmen [*Klein 1991, Klein & O'Huigin 1994*]. Dennoch wurden in den letzten Jahren Assoziationen zwischen Infektionserkrankungen, auch tropenmedizinischen Infektionen, und HLA-Genvarianten beschrieben.

So wurde bei Probanden, die mutmaßlich immun (engl. *putatively immune*) gegenüber *Onchocerca volvulus*, dem Erreger der besonders in Westafrika verbreiteten Flußblindheit (Gewebsfilariose), waren, häufiger der MHC-Klasse-II-Haplotyp DQA1*0501-DQB1*0301 nachgewiesen als bei Patienten mit manifester Infektion [*Meyer et al. 1996*]. Umgekehrt wurde der Haplotyp DQA1*0101-DQB1*0501 und, unabhängig, das Allel DQB1*0201 häufiger bei Patienten mit generalisierter Onchozerkose gefunden. Bei der gleichen Studiengruppe zeigte sich, daß Patienten, die nach einer Infektion mit *O. volvulus* manifest erkrankten, häufiger Träger der Aminosäure Methionin an Position 11 (Met-11) des HLA-Locus DPA1 waren [*Meyer et al. 1994, May 1995*]. Alanin an Position 11 (Ala-11) war dagegen mit relativem Schutz vor der Erkrankung assoziiert.

Ähnlich wie bei der Flußblindheit hatten Probanden einer Studiengruppe aus Gabun mit einem Methionin an Position 11 des DPA1-Locus häufiger eine Blasenbilharziose nach einer Infektion durch den Trematoden *Schistosoma haematobium* [*May et al. 1998b*]. Im Gegensatz dazu waren Probanden mit einem Alanin an Position 11 seltener mit diesem Erreger infiziert. Zusätzlich hatten Ala-11-positive Personen seltener sonographisch faßbare Zeichen einer Blasenwandpathologie als Ala-11-negative Patienten. Zwei Jahre nach spezifischer antischistosomaler Therapie war die Reinfektionsrate bei DPA1*0301-positiven Individuen höher als bei den Probanden, die das DPA1*0301-Allel nicht trugen [*May et al. 1998b*].

Ein Zusammenhang zwischen HLA-Genotypen und dem Verlauf humaner Parasiten- oder Tropeninfektionen wurde - abgesehen von den in dieser Arbeit zusammengefaßten Studien - unter anderen untersucht bei: Lepra [Meyer et al. 1998]; Toxoplasmose [Mack et al. 1999]; Leishmaniose [Petzl-Erlor et al. 1991, Singh et al. 1997]; Amöbenruhr und -leberabszeß [Arellano et al. 1987, Arellano et al. 1991, Valdez et al. 1999]; Schistosomiasis [Secor et al. 1996, Waine et al. 1998]; Onchozerkose [Murdoch et al. 1997]; lymphatischer Filariasis [Mohamed et al. 1987, Romia et al. 1988, Mohamed et al. 1992, Yazdanbakhsh et al. 1995]; Strongyloidiasis [Sato et al. 1999]; Chagas-Erkrankung [Fernandez-Mestre et al. 1998] und alveolärer Echinokokkose [Gottstein & Bettens 1994, Eiermann et al. 1998].

2.8. Polymorphe Nicht-HLA-Gene und erworbene Immunität bei Malaria

2.8.1. Tumornekrosisfaktor-Alpha

Fieber ist Teil der natürlichen Wirtsantwort bei Malaria und für die Abwehr der Parasiten vor allem zu Beginn der Infektion während des exponentiellen Wachstums der Parasiten bedeutsam [Kwiatkowski & Greenwood 1989b, Brandts et al. 1997, Gravenor & Kwiatkowski 1998]. Die pyrogenen Eigenschaften von TNF α im Zusammenhang mit Malaria wurden *in vitro* [Kwiatkowski & Greenwood 1989b] und *in vivo* [Karunaweera et al. 1992, Kwiatkowski et al. 1993] nachgewiesen. Weitere antiparasitäre Effekte vermittelt TNF α durch die Stimulation von Neutrophilen und Makrophagen zur Produktion von Sauerstoffradikalen, die das Wachstum von *P. falciparum in vitro* hemmen [Wozencraft et al. 1984].

Die bedeutende Rolle von TNF α in der Pathogenese der Malaria wurde in vielen Untersuchungen demonstriert [Kern et al. 1989, Kwiatkowski et al. 1989a]. Einerseits haben Studien gezeigt, daß eine adäquate TNF α -Konzentration im Plasma und eine hohe TNF α -Produktionskapazität einen positiven Einfluß auf den Verlauf einer Malaria haben [Kremsner et al. 1995, Mordmüller et al. 1997], andererseits sind inadäquat erhöhte TNF α -Spiegel mit

Malariakomplikationen wie zerebraler Malaria oder Anämie assoziiert [Grau et al. 1989, Shaffer et al. 1991, Rockett et al. 1992].

Ein zur Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ antagonistischer Effekt scheint bei Malaria durch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 vermittelt zu werden. IL-10 reguliert die HLA-Klasse-II-Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen herunter, inhibiert die NO-Produktion, vermindert T-Zellpriming und T-Zellproliferation und supprimiert die Produktion von Th1-Zytokinen wie $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor) und LT (Lymphotoxin) durch T-Zellen [Plebanski & Hill 2000]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß ein niedriger Quotient aus den Plasmakonzentrationen des Th2-Zytokins IL-10 und des Th1-Zytokins $\text{TNF}\alpha$ mit einer schweren Anämie bei Malaria assoziiert ist [Kurtzhals et al. 1998, Othoro et al. 1999].

In der Promotorregion des $\text{TNF}\alpha$ -Gens sind eine Reihe von Einzelmutationen nachgewiesen worden, von denen offenbar einige die Expression des $\text{TNF}\alpha$ -Gens beeinflussen können [Wilson et al. 1997, Knight et al. 1999]. In einer neueren Arbeit wurde mit Reportergenkonstrukten in verschiedenen humanen Zelllinien nachgewiesen, daß bei dem Allel $\text{TNF}^{-308\text{A}}$ die Genexpression nur in Anwesenheit der 3'-untranslatierten Region erhöht ist [Abraham & Kroeger 1999]. Ob Mutationen im Bereich des $\text{TNF}\alpha$ -Promotors das Verhältnis von IL-10- und $\text{TNF}\alpha$ -Plasmaspiegel beeinflussen können, ist bisher nicht untersucht worden, ist jedoch Teil der vorliegenden Arbeit. Assoziationen des Alleles $\text{TNF}^{-308\text{A}}$ mit Infektionskrankheiten wie Leishmaniose, lepromatöser Lepra, Trachom und Meningokokkenseptikämie wurden beschrieben [Knight & Kwiatkowski 1999].

2.8.2. Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1

Parasitenmaterial, das über Glycosylphosphatidylinositol-Anker an die Wirtszellmembran gebunden ist, kann die Expression von Zytoadhärenzliganden in Endothelzellen hochregulieren [Schofield et al. 1996]. Zu diesen Liganden gehört auch das Interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), das die Bindung von infizierten Erythrozyten an Endothelien kleiner Gefäße vermittelt und deshalb in der

Pathophysiologie der Malaria eine besonders wichtige Rolle spielt [Kap. 2.3] [Berendt et al. 1989]. In immunhistochemischen Präparaten von Patienten mit zerebraler Malaria werden ICAM-1 und parasitierte Erythrozyten miteinander assoziiert gefunden [Turner et al. 1994]. Parasiten, die von Patienten mit zerebraler Malaria isoliert werden, haben *in vitro* eine größte Affinität zu ICAM-1 als solche, die von Patienten ohne schwere Komplikationen gewonnen wurden. [Newbold et al. 1997]. Weiterhin ist die Bindungskapazität von ICAM-1 an parasitierte Erythrozyten größer bei Patienten mit schwerer Malaria als bei solchen mit milder Malaria [Craig et al. 1997]. Bei der Bindung von infizierten Erythrozyten an ICAM-1 kommt es zu einem "Roller" der Erythrozyten an dem Endothel, ähnlich der Bewegung von polymorphnukleären Leukozyten bevor sie in einen entzündeten Bereich penetrieren [Nash et al. 1992]. Die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen wird durch $TNF\alpha$ und andere Zytokine induziert. Bisher wurde eine Genvariante beschrieben (ICAM-1^{Kilifi}), die bei Afro-Amerikanern Nordamerikas und Kenianern eine Genfrequenz von über 30 % aufweist, bei Kaukasiern aber nicht vorkommt [Fernandez-Reyes et al. 1997].

2.8.3. Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

Die Infektion durch Plasmodien induziert eine Zytokinkaskade, an deren Ende die Ausschüttung von Substanzen mit antiparasitären Eigenschaften, u. a. durch die Sekretion von hochaktiven Stickstoffradikalen, steht. Die wichtige Rolle von NO und seiner Folgeprodukte bei der Abwehr von Malariaparasiten aller Stadien wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt [Mellouk et al. 1991, Nussler et al. 1991, Rockett et al. 1991, Taylor-Robinson et al. 1993, Jacobs et al. 1995].

NO wird von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) durch Umwandlung von Arginin in Citrullin gebildet. Die induzierbare Isoform der NOS (iNOS oder NOS-2) wird hauptsächlich auf Transkriptionsebene durch inflammatorische Zytokine und Toxine reguliert [Nathan 1997]. Die Inhibition der iNOS führt zu einer höheren Mortalität bei Mäusen mit *P. vinckeii*-Infektion [Kremsner et al. 1992]. Beim Menschen ist die NO-Plasmakonzentration eng mit parasitologischen Parametern und dem klinischen Verlauf der Malaria assoziiert [Kremsner

et al. 1996]. In der Promotorregion des iNOS-Gens wurde vor kurzem eine Punktmutation beschrieben, die bei heterozygoten Genträgern eine Protektion vor schwerer Malaria vermittelt [*Kun et al.* 1998].

2.9. Polymorphe Erythrozytenvarianten und angeborene Immunität bei Malaria

Einige Anomalien der roten Blutkörperchen weisen eine weitgehend überlappende geographische Verteilung mit dem Vorkommen von *P. falciparum* auf, woraus gefolgert wurde, daß natürliche Selektion zur Verbreitung dieser Erythrozytenanomalien geführt hat [*Flint et al.* 1998]. Diese Anomalien betreffen das Hämoglobin (Sichelzellerkrankung, α -Thalassämie), die Erythrozytenmembran (Ovalozytose, Blutgruppenantigene) oder Enzyme (G6PD-Mangel).

2.9.1. Sichelzellanämie

Das Sichelzellmerkmal wird durch eine informative Mutation der β -Globinkette (Hämoglobin S, HbS) verursacht. Dieser genetische Defekt führt zu einer verminderten Löslichkeit des Hämoglobinmoleküls unter deoxygenierten Bedingungen. Bei homozygoten Genträgern (HbSS) kommt es bei einem Abfall des Sauerstoffdrucks zur Bildung von langkettigen Polymeren, die zu Membranveränderungen und zur Erhöhung der Rigidität der roten Blutzellen führen. In der Folge führen diese Veränderungen zu hämolytischer Anämie und Krisen mit Infarkten kleiner Gefäße, durch die es zu einem graduellen Prozeß schwerer Organschädigungen kommt. Das resultierende Krankheitsbild ist die Sichelzellanämie.

In vielen klinischen und epidemiologischen Studien wurde gezeigt, daß Patienten mit Sichelzellmerkmal zwar mit *P. falciparum* infiziert werden, aber seltener schwer an Malaria erkranken und seltener an der Erkrankung sterben als Infizierte mit normalem Hämoglobin [*Allison* 1954]. Dieser Schutz besteht besonders gegenüber der zerebralen Malaria und

weniger gegenüber schwerer Anämie; aber auch ein relativer Schutz vor milden Manifestationen der Malaria wurde beschrieben [Hill *et al.* 1991, Marsh 1992].

Als Hauptmechanismus für die partielle Malariaresistenz wird eine reduzierte Replikation der Parasiten innerhalb der Erythrozyten [Pasvol *et al.* 1978] und eine beschleunigte Zerstörung parasitierter Erythrozyten vermutet, die durch das gehäufte Sicheln der Erythrozyten unter oxidativem Streß verursacht wird [Luzzatto *et al.* 1970]. Umgekehrt begünstigt eine Infektion mit Plasmodien das Sicheln der Zellen. Elektrolyt-, Flüssigkeits- und pH-Verschiebungen der Erythrozyten sowie hypoxische Membranveränderungen sind an der Parasitenschädigung beteiligt. *In vitro* wird die Invasion und das Wachstum von Plasmodien in HbAS- und HbSS-Zellen behindert. Die Mechanismen, die zu dieser Hemmung führen, sind nicht vollständig geklärt [Carlson 1999]. In Frage kommen jedoch besonders Schädigungen der Parasiten durch physikalische Effekte der Polymerisation des HbS, Kaliumverlust oder Wasserverlust bei gesichelten Zellen sowie eine Erhöhung der Hämoglobinkonzentration. Diese Effekte manifestieren sich vor allem bei niedrigem Sauerstoffdruck.

Trotz der Wachstumshemmung der Parasiten in HbAS- und HbSS-Erythrozyten werden Personen mit Sichelzellanämie mit Malariaerregern infiziert. Daher muß es weitere Mechanismen geben, die eine Protektion vor schweren Komplikationen vermitteln. Es ist bekannt, daß HbAS-Individuen höhere Antikörpertiter gegen Neoantigene haben, die auf den Membranen infizierter Erythrozyten exprimiert werden [Marsh *et al.* 1989]; allerdings ist unklar, inwieweit diese Antikörper protektive Eigenschaften haben. Es könnte sein, daß Modifikationen der Erythrozytenstruktur adhäsive Eigenschaften der Zellen verändern (*Rosetting* und *Zytoadhärenz*). So zeigen nicht-parasitierte HbAS-Erythrozyten eine übernormal starke Bindung an kultivierte Endothelzellen [Hebbel 1991]. Andererseits adhären parasitierte HbSS-Zellen weniger stark an Endothelzellen als parasitierte HbAA-Erythrozyten [Rowland *et al.* 1993]. Auch bei HbAS-Trägern trägt wahrscheinlich vor allem die verminderte Rosettenbildung zur Protektion vor zerebraler Malaria bei [Carlson 1999].

In Regionen mit hoher Malariainzidenz hat der selektive Vorteil von Trägern des Sichelzellmerkmals (HbAS) bezüglich einer Plasmodieninfektion die verminderte biologische Fitness von Personen mit Sichelzellanämie (HbSS) ausgeglichen und dort zu einem balancierten Polymorphismus des HbS-Gens geführt. Aufgrund der hohen Genfrequenz von HbS in Äquatorialafrika (etwa 20%) und der relativ starken Protektion vor Malaria wurde der HbS-Status in den geplanten Studien mitbestimmt und mit den anderen untersuchten protektiven Faktoren verglichen.

2.9.2. α -Thalassämie

α -Thalassämien sind angeborene autosomal rezessive Defekte mit fehlender oder verminderter Synthese der α -Globin-Polypeptidketten; sie gehören weltweit zu den häufigsten Erbkrankheiten des Menschen. Thalassämien entstehen durch Mutationen von Genen, die an der Synthese der Hämoglobine beteiligt sind. Die α -Globingene, $\alpha 1$ und $\alpha 2$, liegen auf dem Chromosom 16 als Duplikat vor. Somit finden sich in jeder diploiden Zelle je zwei $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Globingene, die für identische α -Globine kodieren. Mehr als 30 unterschiedliche Mutationen des α -Globingen-Komplexes sind beschrieben worden. Abhängig von der Zahl der funktionsfähigen Gene können vier verschiedene α -Thalassämiesyndrome, vom hämatologisch unauffälligen Genträger bis hin zur schwersten Form, dem *Hydrops fetalis*, auftreten. Pathophysiologische Grundlage der α -Thalassämien ist die ungleiche Synthese bzw. Stabilität von α -Globinketten. Überschießend gebildete Globine präzipitieren und verursachen eine Hämolyse. Unter den vier bekannten Deletionen, die eine α -Thalassämie verursachen, ist die Variante $-\alpha^{3.7}$ in Afrika am häufigsten verbreitet.

Vor 50 Jahren wurde von Haldane, ausgehend von Daten über den protektiven Effekt der α -Thalassämie gegenüber der Malaria, die "Malariahypothese" formuliert [Haldane 1949]. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, ob die partielle Protektion bei Malaria durch Heterozygotie oder Homozygotie vermittelt wird [Clegg & Weatherall 1999]. Die hohe Frequenz der Varianten in Malariagebieten und die milde Symptomatik bei heterozygoter α -Thalassämie deuten eher auf einen selektiven Vorteil von Homozygoten bei einer Infektion mit Plasm-

dien hin. Nur wenige epidemiologische Daten auf DNA-Basis sind bezüglich der Verteilung der α -Thalassämien erhältlich. Eingehendere Untersuchungen sind notwendig, um genauere Aussagen zur Malariaresistenz bei α -Thalassämien treffen zu können [Weatherall 1997].

Welche Mechanismen für die relative Protektion vor schweren Malariakomplikationen bei Personen mit α -Thalassämie verantwortlich sind, ist nicht sicher bekannt. Ob *in vitro* bei thalassämischen Erythrozyten das Parasitenwachstum - wahrscheinlich aufgrund des niedrigen Hämoglobingehaltes und der Mikrozytose - gehemmt ist, ist umstritten [Luzzatto 1979]. Eine neuere Studie hat mittels Flußzytometrie eine solche verminderte Parasitenmultiplikation nachgewiesen [Pattanapanyasat et al. 1999]. Zusätzlich ist der bei thalassämischen Patienten erhöhte Anteil von HbF-Zellen für eine verminderte Parasitenentwicklung verantwortlich gemacht worden [Pasvol et al. 1977]. Bei thalassämischen Zellen oder Zellen mit hohem HbF-Gehalt kommt es zu oxidativem Streß, der zur Membranschädigung und zum Verlust von zellulärem Kalium führen kann [Friedman 1979]. Neben der direkten Wachstumshemmung der Parasiten in thalassämischen Erythrozyten wird wahrscheinlich - ähnlich wie bei der Sichelzellerkrankung - die Rosettenbildung vermindert [Carlson 1999].

In einer neueren Studie aus Vanatu wurde gezeigt, daß wahrscheinlich auch veränderte immunologische Prozesse bei Personen mit α -Thalassämie zur Protektion vor schweren Verläufen der Malaria beitragen. Vor allem junge Kinder mit homozygoter α -Thalassämie hatten in dieser Untersuchung ein höheres Risiko, an einer milden *P.-falciparum*- oder *P.-vivax*-Malaria zu erkranken, als Hb-normale Kinder [Williams et al. 1996]. Die Autoren postulierten, daß diese erhöhte Suszeptibilität insbesondere der weniger pathogenen Spezies *P. vivax* zu einer früheren Entwicklung einer Immunität führt, die die Kinder später vor schweren Komplikationen einer *P.-falciparum*-Malaria schützt.

2.9.3. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel des Erythrozyten ist in seiner schwersten Ausprägung Ursache einer chronischen hämolytischen Anämie. Weniger stark

ausgeprägter Mangel führt bei Infektionen oder Einnahme von bestimmten Medikamenten oder Genuß bestimmter Nahrungsmittel durch die Denaturierung von Membranproteinen zu akuter Hämolyse. G6PD-Mangel wird durch Einzelmutationen im kodierenden Teil des Gens verursacht. Über 70 G6PD-Mutanten wurden bislang nach molekularbiologischen Kriterien charakterisiert; nach biochemischen und anderen Verfahren scheint die Anzahl an unterschiedlichen G6PD-Varianten noch deutlich größer zu sein.

In Afrika südlich der Sahara kommen drei unterschiedliche G6PD-Varianten mit polymorphen Genfrequenzen vor. G6PD B ist die Normvariante (Frequenz in Afrika 50-60%) mit vollständiger Enzymaktivität. Die zweite Variante, G6PD A, wurde bisher nur in Populationen afrikanischen Ursprungs gefunden und zeigt eine geringgradig reduzierte Enzymaktivität, die jedoch noch im Normbereich liegt (80% von G6PD B). Die Genträger sind klinisch unauffällig. Der dritte Typ, G6PD A⁻, ist eine Variante mit leichtem Enzymmangel (8-20% von G6PD B) und in Afrika ebenso weit verbreitet wie G6PD A (Frequenz 20-25%). Hemi- und homozygote Genträger von G6PD A⁻ können hämolytische Krisen unter oxidativem Streß, z. B. ausgelöst durch Infektionen oder Einnahme bestimmter Medikamente, entwickeln. In afrikanischen Bevölkerungen finden sich aufgrund des X-chromosomalen Erbgangs drei polymorphe G6PD-Varianten in neun verschiedenen Genotypen: bei Männern G6PD B, A und A⁻; bei Frauen die homozygoten Kombinationen G6PD B/B, G6PD A/A und G6PD A⁻/A⁻ sowie die heterozygoten Kombinationen G6PD B/A, G6PD B/A⁻ und G6PD A/A⁻. Die Enzymaktivität der Genotypen G6PD B/A⁻ und G6PD A/A⁻ ist, abhängig vom Zahlenverhältnis der Zellpopulationen und dem G6PD-Typ, intermediär.

Für den erythrozytären G6PD-Mangel gelang der Nachweis einer Teilresistenz gegenüber Malaria bisher nicht eindeutig, allerdings sprechen verschiedene Beobachtungen für einen solchen Zusammenhang. Die geographische Assoziation von Malaria und G6PD-Mangel wurde von *Allison* und *Motulsky* 1960 beschrieben und in vielen Studien aus verschiedenen Regionen bestätigt. G6PD-Defizienzen werden durch eine große Anzahl von verschiedenen Punktmutationen verursacht, die jeweils regional unterschiedlich in polymorphen Genfrequenzen vorkommen. Die Mutationen müssen sich daher unabhängig voneinander

durch einen selektiven Vorteil ausgebreitet haben und sind offenbar nicht aus der selben Ursprungsvariante durch genetische Drift entstanden [Luzzatto & Mehta 1995].

Die Gesamtbeurteilung der unterschiedlichen und teilweise gegensätzlichen Studienergebnisse ist aufgrund der abweichenden Studienbedingungen, besonders der unterschiedlichen Verfahren zur Identifizierung der verschiedenen G6PD-Varianten, schwierig. Die Bedeutung von G6PD als positiver selektiver Faktor hinsichtlich der Malaria scheint jedoch deutlich geringer zu sein als die von HbS. Es ist nicht gesichert, ob *P. falciparum* das hauptsächlich verantwortliche selektive Element für G6PD-Mangel ist oder war. Die genetische Situation für G6PD ist komplex, da mehrere unterschiedliche Alle in verschiedenen Populationen vorkommen und der Genlocus X-chromosomal gelegen ist. Daher sind mehrere unterschiedliche Selektionsmechanismen für G6PD vorstellbar: a) Selektion von Trägern defizienter G6PD-Varianten [Ruwende et al. 1995]; b) eine unterschiedliche Selektionsrate bei hemizygoten Männern und homozygoten Frauen; c) selektiver Vorteil für heterozygote Frauen [Bienzle et al. 1972].

Zum jetzigen Zeitpunkt konkurrieren mehrere Erklärungsmodelle zur möglichen Protektion vor Malaria durch G6PD-Mangel. Zum einen wird eine direkte Schädigung der Parasiten durch oxidative Schädigung in G6PD-defizienter Erythrozyten angenommen [Clark & Hunt 1983]. Untersuchungen haben gezeigt, daß *in vivo* [Luzzatto et al. 1969] und *in vitro* [Roth et al. 1983] das Wachstum der Plasmodien in G6PD-defizienten Zellen vermindert ist. In anderen Studien konnte diese Wachstumsminde rung gar nicht [Arese et al. 1994] oder nur unter oxidativen Bedingungen bestätigt werden [Friedman 1979]. Weitere Experimente haben gezeigt, daß nicht die Invasion der Parasiten in die Erythrozyten, sondern die intrazelluläre Schizogonie bei G6PD-Defizienz behindert ist [Miller et al. 1984]. Dies beantwortet jedoch nicht die Frage, warum in einigen Studien heterozygote Frauen stärker vor Malaria geschützt waren als homozygot oder hemizygot Defiziente. Die Arbeitsgruppe von Luzzatto hat in verschiedenen Experimenten gezeigt, daß sich *P. falciparum* sich nach mehreren erythrozytären Zyklen an eine G6PD-Defizienz adaptieren kann. Bei zwei Erythrozytenpopulationen mit unterschiedlicher G6PD-Aktivität reicht dieser Mechanismus

dagegen nicht zur Adaptation der Parasiten an die wechselnden Bedingungen aus [Usanga & Luzzatto 1985]. Die Stimulation der Expression von parasiteneigener G6PD könnte für diese Adaptation verantwortlich sein, ein direkter Nachweis eines solchen Mechanismus ist aber bisher nicht gelungen [Kurdi-Haidar & Luzzatto 1990].

Ein weitere Hypothese macht eine durch G6PD-Defizienz indirekt begünstigte Schädigung Monozyten-abhängiger Makrophagen für die Protektion gegenüber der Malaria verantwortlich. Bei G6PD-Defizienten kommt es nach dieser Hypothese relativ früh zur Aggregation von Bande-3-Proteinen an den Membranen infizierter Erythrozyten, was zu einer veränderten Antigenität und verstärkten Erkennung von Antikörpern führt. Infizierte Zellen werden daher bei G6PD-defizienten Personen früher phagozytiert als bei Personen mit ausreichender Enzymaktivität. In früher phagozytierten, häufiger Ringstadien enthaltenden, Erythrozyten sind weniger polymerisierte, unlösliche Abbauprodukte (Haemozoin, Malariapigment) angehäuft, die für Makrophagen toxisch sind und die zelluläre Immunität behindern [Turrini et al. 1993]. Danach würden G6PD-defiziente infizierte Erythrozyten früher phagozytiert und die beteiligten Makrophagen weniger durch toxisches Haemozoin geschädigt als bei G6PD-Gesunden. Zusätzlich ist die Phagozytoseeffizienz von Makrophagen von dem Vorhandensein des Reduktionsmittels NADPH abhängig. Insbesondere auf langlebende mononukleäre Phagozyten von hemizygot und homozygot, aber auch heterozygot G6PD-Defizienten könnte sich die niedrigere NADPH-Produktionskapazität auf eine niedrigere Phagozytoseaktivität auswirken. Bei der mediterranen G6PD-Defizienz konnten Anhalte für diesen Mechanismus gezeigt werden. Die verminderte Aktivität der Phagozyten wirkt sich auch auf die erhöhte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen bei Malariaerkrankten aus.

2.9.4. Blutgruppen

Seit mehr als 20 Jahren ist bekannt, daß das Erythrozytenmembran-Glykoprotein, das die Duffy-Blutgruppen-Epitope Fy^a , Fy^b und Fy^6 enthält, ein wichtiger Rezeptor von *P.-knowlesi*- und *P.-vivax*-Merozoiten ist [Miller et al. 1975]. Daher können *P.-vivax*-

Merozoiten nicht Duffy-negative (*FyFy*) Erythrozyten invadieren. Aus diesem Grund ist *P. vivax* in Westafrika, wo die Duffy-Blutgruppe nicht vorkommt, ebenfalls nicht verbreitet. Diese Beobachtung hat zu der Vermutung geführt, daß die ABO-Blutgruppe für die Infektion mit *P. falciparum* bedeutsam sein könnte. In verschiedenen Arbeiten wurden Hinweise darauf gefunden, daß ABO-Blutgruppenantigene eine Rolle bei dem Manifestationsrisiko einer Malaria spielen. Vor kurzem wurde in einer Studie in Zimbabwe gezeigt, daß Patienten mit Blutgruppe A ein signifikant höheres Risiko für schwere Malaria hatten [Fischer & Boone 1998].

3. Methodische Grundlagen und Studiengruppen

3.1. Probanden und Aufbau der Studiengruppen

3.1.1. Studiengruppe aus Nigeria

In einer Querschnittsstudie wurde die Prävalenz der unterschiedlichen Parasitenspezies bei asymptomatischen Probanden aus einer hochendemischen Region in Afrika untersucht werden. Im Rahmen dieser Studie wurden malariologische und hämatologische Parameter sowie polymorphe genetische Faktoren von Erwachsenen und Kindern aus einer ländlichen und einer städtischen Region im Südwesten Nigerias verglichen. Die Studie wurde zwischen Oktober 1996 und September 1997 in Ibadan, einer Stadt mit etwa 4 Millionen Einwohnern, und in Abanla, einem Dorf in einer etwa 20 km von Ibadan entfernten ländlichen Region, durchgeführt. In diesem Gebiet ist die Transmission von *P. falciparum* hoch und über das Jahr stabil (holoendemisch). Die Proben wurden während der Trockenzeit zwischen Dezember 1996 und Mai 1997 gesammelt. Von den 593 in die Studie aufgenommenen Probanden wurden 230 Kinder aus Abanla (Grundschule und Kindergarten), 59 Kinder aus Ibadan (Grundschule und Kindergarten), 144 Kinder aus Gesundheitsposten in Ibadan und 160 Erwachsene aus Ibadan rekrutiert [May et al. 1999a]. Das

Studiendesign wurde vom Ethikkomitee des *Joint Ethical Committee University Ibadan, University College Hospital* begutachtet und genehmigt.

3.1.2. Studiengruppe aus Gabun

Die Region um Lambaréné ist ein typisches hyperendemisches Malariagebiet mit einer geschätzten entomologischen Inokulationsrate von 10 - 100 Stichen infizierter Moskitos pro Jahr [Wildling et al. 1995]. Es lassen sich klinisch und immunologisch drei Patientengruppen unterscheiden: Nichtimmune Patienten im Kleinkindalter, die lebensbedrohlich an Malaria erkranken können und als häufige Komplikationen schwere Anämie mit Hyperparasitämie, Hypoglykämie oder zerebrale Manifestationsformen aufweisen; Patienten im Schulalter mit einer begrenzten Anti-Krankheitsimmunität, die gewöhnlich an einer unkomplizierten Malaria ohne Organkomplikationen erkranken; und semiimmune Erwachsene mit einer meist milden Verlaufsform [Kremsner et al. 1995].

In den Jahren 1995 und 1996 wurden für eine Longitudinalstudie 200 Kinder (Alter 6 Monate bis 11 Jahre) im Albert-Schweitzer-Hospital Lambaréné, Gabun rekrutiert. 100 Kinder mit einer schweren Malaria wurden stationär aufgenommen und behandelt (4 Tage Chinin und Clindamycin) [Kremsner et al. 1995]. Zu jedem in die Studie aufgenommenen Kind mit schwerer Malaria wurde, im Sinne einer *matched-pair*-Studie, ein Kind ähnlichen Alters, gleichen Geschlechts und gleicher Herkunft zugeordnet, bei dem eine milde Malaria diagnostiziert wurde. Diese Kinder wurden ambulant mit Pyrimethamin und Sulfadoxin behandelt [Schmidt-Ott et al. 1997]. Die Kinder mit schwerer Malaria wurden permanent stationär, die Kinder mit milder Malaria im Abstand von 12 Stunden untersucht. Longitudinal wurden Reinfektionen und klinische Malariaattacken durch zweiwöchentliches klinisches und parasitologisches *Follow-up* über 52 Monate verfolgt.

Die Aufnahmekriterien in die Gruppe mit schwerer Malaria waren definiert als Hyperparasitämie (> 250000 Parasiten/ μ l entsprechend $> 10\%$ Parasitämie), schwere Anämie (< 50 g/l Hb), zerebrale Malaria, Hypoglykämie (< 50 mg/dl Glucose) oder andere Zeichen einer schweren Malaria bei Ausschluß einer anderen Erkrankung [Kun et al. 1998, Luty et

al. 1999]. Kinder mit milder Malaria hatten eine Parasitämie zwischen 1000 und 50000 Parasiten/ μ l Blut, keine Schizontämie, einen Anteil von pigmentierten Schizonten $< 50/\mu$ l, Hämoglobin > 80 g/l, Thrombozyten $> 50/\text{nl}$, Leukozyten $< 12/\text{nl}$, Laktat < 3 mM und einen Blutglukosewert > 50 mg/dl. Ausschlußkriterien für die Aufnahme in die Studie waren eine Sichelzellanämie (HbSS), eine durchgemachte schwere Malaria oder ein Krankenhausaufenthalt vor dem Studienbeginn, andere akute Infektionen sowie die Einnahme von antiparasitären Medikamenten in den Wochen vor Beginn der Studie. Kinder mit Mangelernährung oder chronischen Erkrankungen wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die Eltern der Kinder wurden über die Studie informiert und gaben ihr Einverständnis. Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Albert-Schweitzer-Stiftung begutachtet und genehmigt.

3.2. Material und Methoden

Die im einzelnen angewendeten Methoden sind in der im Anhang zusammengestellten Literatur beschrieben und hier nur kurz zusammengefaßt.

3.2.1. HLA-Typisierung

Die Antigene der HLA-Klasse II wurden zu Beginn der HLA-Forschung durch die gemischte Lymphozytenkultur (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) definiert. Diese Methode mißt die zelluläre Immunantwort durch Aktivierung von T-Lymphozyten. In der Folge wurden zur HLA-Bestimmung serologische Methoden angewandt, bei der verschiedene immunogene Epitope durch Bindung von Antikörpern nachgewiesen wurden [Dyer & Martin 1991]. Später folgten weitere molekulare, biochemische und zelluläre Methoden, die sich aber nicht zur vollständigen Aufdeckung aller MHC-Klasse-II-Allele eigneten. Seit einigen Jahren wird der HLA-Polymorphismus auf genetischer Ebene untersucht, indem die variablen DNA-Sequenzen des 2. Exons, die für die Antigenbindungsstelle kodieren, durch eine PCR [Saiki et al. 1985, Mullis & Faloona 1987] amplifiziert und die Bruchstücke mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) [Bodmer et al. 1987], mit

Oligonukleotidsonden [Saiki *et al.* 1985] oder durch Klonierung und Sequenzierung [Sanger *et al.* 1977] analysiert werden. Allelspezifische Oligonukleotide (ASO) [Saiki *et al.* 1986] und sequenzspezifische Oligonukleotidsonden (*sequence-specific oligonucleotide probes*, SSOP) [Bugawan *et al.* 1988, Saiki *et al.* 1989, Bugawan *et al.* 1990] ermöglichen inzwischen eine rasche und effiziente Typisierung von Loci der MHC-II-Klasse.

Die Typisierung mit sequenzspezifischen Oligonukleotid-Sonden (SSOP) basierte bei HLA-Genen auf dem Protokoll des XI. internationalen HLA-Workshops [1991] und wurde teilweise modifiziert nach [Schmitz *et al.* 1991]. Zur Vernetzung der PCR-Amplifikate mit Nylonmembranen wurde das Protokoll nach Church & Gilbert modifiziert [Church & Gilbert 1985]. Die Markierung der Oligonukleotide erfolgte durch Digoxigenin-11-2'-3'-dideoxy-Uridintriphosphat und wurde mit dem „DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit“ (Boehringer-Mannheim) durchgeführt [Nevinny-Stickel *et al.* 1991]. Für die Hybridisierung und den Allelnachweis durch Digoxigenin-markierte SSOP wurden die Protokolle von [Horwitz *et al.* 1966, Michal 1983, Wood *et al.* 1985] in leicht modifizierter Form verwendet. Modifikationen von diesen Protokoll wurden in den jeweiligen Arbeiten beschrieben [Meyer *et al.* 1994, Meyer *et al.* 1994, Meyer *et al.* 1996, Schnittger *et al.* 1997, May *et al.* 1998a, May *et al.* 1998b].

3.2.2. Sonstige Methoden

Die Methoden wurden direkt oder modifiziert aus der im einzelnen angegebenen Literatur oder molekularbiologischen Handbüchern entnommen [Erich 1989, Sambrook *et al.* 1989, Innis *et al.* 1990, Ausubel *et al.* 1992].

Die DNA wurde aus peripheren mononukleären Blutzellen nach dem modifizierten Protokoll von Miller *et al.* [1988] oder aus Vollblut nach Standardprotokollen oder mit Hilfe von kommerziellen Kits (Quiagen, Invitrogen) durchgeführt. Die synthetischen Oligonukleotide wurden im Labor (Gene Assembler .r. Plus; Pharmacia LKB) hergestellt und gereinigt oder bei kommerziellen Anbietern erworben.

Die DNA-Amplifikation wurde mit Hilfe der PCR nach dem für die einzelnen Anwendungen modifizierten Grundprotokoll von *Saiki et al.* [*Saiki et al.* 1985] durchgeführt. Nach der Amplifikation wurde die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Die Typisierung der Genvarianten, die in den hier zusammengefaßten Arbeiten untersucht wurden, ist in den einzelnen Publikationen beschrieben: G6PD [*May et al.* 2000b], α -Thalassämie [*Mockenhaupt et al.* 1999], TNF α [*May et al.* 2000c], ICAM-1 [*Kun et al.* 1999], iNOS [*Kun et al.* 1998], MSA (*merozoite surface antigen*) [*Kun et al.* 1998].

Zur DNA-Sequenzierung wurden DNA-Fragmente durch Klonierung in Plasmidvektoren nach Standardmethoden separiert [*Sambrook et al.* 1989], in kompetente *E.-coli*-Zellen eingebracht, vermehrt und anschließend eine Minipräparation der Plasmid-DNA durch alkalische Lyse [*Birnboim & Doly* 1979] oder mit Hilfe eines kommerziellen Kits durchgeführt (Quiagen). Nach positivem analytischem Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* wurde eine manuelle (BaseRunner, Sigma) oder automatische (entweder ABI, Becton Dickinson oder LiCor, MWG) DNA-Sequenzanalyse nach [*Sanger et al.* 1977] durchgeführt.

Die Bestimmung des Hb-Genotyps wurde mittels Hb-Elektrophorese auf Zellulose-Acetat-Membranen durchgeführt [*Lell et al.* 1999, *May et al.* 2000b].

Die mikroskopische Parasitenzählung wurde standardmäßig mit einer Giemsa-Färbung nach Ausstrich und Dickem Tropfen mit Auszählung der Parasiten in 100 Ölimmersionsfeldern durchgeführt [*May et al.* 1999a, *Mockenhaupt et al.* 2000, *May et al.* 2000a].

Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, Erythrozytenanzahl und Granulozytenanzahl wurde mit einem Coulter Counter (HC555; Clinicon, Mannheim) gemessen und gegebenenfalls für das Alter korrigiert [*Bienzle et al.* 1980, *May et al.* 1999a, *May et al.* 2000a, *May et al.* 2000b].

G6PD-Aktivität und Pyruvatkinase-Aktivität im Erythrozyten wurde spektrophotometrisch gemessen [*WHO* 1967, *Beutler* 1975, *May et al.* 2000b].

3.3. Auswertung der Ergebnisse und statistische Berechnungen

Statistische Berechnungen wurden in der Regel mit dem Programm *StatView* oder *Jmp* (beide SAS Institute Inc., North Carolina) nach allgemeinen Standards durchgeführt. Kopplungsungleichgewichte wurden mit den in der entsprechenden Arbeiten angegebenen Formeln berechnet [May et al. 1998a].

Zur Bewertung der Typisierungssignale und Berechnung von Genfrequenzen, Aminosäuremotiv-Frequenzen und Haplotypfrequenzen der Genvarianten in den beiden Studiengruppen wurden Computerprogramme entwickelt, die eine schnelle und zuverlässige Auswertung ermöglichen. Der ausführliche Quelltext der Programme ist in den Anhangskapiteln 6.2 und 6.3 angegeben. Die Programme sind in der Programmiersprache *Visual Basic* geschrieben und basieren auf der kommerziellen Software *Excel* (Microsoft, Office 97 für MacIntosh).

3.3.1. Computergestützte Auswertung der Typisierungssignale ("BLOT")

Genvarianten, die innerhalb einer Bevölkerungsgruppe in hohen Frequenzen vorkommen, sind an diesem Genort häufig heterozygot. Wenn bei Heterozygoten die Genvarianten beider Chromosomen an mehreren Positionen variabel sind, ergibt die PCR-basierte Typisierung häufig ein Signalmuster, bei dem für mehrere variable Positionen des Gens ein heterozygotes Signal gefunden wird. Daraus ergibt sich bei der PCR-basierten Typisierung die Schwierigkeit, daß die Typisierungssignale beider Varianten in ihrer Gesamtheit nicht den entsprechenden Haplotypen eindeutig zuzuordnen sind. Ergibt z. B. die Typisierung eines Gens mit den beiden variablen Positionen X (Variante G oder A) und Y (Variante T oder C) das heterozygote Signalmuster G/A an Position X und T/C an Position Y, so ist uneindeutig, ob die Haplotypen GT und AT oder GC und AT sind. Methodisch sind diese Signalmuster nur mit unverhältnismäßig großem Aufwand zu trennen (Klonierung). Das Programm "BLOT" wurde geschrieben, um bei solchen uneindeutigen Signalen eine rechnerische Bestimmung beider Genvarianten zu ermöglichen (Programmcode Kap. 6.2). Die Software enthält Algorithmen, mit denen ein Schlüssel aller bisher bekannten Varianten

eines bestimmten Gens und ihrer Signalmuster mit dem tatsächlich aktuell gefundenen Signalmuster verglichen wird. Der Anwender erhält als Ergebnis diejenigen Genotypen, bei denen es die beste Übereinstimmung zwischen den ermittelten Signalen und den theoretischen Signalen der bisher bekannten möglichen Genotypen gibt. Außerdem werden die Anzahl der nicht übereinstimmenden Signale und deren Position ausgegeben.

Für die Berechnung werden vom Benutzer die Signale, die bei den molekularbiologischen Untersuchungen ermittelt werden, eingegeben. Dabei ist grundsätzlich die Methodik, die zur Typisierung angewendet wird, beliebig (z. B. direkte Sequenzierung, Sondenhybridisierung, Restriktionsverdauemuster). Ein Auflösungsschlüssel, der für den jeweiligen Genort, die Genvarianten, die untersuchten Genbereiche und die angewandte Methodik spezifisch ist, liegt als einzelne Tabelle vor und kann nach den entsprechenden Bedürfnissen variiert und aktualisiert werden. Die Algorithmen lesen die Daten ein, und bilden aus den Informationen des Auflösungsschlüssels für jede Genvariante einen binären Code. Die molekularbiologisch ermittelten Signale werden ebenfalls eingelesen und daraus ein binärer Code gebildet. Beide Binärcodes werden mit Hilfe von Boolean'schen Operationen verglichen, ein Ergebniscode berechnet und ausgewertet. Hierdurch ist ein schneller und zuverlässiger Vergleich der eigenen Signale und des Auflösungsschlüssels möglich. Aus der Rückberechnung des Ergebniscodes in ein Ergebnissignalmuster kann die Anzahl der Nicht-Übereinstimmungen bei dem Vergleich mit den bekannten Genotypmustern ermittelt werden. Die Genotypen mit der niedrigsten Anzahl an Nicht-Übereinstimmungen werden als wahrscheinlichstes Muster in eine neue Tabelle ausgegeben. Eine Anzahl von Nicht-Übereinstimmungen von 0 bedeutet somit die 100%ige Übereinstimmung mit einem Genotyp des Auflösungsschlüssels. Zusätzlich wird für jeden Fehler die entsprechende Position innerhalb des Genorts festgelegt und angezeigt, ob das Signal im Vergleich zum Auflösungsschlüssel positiv oder negativ war. Proben, bei denen sich mehrfach Unterschiede zwischen ermitteltem Genotypmuster und Auflösungsschlüssel zeigten, wurden kloniert und sequenziert.

3.3.2. Auswertung von Genfrequenzen, Aminosäuremotiv-Frequenzen und Haplotypfrequenzen der Genvarianten ("FAST")

Bei der Auswertung von Typisierungsergebnissen hoch polymorpher Gene wie z. B. bei HLA-Genen stellen die Ermittlung von Allelfrequenzen, Aminosäuremotiv-Frequenzen und Haplotypfrequenzen die ersten Analyseschritte dar. Je nach Fragestellung werden die Frequenzen von Gruppen mit unterschiedlichen Phänotypen verglichen oder populationsgenetische Vergleiche durchgeführt. Während die einfache Auszählung der Allele aus den Genotypen jedes Individuums aufwendig, aber prinzipiell unproblematisch ist, gestaltet sich die Auszählung von Aminosäuremotiv-Gruppen für jeden zu untersuchenden Phänotyp als äußerst aufwendig. Bei dieser Analyse werden die Allele in Gruppen zusammengefaßt, die die gleiche Sequenz einer bestimmten variablen Region aufweisen und die Frequenzen dieser Gruppen ermittelt (z. B. alle Allele mit einem Methionin an Position 11 des HLA-DPA1-Exons 2 werden als Gruppe "Met-11" [DPA1*02021, DPA1*02022, DPA1*0301] und alle Allele mit einem Alanin an Position 11 werden als Gruppe "Ala-11" [DPA1*0103, DPA1*0104, DPA1*0105, DPA1*02011, DPA1*02012, DPA1*0203, DPA1*0401] zusammengefaßt). Die Gruppen haben also ein bestimmtes Codon an einer Position des Genlocus gemeinsam. Bei HLA-Molekülen kann die durch dieses Codon kodierte Aminosäure das Bindungsverhalten mit dem antigenen Peptid beeinflussen und sollte daher entsprechend analysiert werden. Je nach HLA-Locus kommen bis zu 18 verschiedene variable Positionen mit mehreren Aminosäure-Motivgruppen vor. Zusätzlich sollten bei Assoziationsberechnungen Motivgruppen und Allele für verschieden Phänotypen untersucht werden, wobei jeder einzelne Phänotyp eine eigene Auszählung erfordert. In dem Programm können jeweils zwei Phänotypen miteinander verglichen werden.

Mit Hilfe des Programms "FAST" wird sowohl die automatische Zählung der Allele und Motivgruppen als auch die Weiterverarbeitung der Frequenzen für populationsgenetische und assoziationsanalytische Untersuchungen durchgeführt. Für die Berechnungen sind drei Dateien notwendig: 1. Das Hauptprogramm, das auf einem Tabellenblatt auch die Grundparameter für die Algorithmen speichert und den Dialog für den Benutzer zur

Verfügung stellt ("FASTAnalyse"); 2. Eine Aufschlüsselungsdatei, die für jedes Allel der untersuchten Locus die Liste der Motivgruppen enthält ("FASTKey"); 3. Das Datenblatt, das in tabellarischer Form die ermittelten Allele für jeden Locus und die phänotypischen Einteilungen jedes Probanden enthält ("Datenblatt").

Das Programm liest in einem ersten Schritt die wählbaren Parameter, die Patientendaten, und den Auflösungsschlüssel in den Speicher. In diesem Schritt werden unklare und falsche Eingaben, wie z. B. unbekannte Allele, überprüft. In einem nächsten Schritt werden für jeden Probanden und Locus die beiden Allele gelesen und jede variable Region einer Aminosäuremotiv-Gruppe zugeordnet. Bei einer Assoziationsuntersuchung wird dies für jeden von zwei Phänotypen getrennt vorgenommen. Dann wird für beide Phänotypen die Anzahl der Allele und Aminosäuremotiv-Gruppe pro Probanden (n) und pro Chromosomen ($2n$) berechnet.

Die so ermittelten Daten werden für die weiteren Berechnungen verwendet. Es stehen 4 Analysemodi zur Verfügung: 1. einfache Berechnung von genotypischen und phänotypischen Allelfrequenzen für einen Locus und einen Phänotyp; 2. Berechnung von genotypischen und phänotypischen Allelfrequenzen für einen Locus und zwei Phänotypen mit Analyse der χ^2 -Werte und bei heterogener Verteilung der Phänotypen ($P < 0,05$) unter Angabe der *odds ratio* (OR) und des P -Wertes; 3. Berechnung von genotypischen und phänotypischen Allelfrequenzen für zwei Loci und einem Phänotyp und Angabe von populationsgenetischen Parametern wie Haplotypfrequenz und Deltawerten; 4. Berechnung von genotypischen und phänotypischen Allelfrequenzen für zwei Loci und zwei Phänotypen mit Vergleich von Haplotypfrequenzen und Analyse des χ^2 -Wertes und bei signifikanter Ungleichverteilung der Haplotypen unter Angabe des Signifikanzwertes. Die Ergebnisse werden in tabellarischer Form ausgegeben und gespeichert.

4. Einordnung der Ergebnisse in die gegenwärtige Malariaforschung

Die Ergebnisse der Untersuchungen über asymptomatisch mit *P. falciparum* infizierten Kindern aus Nigeria und Kindern mit milder und schwerer Malaria aus Gabun unterstützen die Hypothese, daß genetische Faktoren des Wirtes den Verlauf einer Infektion mit Malaria-Parasiten beeinflussen. Varianten von Genen, die in angeborene und erworbene Immunität involviert sind, waren in diesen Studien mit bestimmten Manifestationen der Infektion und der Reinfektionsrate nach einer klinischen Malariaepisode assoziiert.

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse aus den Studien in Nigeria und Gabun kurz zusammengefaßt und in den Kontext der aktuellen Kenntnisse eingeordnet. Auf die ausführlichen Resultate und Diskussionen in den einzelnen Originalarbeiten (Anhang 0) wird in den jeweiligen Kapiteln verwiesen.

4.1. Epidemiologische und malariologische Daten der Studiengruppe aus Nigeria

In der in Nigeria durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, daß die Rate an submikroskopischen und gemischten Infektionen mit Plasmodien bei Personen ohne manifeste Malaria in dem untersuchten Gebiet sehr hoch ist [May et al. 1999a]. 20% der Probanden hatten eine Parasitämie, die bei normaler mikroskopischer Untersuchung nicht erkennbar war, aber mittels PCR detektiert werden konnte. Das Vorkommen der *P.-falciparum*-Infektion stieg mit dem Alter an und erreichte bei Kindern ab 12 Jahren nahezu 100%. Die Prävalenz der beiden anderen in dieser Region vorkommenden Parasitenspezies, *P. malariae* und *P. ovale*, stieg ab dem fünften Lebensjahr steil an, so daß nahezu alle Kinder mit 12 Jahren mindestens mit einer der Parasitenspezies infiziert waren. Erwartungsgemäß war die Infektionsrate bei Kindern höher als bei Erwachsenen. Überraschenderweise war in dieser Studie kein Unterschied in der Prävalenz von *P. falciparum* zwischen Kindern aus der urbanen und der ländlichen Region zu erkennen, wobei letztere häufiger

Mischinfektionen mit mehreren unterschiedlichen Parasitenspezies hatten. Probanden mit Mischinfektionen mit *P. falciparum* und *P. malariae* hatten häufiger eine vergrößerte Milz als solche mit Einzelinfektionen. Das Vorkommen von Dreifachinfektionen war größer als nach der Prävalenz der einzelnen Spezies statistisch zu erwarten gewesen wäre [May et al. 1999a].

In einer älteren Studie aus Nigeria wurde ebenfalls eine Häufung von Mischinfektionen (*P. falciparum* und *P. malariae*), hier unter Erwachsenen, gefunden [Bruce-Chwatt 1963a, Bruce-Chwatt 1963b]. Im Gegensatz dazu wurden in anderen Untersuchungen multiple Infektionen seltener gesehen als statistisch zu erwarten [Cohen 1973, Maitland et al. 1996]. Bei Cohen wurde bei jüngeren Kindern eine niedrigere Prävalenz von Mischinfektionen und eine Korrelation mit einer Milzvergrößerung beobachtet. Für das seltenere Vorkommen von Mischinfektionen wurde ein immunabhängiger Mechanismus vermutet. Allerdings berichtete Cohen auch von mehreren Studien, in denen multiple Infektionen häufiger als zufällig vorkamen. Auch in Longitudinalstudien gibt es widersprüchliche Berichte über Häufung und Verminderung von Mehrfachinfektionen [Richie 1988]. Die Tatsache, daß Milzgröße und Anti-Schizonten-Antikörpertiter mit der Parasitendichte auch bei den hier untersuchten niedrigen Parasitämien korrelierte, legt die Vermutung nahe, daß bei vielen Kindern langdauernde submikroskopische Infektionen vorkommen.

Die Bedeutung von asymptomatischen Infektionen für den Patienten wird seit langem diskutiert [Greenwood 1987]. Bei 228 klinisch gesunden Schulkindern aus Abanla zeigte sich, daß ein großer Teil nach den von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) formulierten Kriterien als anämisch einzustufen war [May et al. 2000a]. Bestimmungen der G6PD- und Pyruvatkinase-Aktivität deuteten darauf hin, daß bei vielen der Kinder die hämatologischen Parameter chronisch verschlechtert waren und mit einem erhöhten Erythrozytenumsatz einher gingen [May et al. 2000b]. Die Erhöhung der Serumspiegel des Transferrinrezeptors bei Kindern mit asymptomatischer oder milder *P.-falciparum*-Infektion spricht gegen eine Knochenmarkssuppression als Ursache der chronischen subklinischen Anämie [Mockenhaupt et al. 1999]. Das Auftreten einer Anämie war vor allem abhängig

vom Vorkommen einer *P.-falciparum*-Parasitämie - auch in einer sehr geringen Höhe -, dem Vorkommen einer Infektion mit verschiedenen Parasitenspezies, der Komplexität der *P.-falciparum*-Infektion (Infektion mit unterschiedlichen *P. falciparum*-Stämmen) und dem Auftreten einer Splenomegalie. Diese kann, wie eine andere Untersuchung mit der selben Studiengruppe gezeigt hat, wiederum durch eine Mehrfachinfektion begünstigt werden [May et al. 1999a]. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, daß die Bedeutung von sehr niedrigen Parasitämien auch mit anderen Parasitenspezies als *P. falciparum* für die Entwicklung einer chronischen Anämie größer ist als bislang vermutet wurde.

Weiterhin zeigte sich, daß in Nigeria die Einnahme von Chloroquin bei Kindern auch ohne manifeste Malariasymptomatik sehr verbreitet ist. Die Prävalenz an Kindern mit subkurativen Chloroquinspiegeln bei einer hohen Rate von Chloroquin-resistenten *P.-falciparum*-Stämmen ist sehr hoch [Mockenhaupt et al. 2000]. Dieser Umstand leistet der Verbreitung von Resistenzen weiteren Vorschub.

4.2. Epidemiologische und malariologische Daten der Studiengruppe aus Gabun

Im longitudinalen Vergleich wurde gezeigt, daß in der Gruppe mit schwerer Malaria im Vergleich zur der Gruppe mit milder Malaria häufiger und rascher Reinfektionen auftreten [Lell et al. 1999] und sich beide Gruppen in ihrem Zytokinmuster unterscheiden [Luty et al. 1999]. Sozioökonomische Faktoren spielten keine nachweisbare Rolle für die Unterschiede bezüglich des Auftretens einer Anämie, Hyperparasitämie oder Reinfektionsrate [Luckner et al. 1998]. Ebenso gab es keinen Anhalt für eine unterschiedliche Stichfrequenz bei Kindern mit milder oder schwerer Malaria [el Sylla, unveröffentlicht]. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, daß die beiden Gruppen sich in ihrer, wahrscheinlich genetisch determinierten, Empfänglichkeit für schwere Malaria unterscheiden.

Weitere detaillierte Daten im Zusammenhang mit der Studiengruppe aus Gabun sind aus folgenden Publikationen zu entnehmen: [Wildling et al. 1995, Schmidt-Ott et al. 1997, Kun

et al. 1998, *Kun et al.* 1998, *Luty et al.* 1998, *Kun et al.* 1999, *Lell et al.* 1999, *May et al.* 1999b].

4.3. HLA-Polymorphismus und Malaria

Die Präsentation von antigenen Peptiden ist HLA-restringiert. Der Polymorphismus der HLA-Moleküle erlaubt einer Population, eine große Zahl verschiedener Antigene zu präsentieren. Die individuelle HLA-Ausstattung definiert wiederum, welche Antigene bei einem einzelnen Menschen präsentiert werden und zu welchen TCR-Interaktionen es kommen kann. Dieser Zusammenhang ist Grundlage für die Hypothese, daß in einer Population natürliche Selektion in Richtung eines ausgeprägten HLA-Polymorphismus wirkt. Tatsächlich hat eine eigene Studie gezeigt, daß die Anzahl der HLA-Varianten und -Haplotypen in Gabun weitaus größer ist als bei Europäern [*Schnittger et al.* 1997]. Die HLA-Variabilität schien vor allem durch die hohe Zahl der haplotypischen Kombinationen der Loci DRB1, DQA1 und DQB1 hervorgerufen zu sein. Ein Vergleich von Populationen aus Nigeria, Gabun und Liberia zeigte, daß es auch in geographisch relativ nah zusammenliegenden Regionen große Unterschiede in der Verteilung von HLA-Varianten gibt [*May et al.* 1998a]. Trotz dieser Unterschiede wurden Kopplungsungleichgewichte bestimmter Allelkombinationen in allen drei Populationen gefunden. Diese Beobachtung spricht dafür, daß Haplotypen - eher als bestimmte Allele - einem selektiven Druck ausgesetzt sind.

Im Zusammenhang mit einer genetisch bedingten Resistenz gegenüber *Malaria tropica* wurde früher gezeigt, daß das HLA-Klasse-I-Molekül HLA-B*53 mit einem Schutz vor schwerer Anämie und der zerebralen Verlaufsform der Malaria assoziiert ist [*Hill et al.* 1991]. Die protektive Wirkung entsprach etwa der Größenordnung der Schutzwirkung des Sichelzellgens HbS. Die Autoren vermuteten, daß die Protektion von HLA-B*53-positiven Individuen durch eine zytotoxische T-Zellreaktion gegen infizierte Hepatozyten vermittelt werden müßte. Allerdings sollte ein Organismus von der Größe von *P. falciparum* Tausende

potentieller T-Zellepitope haben, die eine Vielzahl von HLA-Restriktionsmustern haben können. Daher wurde gefolgert, daß die meisten Antworten gegen diese Antigene von geringem protektiven Wert sind, bzw. daß die Anzahl protektionsvermittelnder Epitope sehr gering ist. Dies wäre auch im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Vakzine von Bedeutung. Die Autoren postulierten, daß der außerordentlich große Genpolymorphismus des HLA-Komplexes als Folge des Selektionsdruckes durch Infektionskrankheiten entstanden ist.

Später durchgeführte vergleichbare HLA-Assoziationsstudien in Ostafrika konnten die in Westafrika erhobenen Befunde nicht bestätigen [Riley *et al.* 1992, Dieye *et al.* 1997]. In einer folgenden, auf den ursprünglichen HLA-Befunden basierenden Studie wurde jedoch gezeigt, daß konservierte Regionen des Leberstadium-spezifischen Antigens LSA-1, das von HLA-B*53 präsentiert werden kann, von zytotoxischen T-Zellen der gegen die schwere Verlaufsform geschützten Individuen erkannt wird [Hill *et al.* 1992]. Allerdings war die CTL-Stimulation durch dieses Peptid nicht bei allen untersuchten HLAB*53-positiven Personen möglich. Weitere Arbeiten haben T-Zellepitope definiert, die eine protektive zytotoxische T-Zellantwort auslösen [Aidoo *et al.* 1995, Lalvani *et al.* 1996, Udhayakumar *et al.* 1997, Lalvani & Hill 1998]. Es gibt weiterhin Hinweise darauf, daß Sporozoitenantigene im Rahmen der HLA-Klasse-I-Präsentation prozessiert werden und damit einen alternativen Weg für das *Priming* von CD8-positiven T-Zellen darstellen können [Plebanski & Hill 2000].

In der oben erwähnten Studie von Hill *et al.* wurde auch der Klasse-II-Haplotyp HLA-DRB1*1302-DQB1*0501 mit Schutz vor schwerer Anämie beschrieben [Hill *et al.* 1991]. Obwohl in einer weiteren Studie bei einer anderen Population Hinweise auf einen Einfluß von HLA-Klasse-II-Haplotypen für die individuelle Manifestation der Malaria gefunden wurde, konnten die Befunde von Hill *et al.* hier nicht bestätigt werden [Bennett *et al.* 1993].

In der Studiengruppe aus Gabun wurde für das Allel DQB1*0501 eine Assoziation mit einer Protektion vor Anämie bei milder und schwerer Malaria sowie vor weiteren Reinfektionen nachgewiesen [May *et al.* 2001]. Sowohl bei den Kindern mit milder Malaria als auch bei den Kindern mit schwerer Malaria lag der niedrigste Hämatokrit aller Reinfektionen bei

DQB1*0501-Trägern signifikant höher als bei DQB1*0501-negativen Individuen. In beiden Gruppen lag der Hämatokrit bei homozygoten im Vergleich zu heterozygoten DQB1*0501-Trägern höher. Bei der Kaplan-Meier-Analyse des Profils aller Reinfektionen im Zeitraum von über 4 Jahren nach Beginn der Studie zeigte sich in der Gruppe mit schwerer Malaria bei DQB1*0501-positiven Kindern eine signifikante Verlängerung der Intervalle bis zur nächsten Reinfektion. In der Gruppe mit initial milder Malaria war der selbe, wenn auch nicht signifikante, Trend zu erkennen. Entsprechend diesen Ergebnissen hatten in der Gruppe mit schwerer Malaria DQB1*0501-Träger häufiger unter einer Infektion pro Jahr als DQB1*0501-Negative. Ein indirekter Parameter für die Infektionsstärke vor dem Zeitpunkt der Untersuchung ist der Anteil der mit Malariapigment beladenen Monozyten im Blut [Metzger *et al.* 1995]. DQB1*0501-Träger hatten signifikant häufiger einen Anteil pigmentierter Monozyten im oberen Bereich (> 75te Perzentile) als Nicht-Träger.

Um zu untersuchen, inwieweit das Allel DQB1*0501 einen Einfluß auf die Immunantwort gegen erythrozytäre oder präerythrozytäre Antigene hat, wurden PBMC der Patienten mit Peptiden verschiedener Entwicklungsstadien stimuliert und der Plasmaspiegel von IFN- γ gemessen. Die Ergebnisse zeigten, daß DQB1*0501-Träger signifikant häufiger eine starke IFN- γ -Antwort gegen LSA-1-Antigene generierten als DQB1*0501-Negative; dies war bei der Stimulation mit MSA-1-Antigenen nicht der Fall. Diese *In-vitro*-Ergebnisse deuteten darauf hin, daß ein möglicher Mechanismus der beobachteten Assoziation eine verstärkte IFN- γ -Antwort bei Trägern von DQB1*0501 sein könnte [May *et al.* 2001].

In der Studie aus Gabun wurden die HLA-Klasse-II-Allelgruppe DRB1*04 und das Allel DPB1*1701 häufiger bei Patienten mit schwerer als bei solchen mit milder Malaria nachgewiesen [May *et al.* 1999b]. Zusätzlich wurden Assoziationen bestimmter HLA-Klasse-II-Allele mit einzelnen Varianten des *P. falciparum*-Oberflächenproteins MSA gefunden [May *et al.* 1999b]. MSA-1 und MSA-2 werden von *P. falciparum* während des Merozoitenstadiums und auf der Oberfläche von infizierten Erythrozyten exprimiert. Die MSA-Gene sind polymorph und werden in Familien eingeteilt. Entsprechend der Homologie im zweiten von 17 vorhandenen Blöcken kommen bei MSA-1 die Familien MAD20, K1 und RO33 vor

[Tanabe et al. 1987]. Das MSA-2-Gen ist in zwei hochkonservierte flankierende und eine variable zentrale Region organisiert, dessen repetitive Sequenzen die Familien FC27 und 2D7 definieren [Smythe et al. 1990]. Mehrere Assoziationen bestimmter MSA-Familien mit dem Malariaverlauf wurden bisher beschrieben [Kimura et al. 1990, Scherf et al. 1991, Kun et al. 1998]. In früheren eigenen Arbeiten wurden Assoziationen zwischen dem Vorkommen der Aminosäure Methionin an Position 11 (Met-11) des DPA1-Gens (Exon 2) und dem Verlauf einer Infektion mit *O. volvulus* [Meyer et al. 1996] und *S. haematobium* [May et al. 1998b] beschrieben. In Gabun waren Met-11-positive Kinder mit milder und solche mit schwerer Malaria seltener mit RO33-positiven *P.-falciparum*-Klonen infiziert als Met-11-negative Kinder. Umgekehrt waren K1-positive Klone mit dem Vorkommen von Met-11 assoziiert. Die Ergebnisse betonen zum Teil auf die besondere Rolle von HLA-DP-Allelen, deren Bedeutung für die Immunantwort noch relativ unvollständig definiert ist [Meyer et al. 1997]. Weitere Assoziationen zwischen HLA-Klasse-II-Allelen und MSA-Familien deuten darauf hin, daß MHC-Klasse-II-Allele in die Selektion von parasitären Antigenen, wie MSA, involviert sind [May et al. 1999b].

In beiden MSA-Genen kommen Längenpolymorphismen vor, so daß mit molekulargenetischen Methoden eine Infektion mit mehreren genetisch unterschiedlichen *P.-falciparum*-Stämmen nachgewiesen werden kann. Dies ermöglicht eine Abschätzung der Komplexität der Infektion bezüglich der Anzahl der *P.-falciparum*-Stämme. *P.-falciparum*-Infektionen mit mehreren Parasitenstämmen waren in Gabun mit dem Vorkommen bestimmter HLA-Klasse-II-Allele assoziiert [May et al. 1999b].

Bisher wurden nur wenige Assoziationen von HLA-Klasse-II-Allelen mit Manifestationen der *P.-falciparum*-Infektion oder bestimmten Immunantworten bei Malaria beschrieben. In einer Untersuchung war eine starke Antikörperantwort gegen das Epitop EENV des *P.-falciparum*-Antigens Pf155/ RESA mit DQw2 assoziiert [Riley et al. 1992]. Andere Autoren konnten diese Assoziation der Antikörperantwort mit der genannten DQ-Spezifität jedoch nicht bestätigen. Eine weitere Studie beschreibt eine Assoziation der humoralen Immunantwort gegen das synthetische Peptid SPf66 mit HLA-Klasse-II-Faktoren [Beck et

al. 1995]. In dieser Studie korrelierte DRB1*11 und DQB1*0301 positiv und DRB1*15 negativ mit der Antikörperantwort gegen SPf66. Gleichfalls sind HLA-A2- und -B8-restringierte zytotoxische T-Zellantworten gegen das Sporozoiten-Oberflächenprotein 2 von *P. falciparum* (Pf SSP2) beschrieben worden.

Die in den eigenen Untersuchungen beobachteten Assoziationen von HLA-Klasse-II-Varianten mit Manifestationen der Malaria und der Reinfektionsrate über einen mehrjährigen Zeitraum lassen auf eine Beteiligung von Antigen-präsentierenden Zellen und CD4-positiven T-Zellen bei der Entwicklung einer Immunität gegen Malaria schließen. Die HLA-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentation durch APC ist der erste Schritt einer Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen und damit der Induktion einer Antikörperantwort. Die Bedeutung von Antikörpern bei der Abwehr von Blutstadien ist in mehreren Studien gezeigt worden [Playfair 1982, Bouharoun-Tayoun et al. 1990]. Die gefundenen Assoziationen zwischen HLA-Klasse II und Infektionsparametern lassen daher zunächst auf eine Kontrolle von erythrozytären Stadien durch Antikörper-induzierte Immunantworten schließen. Da Erythrozyten selbst keine HLA-Klasse-II-Moleküle exprimieren, muß der Ansatzpunkt dieses Mechanismus im präerythrozytären Stadium liegen oder aber im Zusammenhang mit der Phagozytose von Merozoiten oder Erythrozytenbestandteilen infizierter Zellen durch Makrophagen stehen. Es ist unklar, ob durch die Präsentation von Parasitenantigenen aus erythrozytären Stadien ein *Priming* von Immunzellen hervorgerufen werden kann, das letztlich zu einer Reduktion der Parasitämie und Verminderung der Komplikationsrate oder dem Aufbau einer protektiven Immunität führen kann.

Da Erythrozyten keine HLA-Klasse-Moleküle exprimieren, kann es zu keiner direkten Zytotoxizität gegen infizierte Erythrozyten kommen. Zur Zeit ist nicht bekannt, ob CD8-positive T-Zellen eine protektive Bedeutung gegenüber Blutstadien haben. *In vitro* können Parasitenantigen-induzierte T-Zellproliferation und Zytokinsekretion durch CD8-positive T-Zellen inhibiert werden [Mshana et al. 1990]. In dieser Arbeit wurde mit Anti-HLA-Klasse-II-Antikörpern demonstriert, daß *P.-falciparum*-Schizonten spezifische, HLA-DQ-restringierte CD8-positive T-Zellen CD4-positive T-Zellen supprimieren können.

Es ist möglich, daß durch die HLA-Klasse-II-restringierte Präsentation die Zerstörung von infizierten Hepatozyten vermittelt wird. Dies hätte zur Folge, daß alle Nachkommen aus einem Sporozoiten und damit ein gesamter Parasitenklon vernichtet würde. Dadurch könnte in einer frühen Phase die Komplexität der Infektion, also die Anzahl der unterschiedlichen Parasitenstämme, mit denen ein Individuum infiziert ist, reduziert werden. In der Folge würde das Risiko gesenkt, mit einem besonders virulenten Stamm infiziert zu sein.

Mögliche Bedeutung von Nicht-HLA-Genen des MHC. Wenn nachgewiesene Assoziationen von MHC-Markern mit Erkrankungen, bzw. Krankheitsmanifestationen, interpretiert werden sollen, muß die häufige Kopplung von Genen innerhalb der MHC-Region berücksichtigt werden. Dabei können auch Gene gekoppelt, die keine HLA-Moleküle kodieren. Bei vielen solcher in der MHC-Klasse-II-Region gelegenen Nicht-HLA-Genen, aber auch bei Genen innerhalb des Klasse-III-Komplexes, ist bereits eine funktionelle Relevanz für das Immunsystem nachgewiesen worden. Auch gekoppelte Pseudogene oder Promotorsequenzen in diesem Bereich könnten trotz fehlenden Genproduktes von funktionellem Interesse sein, da sie eine Rolle in der Genregulation spielen können. Bei vielen MHC-Genen ist die funktionelle Bedeutung unklar und es wird angenommen, daß ein Großteil der Gene in dieser Region bisher noch nicht identifiziert wurde. Daher ist es möglich, daß die hier berechneten Assoziationen von Manifestationen der *P.-falciparum*-Infektion mit bestimmten Allelen der MHC-Loci auf einer Kopplung mit einem anderen polymorphen und funktionell relevanten Gen innerhalb des MHC-Komplexes beruht.

Die Gene und Genprodukte der Loci DMA und DMB haben eine MHC-Klasse-II-verwandte Sequenz, aber auch große Ähnlichkeit zu Strukturen des Klasse-I-Komplexes [Kelly et al. 1991]. Zellmutationsuntersuchungen haben gezeigt, daß DMA und -DMB eine Bedeutung für die Bindung der HLA-Klasse-II-Moleküle mit dem antigenen Peptid und die gemeinsame Bindung an der Zelloberfläche haben [Fling et al. 1994, Morris et al. 1994].

Einige Gene der Region zwischen den DPA1- und DQB1-Loci besitzen Sequenzähnlichkeiten zu HLA-Genen und haben eine Bedeutung für die Prozessierung und Antigenpräsentation im Zusammenhang mit HLA-Klasse-I-Molekülen. Die Proteasomgene LMP2 und

LMP7 (*low molecular mass proteasome*) [Beck et al. 1992] und die Gene der Transporter-Superfamilie ABC (*ATP-binding cassette*) TAP1 und TAP2 (*transporter associated with antigen presentation*) [Trowsdale et al. 1990] sind mit MHC-D-Allelen gekoppelt [Rønningen et al. 1993].

Bei der Verarbeitung antigener Peptide im Zytosol spielt der Proteasomkomplex eine besondere Rolle. Der katalytische 20S-Kern des Proteasoms besteht aus 28 Untereinheiten, die in vier heptamerischen Ringen angeordnet sind [Tanaka et al. 1997]. Die inneren Ringe des Komplexes bestehen aus Untereinheiten, die nach Stimulation mit INF- γ durch LMP2, LMP7 und MECL-1 (*multicatalytic endopeptidase complex-like*) ersetzt werden. Durch diesen Vorgang wird das 20S-Proteasom strukturell umorganisiert und gelangt in einen „Immunproteasom“ genannten Zustand, in dem die Substratspezifität verändert und das Peptidrepertoire erweitert wird [Griffin et al. 1998]. In diesem Zustand wird der Verdau Ubiquitin-markierter Proteine zu Peptiden katalysiert. Das Proteasom kann potentiell antigene Epitope generieren, aber auch zerstören [Vinitzky et al. 1997]. Bisher wurden von LMP2 und LMP7 nur jeweils zwei Varianten beschrieben. Über die Verteilung in afrikanischen Populationen ist bisher nichts bekannt. LMP2 und LMP7 werden von Genen innerhalb der MHC-Klasse-II-Region kodiert. Sie liegen dort etwa 200 kD telomer des DQB1-Locus.

Für die effiziente Antigenpräsentation durch HLA-Klasse-I-Moleküle ist die aktive Translokation der Peptide in das Endoplasmatische Retikulum erforderlich. Dieser Transport ist beim Menschen mit TAP1 und TAP2, typischen Vertretern der ABC-Familie (ABC, *ATP-binding cassette*), assoziiert. Ohne funktionell aktive TAP-Moleküle ist der Zusammenbau und der intrazelluläre Transport von HLA-Klasse-I-Molekülen behindert [Hermel et al. 1991, Esquivel et al. 1992]. Die Selektion der Peptidsequenzen, die durch TAP-Moleküle transportiert werden, ist an die Präferenzen der HLA-Klasse-I-Moleküle angepasst [Gubler et al. 1998, Uebel & Tampe 1999]; allerdings tragen TAP-Varianten selbst ebenfalls zur Epitopselektion bei [Daniel et al. 1998].

Ob diese Gene, die zwischen DPA1 und DQB1 liegen, an den beschriebenen Assoziationen beteiligt sind, ist bisher unklar. Da bei einer erythrozytären Infektion mit *P. falciparum*

eher von einer Präsentation durch HLA-Klasse-II-Molekülen ausgegangen werden muß, sollten bei der Entwicklung einer Immunität gegen erythrozytäre Stadien in erster Linie Gene involviert sein, die eine Bedeutung für Regulation und Expression dieser Proteine haben. Mögliche Kandidaten wären insbesondere die oligomorphen Loci DMA und DMB, bei denen vor kurzem eine entscheidende Bedeutung für die Prozessierung exogener Peptide aufgezeigt wurde [Ceman *et al.* 1995].

4.4. Polymorphismen von Nicht-HLA-Genen und Malaria

4.4.1. Tumornekrosisfaktor-Alpha

In der Studiengruppe aus Gabun wurde bestätigt, daß der Quotient aus IL-10 und TNF α im Plasma ein Risikomarker für zerebrale Malaria und schwere Anämie ist. Bei Kindern mit schwerer Malaria waren diese beiden Komplikationen mit einem IL-10/TNF α -Quotient < 1 assoziiert [May *et al.* 2000c]. Umgekehrt hatten Patienten mit einem IL-10/TNF α -Quotient > 1 häufiger eine Hyperparasitämie. Diese Personen mit einem IL-10/TNF α -Quotient > 1 hatten häufiger die TNF α -Wildtyp-Variante, während solche mit einer Mutation an Position 238 des TNF α -Promotors (TNF^{-238A}) immer einen niedrigeren IL-10 als TNF α -Plasmaspiegel hatten. Allerdings war weder der TNF α -Plasmaspiegel noch der IL-10-Spiegel direkt mit den TNF α -Promotorvarianten assoziiert. Da TNF α und IL-10 von den gleichen Zelltypen - Monozyten/Makrophagen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten - sezerniert werden, ist es vorstellbar, daß eine leichte Hochregulierung von TNF α und eine relative Herunterregulierung von IL-10 zu einem signifikanten Unterschied des IL-10/TNF-Quotienten führen.

Die Ergebnisse in Gabun bestätigten die früher gemachte Beobachtung, daß das Allel TNF^{-238A} immer gemeinsam mit dem Allel TNF^{-376A} vorkommt. Die Bedeutung der Mutation TNF^{-376A} auf die Bindung eines Transkriptionsfaktors und die basale Genexpression wurde *in vitro* gezeigt [Knight *et al.* 1999]. *In vivo* konnte eine Erhöhung des TNF α -Plasmaspiegels

durch TNF α -Promotorvarianten bisher nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus Gabun legen nahe, daß TNF α -Promotorvarianten einen Einfluß auf die Balance von IL-10 und TNF α bei Malariaerkrankten haben und dadurch den Verlauf der schweren Malaria beeinflussen können [May et al. 2000c].

In der Studiengruppe aus Nigeria wurde nur die Verteilung der TNF α -Promotorvarianten, nicht aber die TNF α - und IL-10-Plasmaspiegel untersucht. Es war bei den untersuchten asymptomatischen Kindern keine Assoziation zwischen TNF α -Promotorvarianten und Prävalenz oder Höhe der Parasitämien, dem Vorkommen von multiplen Infektionen oder anderen malariologischen Parametern zu erkennen.

Eine direkte Assoziation zwischen dem homozygoten Auftreten einer TNF α -Promotor-mutation an Position -308 und dem erhöhten Risiko einer schweren Komplikation bei Malaria wurde in einer großen Querschnittstudie in Gambia nachgewiesen [McGuire et al. 1994]. In derselben Studienpopulation wurde später die TNF^{-238A}-Variante als Risikofaktor für eine Anämie bei Malaria beschrieben [McGuire et al. 1999]. In einer neueren Arbeit der selben Arbeitsgruppe wurde die Variante TNF^{-376A} als ein zusätzlicher Risikofaktor einer zerebralen Malaria und TNF^{-238A} als ein relativer Schutzfaktor für diese Komplikation angesehen [Knight et al. 1999]. In Sri Lanka war die Variante TNF^{-308A} mit schweren Infektionen assoziiert, unabhängig davon, ob es sich um eine Malaria oder eine andere Infektion handelte [Wattavidanage et al. 1999]. Interessanterweise war die TNF^{-308A} - Variante in der Gabuner Studiengruppe signifikant mit einer erhöhten Reinfektionsrate und kürzeren Zeitperioden bis zur jeweils nächsten Reinfektion assoziiert.

4.4.2. Interzelluläres Adhäsions-Molekül 1

Die in den Untersuchungen von Fernandez-Reyes [1997] beobachtete hohe Genfrequenz von ICAM-1^{Kilifi} in Kenia wurde in der eigenen Untersuchung in Gabun (27,0%) und Nigeria bestätigt (31,6%) [Kun et al. 1999]. In Kenia wurde beobachtet, daß Kinder mit der Kilifi-Variante häufiger eine schwere Malaria hatten als Kinder mit dem ICAM-1-Wildtyp. In dieser Studie hatten Individuen mit dem homozygoten ICAM-1^{Kilifi}-Genotyp ein relatives Risiko von

2,2 und heterozygote Genträger ein Risiko von 1,4, an einer schweren Malaria zu erkranken [Fernandez-Reyes *et al.* 1997]. Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich in Gabun, daß ICAM-1^{Kilifi}-Träger einen relativen Schutz vor schwerer Malaria hatten [Kun *et al.* 1999]. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung der Malariahypothese, nach der Genvarianten sich in polymorphen Frequenzen in einem Malaria-endemischen Gebiet verbreiten konnten, wenn sie einen relativen Schutz vor Malaria vermitteln. In einer Studie in Gambia wurde keine Assoziation der ICAM-1-Variante mit der Schwere der Malaria gefunden [Bellamy *et al.* 1998]. Ein verändertes Bindungsverhalten der Variante ICAM-1^{Kilifi} an Erythrozytenrezeptoren konnte bisher nicht als Erklärungsmodell für die beobachteten Assoziationen bewiesen werden.

In der Studiengruppe aus Nigeria wurden bei Trägern von ICAM-1^{Kilifi} keine veränderten malariologischen Parameter im Vergleich zu homozygoten Trägern des ICAM-1-Wildtyps nachgewiesen. Entsprechend der Funktion dieses Adhäsionsmoleküls sprechen die Ergebnisse dafür, daß die Variante einen Einfluß auf den Verlauf einer manifesten Malaria, nicht aber auf das Infektionsrisiko hat.

4.4.3. Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

Im Rahmen der Studien in Gabun wurde kürzlich eine Punktmutation an Position -969 im Promotor der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase iNOS^{Lambaréné} beschrieben. Diese Mutation war bei heterozygoten Genträgern mit einer Protektion vor schwerer Malaria assoziiert [Kun *et al.* 1998]. Um den pathophysiologischen Mechanismus der Protektion zu untersuchen, wurden epidemiologische, klinische, proteinbiochemische und molekularbiologische Studien durchgeführt [Kun *et al.* zur Veröffentlichung eingereicht]. Die Variante iNOS^{Lambaréné} ist mit einer Frequenz von etwa 10% am häufigsten in Afrika (Gabun, Nigeria, Senegal) und mit 2,5 bis 3,6% seltener in Asien (Thailand, Papua Neuguinea) verbreitet. In Deutschland wurde das Allel bisher nicht nachgewiesen. Diese Befunde deuten auf eine Selektion der iNOS^{Lambaréné}-Variante in Gegenden mit hoher Malariaendemizität hin.

Klinisch zeigte sich bei Trägern dieser Variante eine signifikant geringere Rate an symptomatischen Reinfektionen als bei Homozygoten mit der Wildtypvariante ($P < 0,002$). *Ex vivo* war die konstitutive NOS-Enzymaktivität von Zellen mit dem iNOS^{Lambaréné}-Allel sieben mal höher als von Zellen, die homozygot für die Wildtypvariante waren ($P < 0,003$). In DNA-Protein-Bindungsassays (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*) wurde gezeigt, daß die Bindung von Kernproteinen bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp verbessert ist [Kun et al. zur Veröffentlichung eingereicht]. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, daß durch die Mutation bei der iNOS^{Lambaréné}-Variante Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren verändert werden und in der Folge die Aktivität des Enzyms erhöht wird. Eine hierdurch gesteigerte Produktion von NOS verbessert wahrscheinlich die Kontrolle einer Parasitämie mit *P. falciparum* und könnte eine Protektion vor schwerer Malaria bei Trägern der Mutante vermitteln. Durch diesen Selektionvorteil könnte sich die Mutante in Gegenden mit Malariaprävalenz durchgesetzt haben.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden in einer Studie aus Tansania keine Assoziation zwischen der iNOS^{Lambaréné}-Variante und einem Schutz vor schwerer Malaria beobachtet [Levesque et al. 1999]. Dieser Unterschied läßt sich dadurch erklären, daß es sich hier um eine Querschnittstudie handelte und andere Parameter untersucht wurden. In einer neueren Studie wurde eine Assoziation von stromabwärts der iNOS^{Lambaréné}-Mutation gelegenen Pentanukleotid-*Repeats* des iNOS-Promotors mit einer erhöhten Empfänglichkeit für zerebrale Malaria beschrieben [Burgner et al. 1998]. In der Gabuner Studiengruppe konnte ein solcher Zusammenhang nicht beobachtet werden.

Der in der Studiengruppe in Gabun gefundene Beziehung zwischen einem erhöhten NO-Spiegel bei Kindern mit der iNOS^{Lambaréné}-Variante und einer Protektion vor schwerer Malaria könnte hypothetisch durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Zum einen könnte bei Trägern der iNOS^{Lambaréné}-Allels die Invasion von Leberzellen durch Sporoziten nach IFN- γ -Induktion zu einer verstärkten Stimulation der iNOS mit einer schnelleren und wirkungsvolleren Abwehr der Parasiten führen. Zum anderen könnte durch eine bessere Induzierbarkeit der iNOS^{Lambaréné}-Variante die Reduktion von infizierten Erythrozyten durch

eine Antikörper-abhängige zelluläre Inhibition beschleunigt werden. Der ADCl-Mechanismus führt nach Opsonierung von Merozoiten zur Sekretion von toxischen Produkten durch aktivierte Monozyten. Die lokale Sekretion von NO nach Ingestion von Merozoiten könnte zytoadhärente infizierte Erythrozyten effizient reduzieren.

4.5. Polymorphismen von Erythrozytenvarianten und Malaria

Faktoren der angeborenen Immunität - vor allem Varianten von Erythrozytenantigenen wie das Sichelzellmerkmal, α -Thalassämie, G6PD-Mangel und Blutgruppenantigenen - haben einen Effekt auf den erythrozytären Zyklus des Parasiten. Sie können in unterschiedlichem Maße die Höhe der Parasitämie beeinflussen. Wird die Entwicklung einer Hyperparasitämie verzögert, so bleibt dem Immunsystem mehr Zeit, eine adäquate Antwort aufzubauen. Allerdings wachsen Parasiten in der Anfangsphase der Infektion oft so stark, daß eine Wachstumshemmung durch Erythrozytenvarianten nur relativ geringe Auswirkungen auf die Höhe der Parasitämie hat.

4.5.1. Sichelzellanämie

Der relative Schutz von heterozygoten Trägern des Sichelzellgens (HbAS) gegenüber der Entwicklung einer schweren Malaria wurde in vielen Studien epidemiologisch nachgewiesen [Pasvol & Weatherall 1980, Harrison 1982, Nagel 1990]. Auch bei der Gabuner Studien-Gruppe zeigte sich beim Vergleich der Kinder mit milder und schwerer Malaria ein protektiver Effekt bei Trägern des Sichelzellmerkmals (OR 2,3, $P < 0,4$) [Lell et al. 1999]. Im longitudinalen Vergleich zeigte sich eine signifikante Verringerung der Parasitämiehöhe und des Hämatokrit bei HbAS-Trägern im Vergleich zu Kindern mit normalen α -Globin; dagegen war kein Unterschied in der Inzidenzrate feststellbar.

Im Gegensatz zu den überzeugenden Ergebnissen zum protektiven Einfluß des Sichelzellmerkmals auf das Risiko einer schweren Malaria lagen bisher nur wenige Untersuchungen zur Assoziation dieser Erythrozytopathie mit asymptomatischer Parasitämie oder mit der

Prävalenz der Parasitämie in hochendemischen Gebieten vor. Bei den klinisch gesunden, asymptomatischen Kindern der Nigerianischen Studiengruppe wurde kein Einfluß des Sichelzellstatus auf die Häufigkeit einer Parasitämie oder dem Vorkommen von subpatenten Infektionen gefunden. Ebenfalls wurde keine Assoziation zur Komplexität der *P.-falciparum*-Infektion oder zur Anzahl der Parasitenspezies bei Infizierten festgestellt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen einer Studie aus Gabun, in der bei Kindern mit Sichelzellgen eine erhöhte Prävalenz multipler Infektionen gefunden wurde [Ntoumi et al. 1997]. In einer Studiengruppe aus Ghana wurde bei einer Querschnittsuntersuchung an asymptomatischen Probanden unterschiedlicher Altersgruppen keine Assoziation des Sichelzellmerkmals mit Infektionsprävalenz, Höhe der Parasitämie, Milzrate oder Milzgröße festgestellt [Burchard et al. im Druck].

Die Ergebnisse bestätigen, daß Träger der Sichelzellmutation keinen Schutz vor einer Infektion mit *P. falciparum* oder einer der anderen Parasitenspezies haben. Allerdings haben Infizierte einen relativen Schutz vor einer höheren Parasitämie und dem Auftreten schwerer Komplikationen.

4.5.2. α -Thalassämie

In Gabun zeigte sich kein ausgeprägter protektiver Effekt der α -Thalassämie gegenüber schwerer Malaria. In der Gruppe mit milder und schwerer Malaria gab es ähnlich viele Kinder mit normalem α -Globin, mit heterozygoter α -Thalassämie und mit homozygoter α -Thalassämie [Lell et al. 1999]. Dies steht im Widerspruch zu früheren Ergebnissen aus Melanesien, wo ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Malaria und der α -Thalassämie festgestellt wurde [Flint et al. 1986]. Später wurde gezeigt, daß Kinder aus dieser Region mit homozygoter α -Thalassämie relativ vor Malaria, aber auch vor anderen Infektionserkrankungen, geschützt waren [Allen et al. 1997].

In Gabun war der Hämatokritwert erwartungsgemäß bei Personen mit homozygoter Thalassämie am niedrigsten und am höchsten bei Probanden mit normalen α -Globin [Lell et al. 1999]. Im longitudinalen Vergleich zeigten sich weder in der Gruppe mit schwerer noch in

der mit milder Malaria signifikante Unterschiede in der Inzidenzrate oder dem Ausmaß der Parasitämie. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Studie in Melanesien eine zweifach erhöhte Inzidenz mit *P. falciparum* oder *P. vivax* bei Kindern mit homozygoter α -Thalassämie festgestellt [Williams et al. 1996].

Bei der Studiengruppe aus Nigeria war der α -Thalassämiestatus der Probanden nicht mit der Prävalenz einer *P.-falciparum*-Infektion oder der Höhe der Parasitämie assoziiert [Mockenhaupt et al. 1999]. Erwartungsgemäß hatten Kinder mit α -Thalassämie geringere Hämoglobinwerte, ein kleineres MCV und ein geringeres MCH als Kinder ohne α -Thalassämie. Die weitere Analyse der Daten zeigte, daß bei infizierten und nicht-infizierten Kinder mit homozygoter α -Thalassämie der Hämoglobinspiegel ähnlich war, während er bei Kindern mit heterozygoter α -Thalassämie oder solchen ohne α -Thalassämie abhängig vom Infektionsstatus war [Mockenhaupt et al. 1999]. Dabei war eine mit α -Thalassämie einhergehende Mikrozytose korreliert mit einem Schutz vor einem durch eine *P.-falciparum*-assoziierten Hämoglobinabfall. Diese Beobachtungen könnten durch einen reduzierten Effekt von Chloroquin gegen *P. falciparum* bei α -thalassämischen Kindern erklärbar sein [Mockenhaupt et al. im Druck].

4.5.3. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel

In der Gabuner Studiengruppe war die Verteilung der G6PD-Genotypen bei Kindern mit schwerer und leichter Malaria nahezu identisch [Lell et al. 1999]. Bei dem Vergleich der longitudinal erhobenen Daten war weder die Inzidenzrate noch die Parasitämiehöhe oder der Hämatokrit mit dem G6PD-Genotyp assoziiert. Frühere Arbeiten über die protektive Rolle des G6PD-Mangels führten zu widersprüchlichen Ergebnissen [Gilles et al. 1967, Bienzle et al. 1972, Martin et al. 1979]. Eine große Querschnittstudie bei Kindern aus Gambia zeigte einen protektiven Effekt der Mangelvariante G6PD A⁻ gegenüber schwerer Malaria [Ruwende et al. 1995]; dieser Effekt wurde in der Gabuner Längsschnittstudie nicht bestätigt.

In Nigeria zeigte sich keine Assoziation zwischen G6PD-Genotypen und der Prävalenz der Plasmodieninfektion, der Höhe der Parasitämie oder der Komplexität der Infektion bezüglich der Anzahl der Plasmodiumspezies oder der detektierbaren *P.-falciparum*-Klone [May et al. 2000b]. In der Studie konnte gezeigt werden, daß hemi- und homozygote Kinder mit G6PD A⁻-Mangel eine signifikant erniedrigte Erythrozytenzahl hatten. Die Pyruvatkinase-Aktivität als Indikator für ein niedriges Erythrozytenalter war bei Kindern mit G6PD-Mangel ebenfalls erniedrigt. Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, daß auch der relativ geringgradige afrikanische G6PD-Mangel zu einer subklinischen Hämolyse und dadurch zu einer jüngeren Erythrozytenpopulation führt. Als praktische Konsequenz hat dies zur Folge, daß die Diagnose eines heterozygoten G6PD-Mangels (G6PD B/A⁻) mit biochemischen Methoden häufig zu falsch negativen Ergebnissen führt [May et al. 2000b]. Wenn möglich, sollte bei derartigen Fragestellungen eine Typisierung der G6PD-Varianten auf DNA-Ebene erfolgen. Im Verlauf dieser Studien wurde die bisher unbekannt Variante G6PD¹⁴³¹ beschrieben, die die Erstellung eines partiellen Stammbaums afrikanischer G6PD-Varianten ermöglicht. In einer anderen Studie an klinisch gesunden Personen aus Ghana wurde, ähnlich den Ergebnissen in Nigeria ebenfalls kein Zusammenhang zwischen G6PD-Mangel und Plasmodienprävalenz, Parasitämie oder epidemiologischen Milzrate gefunden [Burchard et al. im Druck].

Andere klinische Studien haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Eine frühe Studie von 700 Kindern in Nigeria zeigte eine partielle Protektion vor Malaria bei Männern mit G6PD A und vor allem bei Frauen mit dem GdB/GdA-Genotyp. Patienten mit den Genotypen GdA und GdA⁻ hatten insgesamt weniger Parasiten als GdB-Träger. Kein Schutz wurde für defiziente Hemizygoten und Homozygoten nachgewiesen [Bienzle et al. 1972]. Einen Schutz von G6PD-Defizienten gegenüber einer letalen Malaria fanden weitere Arbeitsgruppen, die allerdings eine Differenzierung von heterozygoten und defizienten Frauen nicht vornahm [Gilles et al. 1967]. Eine neuere Arbeit aus West- und Ostafrika hat einen geschlechtsunabhängigen partiellen Schutz vor schwerer Malaria für G6PD A⁻-Träger ermittelt (46-58% reduziertes Risiko); eine Protektion für Heterozygoten konnte nicht

bestätigt werden [Ruwende et al. 1995]. Andere Untersuchungen fanden keinen Hinweis auf eine Protektion vor Malaria bei G6PD-Defizienten [Martin et al. 1979], bzw. keine Verringerung der Parasitendichte bei Infizierten [Porter et al. 1964].

4.5.4. Blutgruppen

In der Gabuner Studiengruppe waren Patienten mit schwerer Malaria häufiger positiv für die Blutgruppe A als die Patienten mit milder Malaria [Lell et al. 1999]. Diese Befunde entsprechen früheren Ergebnissen aus Zimbabwe [Fischer & Boone 1998]. Ein niedrigerer Hämoglobinspiegel bei Patienten mit Blutgruppe A, so wie er in Zimbabwe beschrieben wurde, konnte aber in Gabun nicht gefunden werden. Als Trend war zu beobachten, daß Patienten aus Gabun mit Blutgruppe A bei Reinfektionen höhere Parasitämien aufwiesen. Bei diesen Patienten wurde auch eine höhere Rate an Rosetten-formierenden Parasiten-isolaten gefunden als bei Patienten mit anderen Blutgruppen [Kun et al. 1998]. Diese Ergebnisse haben Untersuchungen nach sich gezogen, in denen experimentell gezeigt wurde, daß das Blutgruppenantigen A ein Korezeptor bei der Rosettenformation von *P.-falciparum*-infizierten Erythrozyten ist [Barragan et al. 2000]. Dies bestätigt die Beobachtungen vorangegangener Arbeiten, in denen eine höhere Rosettingrate bei Patienten mit Blutgruppe A beschrieben wurde [Udomsangpetch et al. 1993].

Eine andere Hypothese vermutet die Beteiligung von immunologischen Mechanismen, bei denen es zu einer Kreuzreaktion von Antikörpern gegen Blutgruppe A gegen Antigene von *P.-falciparum*-infizierten Erythrozyten kommt [Harrison & Ridley 1975]. Unklar war bisher, ob Blutgruppen-Antigene auch die Parasitämie oder hämatologische Parameter bei asymptomatisch infizierten Kindern beeinflussen können. In der Studie in Nigeria konnte ein solcher Einfluß bei keiner Blutgruppenkonstellation nachgewiesen werden.

4.6. Koevolution von Wirt und Parasit

Neuere Untersuchungen zeigen, daß es nicht nur zu einer Anpassung des Wirtes an den Parasiten, sondern umgekehrt auch zu einer Anpassung des Parasiten an den Wirt gekommen ist. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Untersuchungen zu Assoziationen von Genvarianten von *P. falciparum* mit dem Verlauf einer Malaria tropica veröffentlicht [Engelbrecht et al. 1995, Robert et al. 1996]. Zum Teil waren diese Assoziationen von der Transmissionsstärke und anderen Faktoren abhängig [Walliker et al. 1998]. In anderen Untersuchungen wurden geographische Unterschiede von Plasmodiengenvarianten nachgewiesen, die auf einen Selektionsdruck einiger dieser Allele hindeuteten [Creasey et al. 1990, Conway et al. 1992, Conway 1997].

Die hier zusammengefaßten Untersuchungen unterstützen die Hypothese, daß die Auseinandersetzung von Mensch und Plasmodien zu einer ständigen gegenseitigen Beeinflussung und Anpassung geführt hat. Die koevolutionäre Veränderung der Genome der beiden Organismen ist wahrscheinlich mitverantwortlich für die unterschiedliche geographische Verteilung von polymorphen Genen sowohl des Menschen als auch der Plasmodien und scheint auch heute noch Teil einer komplexen und dynamischen Anpassung von Wirt und Parasit zu sein [Schnittger et al. 1997, May et al. 1998a, May et al. 1999b].

5. Referenzen

- Abbas AK, Lichtman AH & Pober JS.** Cellular and molecular immunology 1994; *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: W. B. Saunders.
- Abdalla S, Weatherall DJ, Wickramasinghe SN & Hughes M.** The anaemia of *P. falciparum* malaria. *Br J Haematol* 1980; 46:171-183.
- Abel L, Cot M, Mulder L, Carnevale P & Feingold J.** Segregation analysis detects a major gene controlling blood infection levels in human malaria. *Am J Hum Genet* 1992; 50:1308-1317.
- Abraham LJ & Kroeger KM.** Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* 1999; 66:562-566.
- Aguado B, Bahram S, Beck S, Campbell RD, Forbes SA, Geraghty D, Guillaudeux T, Hood L, Horton R, Inoko H, Janer M, Jasoni C, Madan A, Milne S, Neville M, Oka A, Qin S, Ribas-Despuig G, Rogers J, Rowen L, Shiina T, Spies T, Tamiya G, Tashiro H, Trowsdale J, Vu Q, Williams L & Yamazaki M.** Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; 401:921-924.
- Aidoo M, Lalvani A, Allsopp CE, Plebanski M, Meisner SJ, Krausa P, Browning M, Morris-Jones S, Gotch F, Fidock DA & et al.** Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-inducing vaccine against malaria. *Lancet* 1995; 345:1003-1007.
- Aikawa M, Rabbege JR, Udeinya I & Miller LH.** Electron microscopy of knobs in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Parasitol* 1983; 69:435-437.
- Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND, Alpers MP, Peto TEA, Clegg JB & Weatherall DJ.** alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:14736-14741.
- Allison AC.** Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* 1954; i:290-294.
- Arellano J, Granados J, Perez E, Felix C & Kretschmer RR.** Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo patients with amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunol* 1991; 13:23-29.
- Arellano J, Isibasi A, Miranda R, Higuera F, Granados J & Kretschmer RR.** HLA antigens associated to amoebic abscess of the liver in Mexican mestizos. *Parasite Immunol* 1987; 9:757-760.
- Arese P, Cappadoro M, Giribaldi G & Turrini F.** The Malaria/ G6PD Hypothesis Revisited: Reply. *Parasitol Today* 1994; 10:262-263.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore RE, Seidman JG, Smith JA & Struhl K.** Short protocols in molecular biology 1992; *Short protocols in molecular biology*: Wiley.
- Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E & Unanue ER.** Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985; 317:359-361.
- Barragan A, Kreamsner PG, Wahlgren M & Carlson J.** Blood group A antigen is a coreceptor in plasmodium falciparum rosetting. *Infect Immun* 2000; 68:2971-2975.
- Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF & Howard RJ.** Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 1995; 82:77-87.
- Bate CA, Taverne J, Karunaweera ND, Mendis KN, Kwiatkowski D & Playfair JH.** Serological relationship of tumor necrosis factor-inducing exoantigens of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *Infect Immun* 1992; 60:1241-1243.

- Beck HP, Felger I, Barker M, Bugawan T, Genton B, Alexander N, Jazwinska E, Erlich H & Alpers M.** Evidence of HLA class II association with antibody response against the malaria vaccine SPF66 in a naturally exposed population. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53:284-288.
- Beck S, Kelly A, Radley E, Khurshid F, Alderton RP & Trowsdale J.** DNA sequence analysis of 66 kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J Mol Biol* 1992; 228:433-441.
- Bellamy R, Kwiatkowski D & Hill AV.** Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92:312-316.
- Bennett S, Allen SJ, Olerup O, Jackson DJ, Wheeler JG, Rowe PA, Riley EM & Greenwood BM.** Human leucocyte antigen (HLA) and malaria morbidity in a Gambian community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87:286-287.
- Berendt AR, Ferguson DJ, Gardner J, Turner G, Rowe A, McCormick C, Roberts D, Craig A, Pinches R, Elford BC & et al.** Molecular mechanisms of sequestration in malaria. *Parasitology* 1994; 108:S19-28.
- Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI & Marsh K.** Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1989; 341:57-59.
- Beutler E.** Red cell metabolism. A manual of biochemical methods 1975; *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton.
- Bienzele U, Ayeni O, Lucas AO & Luzzatto L.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. *Lancet* 1972; i:107-110.
- Bienzele U, Guggenmoos-Holzmann I & Luzzatto L.** *Plasmodium falciparum* malaria and human red cells. I. Genetic and clinical study in children. *International Journal of Epidemiology* 1980; 10:9-15.
- Birnboim HC & Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7:1513-1523.
- Bjorkman PJ & Parham P.** Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:253-288.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL & Wiley DC.** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329:506-512.
- Bodmer J, Bodmer W, Heyes J, So A, Tonks S, Trowsdale J & Young J.** Identification of HLA-DP polymorphism with DP alpha and DP beta probes and monoclonal antibodies: correlation with primed lymphocyte typing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:4596-4600.
- Bodmer WF.** Evolutionary significance of the HL-A system. *Nature* 1972; 237:139-145 passim.
- Bottius E, BenMohamed L, Brahim K, Gras H, Lepers JP, Raharimalala L, Aikawa M, Meis J, Slierendregt B, Tartar A, Thomas A & Druilhe P.** A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and CTL epitopes. *J Immunol* 1996b; 156:2874-2884.
- Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T & Druilhe 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. *J Exp Med* 1990; 172:1633-1641.
- Bouharoun-Tayoun H, Oeuvcay C, Lunel F & Druilhe P.** Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* 1995; 182:409-418.
- Boyd MF & Kitchen SF.** Simultaneous inoculation with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med* 1937; 17:855-861.

- Brandts CH, Ndjave M, Graninger W & Kremsner PG.** Effect of paracetamol on parasite clearance time in *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1997; 350:704-709.
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL & Wiley DC.** Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364:33-39.
- Bruce-Chwatt LJ.** A longitudinal survey of malaria infection in a group of West African adults. II. *W Afr Med J* 1963a; 12:199-217.
- Bruce-Chwatt LJ.** A longitudinal survey of malaria infection in a group of West African adults. I. *W Afr Med J* 1963b; 12:141-173.
- Bugawan TL, Begovich AB & Erlich HA.** Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA and nonradioactive sequence-specific oligonucleotide probes. *Immunogenetics* 1990; 32:231-241.
- Bugawan TL, Horn GT, Long CM, Mickelson E, Hansen JA, Ferrara GB, Angelini G & Erlich HA.** Analysis of HLA-DP allelic sequence polymorphism using the in vitro enzymatic DNA amplification of DP-alpha and DP-beta loci. *J Immunol* 1988; 141:4024-4030.
- Burchard GD, Browne ENL, Sievertsen J, May J & Meyer CG.** Spleen size determined by ultrasound in patients with AS trait, AC trait and G6PD deficiency in a hyperendemic malaria region (Ashanti Region/Ghana). (im Druck).
- Burgner D, Xu W, Rockett K, Gravenor M, Charles IG, Hill AV & Kwiatkowski D.** Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. *Lancet* 1998; 352:1193-1194.
- Butcher G.** Cross-species immunity in malaria. *Parasitol Today* 1998; 14:166.
- Cannings C & Cavalli-Sforza L.** Human population structure. *Adv Hum Genet* 1973; 4:105-171.
- Carlson J.** Inborn resistance to malaria. in: Wahlgren M & Perlmann P, eds. *Malaria - molecular and clinical aspects* 1999 (Amsterdam: Harwood Academic Publishers) 363-378.
- Carlson J, Helmby H, Hill AV, Brewster D, Greenwood BM & Wahlgren M.** Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet* 1990; 336:1457-1460.
- Ceman S, Rudersdorf RA, Petersen JM & DeMars R.** DMA and DMB are the only genes in the class II region of the human MHC needed for class II-associated antigen processing. *J Immunol* 1995; 154:2545-2556.
- Church GM & Gilbert W.** The genomic sequencing technique. *Prog Clin Biol Res* 1985; 177:17-21.
- Clark IA & Hunt NH.** Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect Immun* 1983; 39:1-6.
- Clegg JB & Weatherall DJ.** Thalassemia and malaria: new insights into an old problem. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111:278-282.
- Cohen JE.** Heterologous immunity in human malaria. *Q Rev Biol* 1973; :467-489.
- Cohen S, McGregor IA & Carrington SP.** Gammaglobulin and acquired immunity to malaria. in: Garnham PC, Pierce AE & Roitt I, eds. *Immunity to protozoa* 1961 (Oxford, United Kingdom: Blackwell Scientific Publications) 123-159.
- Collins WE, Skinner JC, Richardson BB & Stanfill PS.** Studies on the transmission of simian malaria. VI. Mosquito infection and sporozoite transmission of *Plasmodium fragile*. *J Parasitol* 1975; 61:718-721.
- Connelly M, King CL, Bucci K, Walters S, Genton B, Alpers MP, Hollingdale M & Kazura JW.** T-cell immunity to peptide epitopes of liver-stage antigen 1 in an area of Papua New Guinea in which malaria is holoendemic. *Infect Immun* 1997; 65:5082-5087.

- Conway DJ.** Natural selection on polymorphic malaria antigens and the search for a vaccine. *Parasitol Today* 1997; 13:26-29.
- Conway DJ, Greenwood BM & McBride JS.** Longitudinal study of Plasmodium falciparum polymorphic antigens in a malaria-endemic population. *Infect Immun* 1992; 60:1122-1127.
- Coppel RL, Brown GV & Nussenzweig V.** Adhesive proteins of the malaria parasite. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1:472-481.
- Craig AG, Pinches R, Khan S, Roberts DJ, Turner GD, Newbold CI & Berendt AR.** Failure to block adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to ICAM-1 with soluble ICAM-1. *Infect Immun* 1997; 65:4580-4585.
- Creasey A, Fenton B, Walker A, Thaithong S, Oliveira S, Mutambu S & Walliker D.** Genetic diversity of Plasmodium falciparum shows geographical variation. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42:403-413.
- Croft M.** Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:431-437.
- Daniel S, Brusic V, Caillat-Zucman S, Petrovsky N, Harrison L, Riganelli D, Sinigaglia F, Gallazzi F, Hammer J & van Endert PM.** Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. *J Immunol* 1998; 161:617-624.
- Dausset J.** Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang* 1954; 4:190-198.
- David PH, Handunnetti SM, Leech JH, Gamage P & Mendis KN.** Rosetting: a new cytoadherence property of malaria-infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38:289-297.
- Dieye A, Rogier C, Trape J-F, Sarthou J-L & Druilhe P.** HLA class I-associated resistance to severe malaria: a parasitological re-assessment. *Parasitol Today* 1997; 13:48-49.
- Druilhe P & Marchand C.** From sporozoite to liver stages: the saga of the irradiated sporozoite vaccine. in: McAdam K, ed. *New strategies in parasitology* 1989 (Edinburgh, United Kingdom: Churchill Livingstone) 39-48.
- Druilhe P & Perignon JL.** Mechanisms of defense against P. falciparum asexual blood stages in humans. *Immunol Lett* 1994; 41:115-120.
- Druilhe P, Pradier O, Marc JP, Miltgen F, Mazier D & Parent G.** Levels of antibodies to Plasmodium falciparum sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. *Infect Immun* 1986; 53:393-397.
- Druilhe PL, Rénia L & Fidock DA.** Immunity to liver stages. in: Sherman IW, ed. *Malaria - parasite biology, pathogenesis, and protection* 1998 (Washington: ASM Press) 513-544.
- Dyer PA & Martin S.** Techniques used to define human MHC antigens: serology. *Immunol Lett* 1991; 29:15-21.
- Eiermann TH, Bettens F, Tiberghien P, Schmitz K, Beurton I, Bresson-Hadni S, Ammann RW, Goldmann SF, Vuitton DA, Gottstein B & Kern P.** HLA and alveolar echinococcosis. *Tissue Antigens* 1998; 52:124-129.
- Engelbrecht F, Felger I, Genton B, Alpers M & Beck HP.** Plasmodium falciparum: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Exp Parasitol* 1995; 81:90-96.
- Erlich HA.** PCR Technology 1989; *PCR Technology*. New York: Stockton Press.
- Erlich HA & Gyllensten UB.** Shared epitopes among HLA class II alleles: gene conversion, common ancestry and balancing selection. *Immunol Today* 1991; 12:411-414.
- Esquivel F, Yewdell J & Bennink J.** RMA/S cells present endogenously synthesized cytosolic proteins to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 175:163-168.

- Facer CA.** Direct antiglobulin reactions in Gambian children with *P. falciparum* malaria. III. Expression of IgG subclass determinants and genetic markers and association with anaemia. *Clin Exp Immunol* 1980; 41:81-90.
- Facer CA, Bray RS & Brown J.** Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. I. Incidence and class specificity. *Clin Exp Immunol* 1979; 35:119-127.
- Fernandez-Mestre MT, Layrisse Z, Montagnani S, Acquatella H, Catalioti F, Matos M, Balbas O, Makhatadze N, Dominguez E, Herrera F & Madrigal A.** Influence of the HLA class II polymorphism in chronic Chagas' disease. *Parasite Immunol* 1998; 20:197-203.
- Fernandez-Reyes D, Craig AG, Kyes SA, Peshu N, Snow RW, Berendt AR, Marsh K & Newbold CI.** A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1357-1360.
- Ferrante A, Kumaratilake L, Rzepczyk CM & Dayer JM.** Killing of *Plasmodium falciparum* by cytokine activated effector cells (neutrophils and macrophages). *Immunol Lett* 1990; 25:179-187.
- Fidock DA, Bottius E, Brahimi K, Moelans, II, Aikawa M, Konings RN, Certa U, Olafsson P, Kaidoh T, Asavanich A, Guérin-Marchand C & Druilhe P.** Cloning and characterization of a novel *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigen, STARP. *Mol Biochem Parasitol* 1994a; 64:219-232.
- Fidock DA, Gras-Masse H, Lepers JP, Brahimi K, Benmohamed L, Mellouk S, Guerin-Marchand C, Londono A, Raharimalala L, Meis JF & et al.** *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1 is well conserved and contains potent B and T cell determinants. *J Immunol* 1994c; 153:190-204.
- Fidock DA, Sallenave-Sales S, Sherwood JA, Gachihi GS, Ferreira-da-Cruz MF, Thomas AW & Druilhe P.** Conservation of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein gene, STARP, in field isolates and distinct species of *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol* 1994b; 67:255-267.
- Fischer PR & Boone P.** Short report: severe malaria associated with blood group. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58:122-123.
- Fling SP, Arp B & Pious D.** HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 1994; 368:554-558.
- Flint J, Harding RM, Boyce AJ & Clegg JB.** The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* 1998; 11:1-51.
- Flint J, Hill AV, Bowden DK, Oppenheimer SJ, Sill PR, Serjeantson SW, Bana-Koiri J, Bhatia K, Alpers MP, Boyce AJ & et al.** High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature* 1986; 321:744-750.
- Franco A, Barnaba V, Natali P, Balsano C, Musca A & Balsano F.** Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigen on human hepatocytes. *Hepatology* 1988; 8:449.
- Friedman MJ.** Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. *Nature* 1979; 280:245-251.
- Garcia A, Cot M, Chippaux JP, Ranque S, Feingold J, Demenais F & Abel L.** Genetic control of blood infection levels in human malaria: evidence for a complex genetic model. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58:480-488.
- Gilbert SC, Plebanski M, Gupta S, Morris J, Cox M, Aidoo M, Kwiatkowski D, Greenwood BM, Whittle HC & Hill AV.** Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. *Science* 1998; 279:1173-1177.
- Giles RC & Capra JD.** Structure, function, and genetics of human class II molecules. *Adv Immunol* 1985; 37:1-71.
- Gilles H.** Tropical clinical epidemiology--'a new name for an old art'. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80:353-359.

- Gilles HM, Fletcher KA, Hendrickse RG, Lindner R, Reddu S & Allan N.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase, sickling and malaria in African children in Southwestern Nigeria. *Lancet* 1967; i:138-140.
- Good MF & Doolan DL.** Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:412-419.
- Good MF, Kaslow DC & Miller LH.** Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:57-87.
- Good MF & Miller LH.** T-cell antigens and epitopes in malaria vaccine design. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 155:65-78.
- Gottstein B & Bettens F.** Association between HLA-DR13 and susceptibility to alveolar echinococcosis. *J Infect Dis* 1994; 169:1416-1417.
- Grau GE & De Kossodo S.** Pathophysiology of cerebral malaria. Cerebral malaria: mediators, mechanical obstruction or more? *Parasitol Today* 1994; 10:408-414.
- Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M & Lambert PH.** Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* 1989; 320:1586-1591.
- Gravenor MB & Kwiatkowski D.** An analysis of the temperature effects of fever on the intra-host population dynamics of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 1998; 117:97-105.
- Greenwood B, Marsh K & Snow R.** Why do some African children develop severe malaria? *Parasitol Today* 1991; 7:277-281.
- Greenwood BM.** Asymptomatic malaria - Do they matter? *Parasitol Today* 1987; 3:206-214.
- Greenwood BM, Bradley AK, Greenwood AM, Byass P, Jammeh K, Marsh K, Tulloch S, Oldfield FS & Hayes R.** Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81:478-486.
- Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Kaer LV, Monaco JJ & Colbert RA.** Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med* 1998; 187:97-104.
- Gubler B, Daniel S, Armandola EA, Hammer J, Caillat-Zucman S & van Endert PM.** Substrate selection by transporters associated with antigen processing occurs during peptide binding to TAP. *Mol Immunol* 1998; 35:427-433.
- Guerin-Marchand C, Druilhe P, Galey B, Londono A, Patarapotikul J, Beaudoin RL, Dubeaux C, Tartar A, Mercereau-Puijalon O & Langsley G.** A liver-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning. *Nature* 1987; 329:164-167.
- Gunewardena DM, Carter R & Mendis KN.** Patterns of acquired anti-malarial immunity in Sri Lanka. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:63-65.
- Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K & Newbold C.** Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* 1999; 5:340-343.
- Gupta S, Trenholme K, Anderson RM & Day KP.** Antigenic diversity and the transmission dynamics of *Plasmodium falciparum*. *Science* 1994; 263:961-963.
- Gyllensten UB & Erlich HA.** Ancient roots for polymorphism at the HLA-DQ alpha locus in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:9986-9990.
- Haldane JBS, 1949. . *Proceedings of the Eighth International Congress of Genetics and Heredity*: Hereditas.

- Harrison J & Ridley DS.** Heterologous reactions involving parasites, blood group antibodies and tissue components. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975; 69:312-317.
- Harrison KA.** Anaemia, malaria and sickle cell disease. *Clin Obstet Gynaecol* 1982; 9:445-477.
- Heard R.** HLA and autoimmune disease. in: Lechler R, ed. *HLA and disease* 1994 (San Diego: Academic Press Inc.) 131-144.
- Hebbel RP.** Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* 1991; 77:214-237.
- Hermel E, Grigorenko E & Lindahl KF.** Expression of medial class I histocompatibility antigens on RMA-S mutant cells. *Int Immunol* 1991; 3:407-412.
- Hill AV.** The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:593-617.
- Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ & Greenwood BM.** Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991; 352:595-600.
- Hill AV, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gao XM, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend AR, McMichael A & Whittle HC.** Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992; 360:434-439.
- Hill AV, Jepson A, Plebanski M & Gilbert SC.** Genetic analysis of host-parasite coevolution in human malaria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997; 352:1317-1325.
- Hill RB, Cambournac FJC & Simoes MP.** Observations on the course of malaria in children in an endemic region. *Am J Trop Med* 1943; 23:147-162.
- Ho M & Webster HK.** Immunology of human malaria. A cellular perspective. *Parasite Immunol* 1989; 11:105-116.
- Hoffman SL, Isenbarger D, Long GW, Sedegah M, Szarfman A, Waters L, Hollingdale MR, van der Meide PH, Finbloom DS & Ballou WR.** Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. *Science* 1989; 244:1078-1081.
- Hollingdale MR, Nardin EH, Tharavanij S, Schwartz AL & Nussenzweig RS.** Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J Immunol* 1984; 132:909-913.
- Hommel M & Semoff S.** Expression and function of erythrocyte-associated surface antigens in malaria. *Biol Cell* 1988; 64:183-203.
- Horwitz JP, Chua J, Noel M, Donatti JT & Freisler J.** Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J Med Chem* 1966; 9:447.
- Hughes AL & Nei M.** Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 1988; 335:167-170.
- Hurley CK.** HLA diversity in African Americans. *Transplant Proc* 1993; 25:2399.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky IJ & White TJ.** PCR Protocols. A guide to methods and applications 1990; *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. San Diego, New York: Academic Press, Inc.
- Jacobs P, Radzioch D & Stevenson MM.** Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *J Immunol* 1995; 155:5306-5313.
- Jeffery GM.** Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of *Plasmodium*. *Bull WHO* 1966; 35:873-882.

Jepson A, Sisay-Joof F, Banya W, Hassan-King M, Frodsham A, Bennett S, Hill AVS & Whittle H. Genetic linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in Gambian children: study of affected sibling pairs. *British Medical Journal* 1997; 315:96-97.

Jepson AP, Banya WA, Sisay-Joof F, Hassan-King M, Bennett S & Whittle HC. Genetic regulation of fever in Plasmodium falciparum malaria in Gambian twin children. *J Infect Dis* 1995; 172:316-319.

Johnson RA, Waddelow TA, Caro J, Oliff A & Roodman GD. Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice. *Blood* 1989; 74:130-138.

Kappes D & Strominger JL. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:991-1028.

Kappler JW, Roehm N & Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49:273-280.

Karunaweera ND, Grau GE, Gamage P, Carter R & Mendis KN. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in Plasmodium vivax malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:3200-3203.

Kaslow DC. Acquired immunity to sexual stages. in: Sherman IW, ed. *Malaria - parasite biology, pathogenesis, and protection* 1998 (Washington: ASM Press) 457-466.

Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ, Shackelford DA & Strominger J. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 1984; 36:1-13.

Kelly AP, Monaco JJ, Cho SG & Trowsdale J. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 1991; 353:571-573.

Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ & Dietrich M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated Plasmodium falciparum malaria. *Am J Med* 1989; 87:139-143.

Kimura E, Mattei D, di Santi SM & Scherf A. Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived from malaria patients. *Gene* 1990; 91:57-62.

Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex 1986; *Natural history of the major histocompatibility complex*. New York, NY: John Wiley & Sons Inc.

Klein J. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. *Hum Immunol* 1987; 19:155-162.

Klein J. Of HLA, tryps, and selection: an essay on coevolution of MHC and parasites. *Hum Immunol* 1991; 30:247-258.

Klein J & Figueroa F. Evolution of the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol* 1986; 6:295-386.

Klein J & O'Huigin C. MHC polymorphism and parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 346:351-357; discussion 357-358.

Knight JC & Kwiatkowski D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111:290-298.

Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K & Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 1999; 22:145-150.

- Korman AJ, Boss JM, Spies T, Sorrentino R, Okada K & Strominger JL.** Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens. *Immunol Rev* 1985; 85:45-86.
- Kremsner PG, Neifer S, Chaves MF, Rudolph R & Bienzle U.** Interferon-gamma induced lethality in the late phase of *Plasmodium vinckei* malaria despite effective parasite clearance by chloroquine. *Eur J Immunol* 1992; 22:2873-2878.
- Kremsner PG, Radloff P, Metzger W, Wildling E, Mordmuller B, Philipps J, Jenne L, Nkeyi M, Prada J, Bienzle U & et al.** Quinine plus clindamycin improves chemotherapy of severe malaria in children. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1603-1605.
- Kremsner PG, Winkler S, Brandts C, Wildling E, Jenne L, Graninger W, Prada J, Bienzle U, Juillard P & Grau GE.** Prediction of accelerated cure in *Plasmodium falciparum* malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53:532-538.
- Kremsner PG, Winkler S, Wildling E, Prada J, Bienzle U, Graninger W & Nussler AK.** High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:44-47.
- Kun J, Mordmüller B, Perkins DJ, Lell B, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg B & Kremsner PG.** NOS^{Lambaréne} mutation and NO production in malaria patients. (zur Veröffentlichung eingereicht) .
- Kun JF, Mordmuller B, Lell B, Lehman LG, Luckner D & Kremsner PG.** Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet* 1998; 351:265-266.
- Kun JFJ, Klabunde J, Lell B, Luckner D, Alpers M, May J, Meyer CG & Kremsner PG.** The ICAM-1^{Kilifi} mutation is associated with protection against severe malaria in Lambaréné, Gabon. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:776-779.
- Kun JFJ, Schmidt-Ott RJ, Lehman LG, Lell B, Luckner D, Greve B, Matousek P & Kremsner PG.** Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambaréné, Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92:110-114.
- Kurdi-Haidar B & Luzzatto L.** Expression and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 41:83-91.
- Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, Behr C & Hviid L.** Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 1998; 351:1768-1772.
- Kwiatkowski D.** Genetic susceptibility to malaria getting complex. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10:320-324.
- Kwiatkowski D, Cannon JG, Manogue KR, Cerami A, Dinarello CA & Greenwood BM.** Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol* 1989a; 77:361-366.
- Kwiatkowski D & Greenwood BM.** Why is malaria fever periodic? *Parasitol Today* 1989b; 5:264-266.
- Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR & Greenwood BM.** TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1990; 336:1201-1204.
- Kwiatkowski D, Molyneux ME, Stephens S, Curtis N, Klein N, Pointaire P, Smit M, Allan R, Brewster DR, Grau GE & et al.** Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q J Med* 1993; 86:91-98.
- Kwiatkowski D & Perlmann P.** Inflammatory processes in the pathogenesis of malaria. in: Wahlgren M & Perlmann P, eds. *Malaria - molecular and clinical aspects* 1999 (Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

- Lalvani A & Hill AV.** Cytotoxic T-lymphocytes against malaria and tuberculosis: from natural immunity to vaccine design. *Clin Sci (Colch)* 1998; 95:531-538.
- Lalvani A, Hurt N, Aidoo M, Kibatata P, Tanner M & Hill AV.** Cytotoxic T lymphocytes to Plasmodium falciparum epitopes in an area of intense and perennial transmission in Tanzania. *Eur J Immunol* 1996; 26:773-779.
- Lander ES & Schork NJ.** Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265:2037-2048.
- Le Moine O, Louis H, Sermon F, Goldman M & Deviere J.** Interleukin-10 and liver diseases. *Acta Gastroenterol Belg* 1999; 62:1-8.
- Lell B, May J, Schmidt-Ott R, Lehmann LG, Kuckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herbich K, Meyer CG, Bienzle U & Kreamsner PG.** The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin Infect Dis* 1999; 28:794-799.
- Levesque MC, Hobbs MR, Anstey NM, Vaughn TN, Chancellor JA, Pole A, Perkins DJ, Misukonis MA, Chanock SJ, Granger DL & Weinberg JB.** Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, nitric oxide production, and disease severity in Tanzanian children with malaria. *J Infect Dis* 1999; 180:1994-2002.
- Looareesuwan S, Merry AH, Phillips RE, Pleehachinda R, Wattanagoon Y, Ho M, Charoenlarp P, Warrell DA & Weatherall DJ.** Reduced erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients. *Br J Haematol* 1987b; 67:473-478.
- Looareesuwan S, White NJ, Chittamas S, Bunnag D & Harinasuta T.** High rate of Plasmodium vivax relapse following treatment of falciparum malaria in Thailand. *Lancet* 1987a; 2:1052-1055.
- Luckner D, Lell B, Greve B, Lehman LG, Schmidt-Ott RJ, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Mba R & Kreamsner PG.** No influence of socioeconomic factors on severe malarial anaemia, hyperparasitaemia or reinfection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92:478-481.
- Luty AJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Migot-Nabias F, Deloron P, Nussenzweig RS & Kreamsner PG.** Interferon- γ responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis* 1999; 179:980-988.
- Luty AJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Ulbert S, Migot-Nabias F, Dubois B, Deloron P & Kreamsner PG.** Parasite antigen-specific interleukin-10 and antibody responses predict accelerated parasite clearance in Plasmodium falciparum malaria. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9:639-646.
- Luzzatto L.** Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood* 1979; 54:961-976.
- Luzzatto L & Mehta A.** The metabolic and molecular basis of inherited disease. in: Scriver, ed. *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency* 1995; 3367-3398.
- Luzzatto L, Nwachuku-Jarrett ES & Reddy S.** Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. *Lancet* 1970; 1:319-321.
- Luzzatto L, Usanga FA & Reddy S.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science* 1969; 164:839-842.
- Mabey DC, Brown A & Greenwood BM.** Plasmodium falciparum malaria and Salmonella infections in Gambian children. *J Infect Dis* 1987; 155:1319-1321.
- Mack DG, Johnson JJ, Roberts F, Roberts CW, Estes RG, David C, Grumet FC & McLeod R.** HLA-class II genes modify outcome of Toxoplasma gondii infection. *Int J Parasitol* 1999; 29:1351-1358.
- MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S & Warrell DA.** Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* 1985; 119:385-401.

Maitland K, Williams T, Bennett S, Newbold CI, Peto TEA, Viji J, Timothy R, Clegg JB, Weatherall DJ & Bowden DK. The interaction between *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in children on Espiritu Santo island, Vanuatu. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:614-620.

Maitland KA, Williams TN & Newbold CI. *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: Biological interactions and the possibility of cross-species immunity. *Parasitol Today* 1997; 13:227-231.

Marsh K. Malaria - a neglected disease? *Parasitology* 1992; 104:S53-S66.

Marsh K. Clinical features of malaria. in: Wahlgren M & Perlmann P, eds. *Malaria - molecular and clinical aspects* 1999 (Amsterdam: Harwood Academic Publishers).

Marsh K, Orto L, Hayes RJ, Carson DC & Greenwood BM. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:293-303.

Martin SK, Miller LH & Alling D. Severe malaria and glucose-6-phosphate deficiency: A reappraisal of the malaria/G6PD hypothesis. *Lancet* 1979; i:524-526.

May J. Assoziation von MHC-DPA1-Allelen mit den Manifestationsformen der *Onchocerca volvulus*-Infektion bei Westafrikanern aus einem Hyperendemiegebiet. 1995. Freie Universität Berlin, Berlin.

May J, Falusi AG, Ademowo OG, Olumese PE, Großterlinden L, Mockenhaupt FP, Meyer CG, Luzzatto L & Bienzle U. Red cell glucose-6-phosphat dehydrogenase status and pyruvat kinase activity in a Nigerian population. *Trop Med Int Health* 2000b; 5:119-123.

May J, Falusi AG, Mockenhaupt F, Ademowo PO, Olumese P, Bienzle U & Meyer CG. Impact of subpatent multi-species and multi-clonal plasmodial infections on anaemia in children from Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000a; 94:399-403.

May J, Kreamsner PG, Milovanovic D, Schnittger L, Loliger CC, Bienzle U & Meyer CG. HLA-DP control of human *Schistosoma haematobium* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1998b; 59:302-306.

May J, Kretschmer C, Schnittger L, Striecker R, Kreamsner PG & Meyer CG. DPA1*0105, a novel DPA1 variant in a negroid population. *Tissue Antigens* 1996; 48:593-594.

May J, Lell B, Luty A, Meyer CG & Kreamsner PG. Plasma Interleukin 10:Tumor necrosis factor (TNF) ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis* 2000c; 182:1570-1573.

May J, Lell B, Luty AJF, Meyer CG & Kreamsner PG. HLA-DQB1*0501-restricted Th1-type immune responses to a *Plasmodium falciparum* liver stage antigen protect from anaemia in malarial infection. *J Infect Dis* 2001; .

May J, Meyer CG, Kun JF, Lell B, Luckner D, Dippmann AK, Bienzle U & Kreamsner PG. HLA class II factors associated with *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen allele families. *J Infect Dis* 1999b; 179:1042-1045.

May J, Mockenhaupt FP, Ademowo OG, Falusi AG, Olumese PE, Bienzle U & Meyer CG. High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 1999a; 61:339-343.

May J, Mockenhaupt FP, Loliger CC, Ademowo GO, Falusi AG, Jenisch S, Dippmann K, Schnittger L, Kreamsner PG, Bienzle U & Meyer CG. HLA DPA1/DPB1 genotype and haplotype frequencies, and linkage disequilibria in Nigeria, Liberia, and Gabon. *Tissue Antigens* 1998a; 52:199-207.

McGregor IA & Wilson RJM. Specific immunity: acquired in man. in: Wernsdorfer WH & McGregor IA, eds. *Malaria, principles and practices of malariology* 1988 (New York, N. Y.: Churchill Livingstone Inc.) 559-619.

McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM & Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371:508-510.

- McGuire W, Knight JC, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM & Kwiatkowski D.** Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis* 1999; 179:287-290.
- Mellouk S, Green SJ, Nacy CA & Hoffman SL.** IFN-gamma inhibits development of *Plasmodium berghei* exoerythrocytic stages in hepatocytes by an L-arginine-dependent effector mechanism. *J Immunol* 1991; 146:3971-3976.
- Mellouk S, Mazier D, Druilhe P, Berbiguier N & Danis M.** *In vitro* and *in vivo* results suggesting that anti-sporozoite antibodies do not totally block *Plasmodium falciparum* sporozoite infectivity. *N Engl J Med* 1986; 315:648.
- Merry AH, Looareesuwan S, Phillips RE, Chanthavanich P, Supanaranond W, Warrell DA & Weatherall DJ.** Evidence against immune haemolysis in falciparum malaria in Thailand. *Br J Haematol* 1986; 64:187-194.
- Metzger WG, Mordmüller BG & Kremsner PG.** Malaria pigment in leucocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89:637-638.
- Meyer CG, Gallin M, Erttmann KD, Brattig N, Schnittger L, Gelhaus A, Tannich E, Begovich AB, Erlich HA & Horstmann RD.** HLA-D alleles associated with generalized disease, localized disease, and putative immunity in *Onchocerca volvulus* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:7515-7519.
- Meyer CG, May J & Schnittger L.** HLA-DP--part of the concert. *Immunol Today* 1997; 18:58-61.
- Meyer CG, May J, Spauke D & Schnittger L.** DPA1*02012: a DPA1*0201-related Mhc class II allele in west Africa. *Immunogenetics* 1994; 40:309.
- Meyer CG, May J & Stark K.** Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. *Trends Microbiol* 1998; 6:148-154.
- Meyer CG, Schnittger L & May J.** Met-11 of HLA class II DP alpha 1 first domain associated with onchocerciasis. *Exp Clin Immunogenet* 1996; 13:12-19.
- Meyer CG, Spauke D, May J & Schnittger L.** Human MHC class II DPB1*02011 and related alleles in West Africa. *Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol* 1994; 16:43-50.
- Michal G.** . in: Bergheimer U, ed. *Methods of Enzymatic Analysis* 1983; 197-232.
- Miller J, Golenser J, Spira DT & Kosower NS.** *Plasmodium falciparum*: thiol status and growth in normal and glucose-6- phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes. *Exp Parasitol* 1984; 57:239-247.
- Miller LH, Good MF & Kaslow DC.** Vaccines against the blood stages of falciparum malaria. *Adv Exp Med Biol* 1998; 452:193-205.
- Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH & Rothman IK.** Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 1975; 189:561-563.
- Miller RL, Ikram S, Armelagos GJ, Walker R, Harer WB, Shif CJ, Baggett D, Carrigan M & Maret SM.** Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight™-F test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88:31-32.
- Mockenhaupt F, May J, Stark K, Falusi AG, Meyer CG & Bienzle U.** Serum transferrin receptor levels in *Plasmodium falciparum*-infection. *Hematologica* 1999; 84:869-873.
- Mockenhaupt FP, Bienzle U, May J, Falusi AG, Ademowo OG, Olumese PE & Meyer CG.** *Plasmodium falciparum* infection: influence on hemoglobin levels in alpha-thalassemia and microcytosis. *J Infect Dis* 1999; 180:925-928.

Mockenhaupt FP, Falusi AG, May J, Ademowo OG, Olumese PE, Meyer CG & Bienzle U. The contribution of alpha⁺-thalassaemia to anaemia in a Nigerian population exposed to intense malaria transmission. *Trop Med Int Health* 1999; 4:302-307.

Mockenhaupt FP, May J, Bergqvist Y, Ademowo OG, Olumese PE, Falusi AG, Großerlinden L, Meyer CG & Bienzle U. Concentrations of chloroquine and malaria parasites in Blood in Nigerian children. *Antimicrobial Agents Chemother* 2000; 44:835-839.

Mockenhaupt FP, May J, Bergqvist Y, Meyer CG, Falusi AG & Bienzle U. Evidence for a reduced effect of chloroquine against *Plasmodium falciparum* in α^+ -thalassaemic children. *Trop Med Int Health* im Druck; .

Modiano D, Petrarca V, Sirima BS, Nebie I, Diallo D, Esposito F & Coluzzi M. Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in west African sympatric ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:13206-13211.

Mohamed NH, Hamadto HH, el-Fakahany AF, Farrag AM & el-Hamshary AM. Study of human and parasitic factors in relation to bancroftian filariasis in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 1992; 22:719-727.

Mohamed NH, Rifaat MA, Abdel Baki MH, el Okbi LM & Farrag AM. Study of the relation between tissue typing and occurrence of filariasis and its complications in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 1987; 17:751-758.

Mohan K & Stevenson MM. Acquired immunity to asexual blood stages. in: Sherman IW, ed. *Malaria - parasite biology, pathogenesis, and protection* 1998 (Washington: ASM Press) 467-493.

Molineaux L, Storey J, Cohen JE & Thomas A. A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different *Plasmodium* species, in particular *P. falciparum* and *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29.

Mordmüller BG, Metzger WG, Juillard P, Brinkman BM, Verweij CL, Grau GE & Kremsner PG. Tumor necrosis factor in *Plasmodium falciparum* malaria: high plasma level is associated with fever, but high production capacity is associated with rapid fever clearance. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8:29-35.

Moreno A, Clavijo P, Edelman R, Davis J, Szein M, Herrington D & Nardin E. Cytotoxic CD4⁺ T cells from a sporozoite-immunized volunteer recognize the *Plasmodium falciparum* CS protein. *Int Immunol* 1991; 3:997-1003.

Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C, Monaco JJ & Mellins E. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 1994; 368:551-554.

Mshana RN, McLean S & Boulandi J. In vitro cell-mediated immune responses to *Plasmodium falciparum* schizont antigens in adults from a malaria endemic area: CD8⁺ T lymphocytes inhibit the response of low responder individuals. *Int Immunol* 1990; 2:1121-1132.

Mulligan HW, Russel PF & Mohan BF. Active immunisation of fowls against *Plasmodium gallinaceum* by injection of killed homologous sporozoites. *J. Malar. Inst. India* 1941; 4:25-34.

Mullis KB & Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350.

Murdoch ME, Payton A, Abiose A, Thomson W, Panicker VK, Dyer PA, Jones BR, Maizels RM & Ollier WE. HLA-DQ alleles associate with cutaneous features of onchocerciasis. The Kaduna-London-Manchester Collaboration for Research on Onchocerciasis. *Hum Immunol* 1997; 55:46-52.

Nagel RL. Innate resistance to malaria: the intraerythrocytic cycle. *Blood Cells* 1990; 16:321-339.

Nardin EH & Zavala F. Acquired immunity to sporozoites. in: Sherman IW, ed. *Malaria - parasite biology, pathogenesis, and protection* 1998 (Washington: ASM Press) 457-466.

- Nash GB, Cooke BM, Marsh K, Berendt A, Newbold C & Stuart J.** Rheological analysis of the adhesive interactions of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Blood* 1992; 79:798-807.
- Nathan C.** Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100:2417-2423.
- Nevinny-Stickel C, Bettinotti MD, Andreas A, Hinzpeter M, Muhlegger K, Schmitz G & Albert ED.** Nonradioactive HLA class II typing using polymerase chain reaction and digoxigenin-11-2'-3'-dideoxy-uridinetriphosphate-labeled oligonucleotide probes. *Hum Immunol* 1991; 31:7-13.
- Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Craig A, Snow B, Msobo M, Peshu N & Marsh K.** Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57:389-398.
- Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, Ossari S, Luty A, Reltien J, Georges A & Millet P.** *Plasmodium falciparum*: sickle-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol* 1997; 87:39-46.
- Nudelman S, Renia L, Charoenvit Y, Yuan L, Miltgen F, Beaudoin RL & Mazier D.** Dual action of anti-sporozoite antibodies in vitro. *J Immunol* 1989; 143:996-1000.
- Nussler A, Drapier JC, Renia L, Pied S, Miltgen F, Gentilini M & Mazier D.** L-arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *Eur J Immunol* 1991; 21:227-230.
- Orago AS & Facer CA.** Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. *Clin Exp Immunol* 1991; 86:22-29.
- Orr HT, Lopez de Castro JA, Parham P, Ploegh HL & Strominger JL.** Comparison of amino acid sequences of two human histocompatibility antigens, HLA-A2 and HLA-B7: location of putative alloantigenic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4395-4399.
- Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koeh D, Orago AS & Udhayakumar V.** A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis* 1999; 179:279-282.
- Pasquetto V, Fidock DA, Gras H, Badell E, Eling W, Ballou WR, Belghiti J, Tartar A & Druilhe P.** *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion is inhibited by naturally acquired or experimentally induced polyclonal antibodies to the STARP antigen. *Eur J Immunol* 1997; 27:2502-2513.
- Pasvol G & Weatherall DJ.** The red cell and the malarial parasite. *Br J Haematol* 1980; 46:165-170.
- Pasvol G, Weatherall DJ & Wilson RJ.** Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1977; 270:171-173.
- Pasvol G, Weatherall DJ & Wilson RJ.** Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. *Nature* 1978; 274:701-703.
- Pattanapanyasat K, Yongvanitchit K, Tongtawe P, Tachavanich K, Wanachiwanawin W, Fucharoen S & Walsh DS.** Impairment of *Plasmodium falciparum* growth in thalassemic red blood cells: further evidence by using biotin labeling and flow cytometry. *Blood* 1999; 93:3116-3119.
- Payne D, Grab B, Fontaine RE & Hempel JH.** Impact of control measures on malaria transmission and general mortality. *Bull World Health Organ* 1976; 54:369-377.
- Petzl-Erler ML, Belich MP & Queiroz-Telles F.** Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Hum Immunol* 1991; 32:254-260.
- Phillips RE & Pasvol G.** Anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *Baillieres Clin Haematol* 1992; 5:315-330.
- Playfair JH.** Immunity to malaria. *Br Med Bull* 1982; 38:153-159.

Plebanski M, Aidoo M, Whittle HC & Hill AV. Precursor frequency analysis of cytotoxic T lymphocytes to pre-erythrocytic antigens of *Plasmodium falciparum* in West Africa. *J Immunol* 1997b; 158:2849-2855.

Plebanski M, Flanagan KL, Lee EAM, Reece WHH, Hart K, Gelder C, Gillespie G, Pinder M & Hill AVS. Interleukin 10-mediated immunosuppression by a variant CD4 T cell epitope of *Plasmodium falciparum*. *Immunity* 1999; 10:651-660.

Plebanski M & Hill AV. The immunology of malaria infection. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:437-441.

Plebanski M, Lee EA & Hill AV. Immune evasion in malaria: altered peptide ligands of the circumsporozoite protein. *Parasitology* 1997a; 115:S55-66.

Porter IH, Boyer SH, Watson-Williams EJ, Adam A, Szeinberg A & Siniscalco M. Variation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in different populations. *Lancet* 1964; i:895.

Rénia L, Grillot D, Marussig M, Corradin G, Miltgen F, Lambert PH, Mazier D & Del Giudice G. Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4⁺ T cell clones against *Plasmodium yoelii* liver stages. *J Immunol* 1993; 150:1471-1478.

Rénia L, Mattei D, Goma J, Pied S, Dubois P, Miltgen F, Nussler A, Matile H, Menegaux F, Gentilini M & et al. A malaria heat-shock-like determinant expressed on the infected hepatocyte surface is the target of antibody-dependent cell-mediated cytotoxic mechanisms by nonparenchymal liver cells. *Eur J Immunol* 1990; 20:1445-1449.

Richie TL. Interactions between malaria parasites infecting the same vertebrate host. *Parasitology* 1988; 96:607-639.

Rihet P, Traore Y, Abel L, Aucan C, Traore-Leroux T & Fumoux F. Malaria in humans: *Plasmodium falciparum* blood infection levels are linked to chromosome 5q31-q33. *Am J Hum Genet* 1998; 63:498-505.

Riley EM, Jakobsen PH, Allen SJ, Wheeler JG, Bennett S, Jepsen S & Greenwood BM. Immune response to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* may contribute to both pathogenesis and protection in clinical malaria: evidence from a longitudinal, prospective study of semi-immune African children. *Eur J Immunol* 1991; 21:1019-1025.

Riley EM, Olerup O, Bennett S, Rowe P, Allen SJ, Blackman MJ, Troye-Blomberg M, Holder AA & Greenwood BM. MHC and malaria: the relationship between HLA class II alleles and immune responses to *Plasmodium falciparum*. *Int Immunol* 1992; 4:1055-1063.

Robert F, Ntoumi F, Angel G, Candito D, Rogier C, Fandeur T, Sarthou JL & Mercereau-Puijalon O. Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:704-711.

Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB & Clark IA. In vivo induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infect Immun* 1992; 60:3725-3730.

Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB & Clark IA. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun* 1991; 59:3280-3283.

Romia SA, el-Ganayni GA, Makhlof LM & Handousa AE. HLA antigens and blood groups in bancroftian filariasis. *J Egypt Soc Parasitol* 1988; 18:211-220.

Rønningen KS, Undlien DE, Ploski R, Maouni N, Konrad RJ, Jensen E, Hornes E, Reijonen H, Colonna M, Monos DS & et al. Linkage disequilibrium between TAP2 variants and HLA class II alleles; no primary association between TAP2 variants and insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993; 23:1050-1056.

- Roodman GD, Bird A, Hutzler D & Montgomery W.** Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60, and HEL cells. *Exp Hematol* 1987; 15:928-935.
- Ross R.** Memoires - with a full account of the great malaria problem and its solution 1923; *Memoires - with a full account of the great malaria problem and its solution*. London, United Kingdom: Murray.
- Roth EJ, Raventos SC, Rinaldi A & Nagel RL.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:298-299.
- Rowland PG, Nash GB, Cooke BM & Stuart J.** Comparative study of the adhesion of sickle cells and malarial- parasitized red cells to cultured endothelium. *J Lab Clin Med* 1993; 121:706-713.
- Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N & et al.** Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 1995; 376:246-249.
- Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T & Druilhe P.** Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45:297-308.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA.** Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324:163-166.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH & Erlich HA.** Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:6230-6234.
- Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T.** Molecular cloning. A laboratory manual 1989; *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM & Smith M.** Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977; 265:687-695.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74:5463-5467.
- Satoh M, Toma H, Sato Y, Kikuchi M, Takara M, Shiroma Y, Kiyuna S & Hirayama K.** Production of a high level of specific IgG4 antibody associated with resistance to albendazole treatment in HLA-DRB1*0901-positive patients with strongyloidiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:668-671.
- Saul A.** The role of variant surface antigens on malaria-infected red blood cells. *Parasitol Today* 1999; 15:455-457.
- Scherf A, Mattei D & Sarthou JL.** Multiple infections and unusual distribution of block 2 of the MSA1 gene of *Plasmodium falciparum* detected in west African clinical isolates by polymerase chain reaction analysis. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 44:297-299.
- Schmidt-Ott R, Luckner D, Lehman LG, Lell B, Matousek P, Greve B & Kreamsner PG.** Pyrimethamine/sulfadoxine for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in young children in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:578-579.
- Schmitz GG, Walter T, Seibl R & Kessler C.** Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem* 1991; 192:222-231.
- Schnittger L, May J, Kretschmer C, Kreamsner PG & Meyer CG.** DPB1*BR: an Mhc class II DPB1 allele (DPB1*6601) of negroid origin. *Immunogenetics* 1996; 44:405-406.

- Schnittger L, May J, Loeliger CC, Gallin MY, Erttmann KD, Bienzle U, Kreamsner PG & Meyer CG.** HLA DRB1-DQA1-DQB1 haplotype diversity in two African populations. *Tissue Antigens* 1997; 50:546-551.
- Schofield L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ & Tachado SD.** Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol* 1996; 156:1886-1896.
- Scholander C, Carlson J, Kreamsner PG & Wahlgren M.** Extensive immunoglobulin binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in a group of children with moderate anemia. *Infect Immun* 1998; 66:361-363.
- Secor WE, del Corral H, dos Reis MG, Ramos EA, Zimon AE, Matos EP, Reis EA, do Carmo TM, Hirayama K, David RA, David JR & Harn DA, Jr.** Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1*0201. *J Infect Dis* 1996; 174:1131-1135.
- Servenius B, Gustafsson K, Widmark E, Emmoth E, Andersson G, Larhammar D, Rask L & Peterson PA.** Molecular map of the human HLA-SB (HLA-DP) region and sequence of an SB alpha (DP alpha) pseudogene. *Embo J* 1984; 3:3209-3214.
- Shaffer N, Grau GE, Hedberg K, Davachi F, Lyamba B, Hightower AW, Breman JG & Phuc ND.** Tumor necrosis factor and severe malaria. *J Infect Dis* 1991; 163:96-101.
- Sheagren JN, Tobie JE, Fox LM & Wolff SM.** Reticuloendothelial system phagocytic function in naturally acquired human malaria. *J Lab Clin Med* 1970; 75:481-487.
- Sherman IW.** A brief history of malaria and discovery of the parasite's life cycle. in: Sherman IW, ed. *Malaria - parasite biology, pathogenesis, and protection* 1998 (Washington: ASM Press) 3-10.
- Sherman IW & Winograd E.** Antigens on the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte surface are not parasite derived. *Parasitol Today* 1990; 6:317-320.
- Singh N, Sundar S, Williams F, Curran MD, Rastogi A, Agrawal S & Middleton D.** Molecular typing of HLA class I and class II antigens in Indian kala-azar patients. *Trop Med Int Health* 1997; 2:468-471.
- Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, Saul AJ, Kemp DJ & Anders RF.** Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 39:227-234.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaitong S & Brown KN.** High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61:315-320.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaitong S & Brown KN.** Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58:283-292.
- Snow RW, Craig M, Deichmann U & Marsh K.** Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ* 1999; 77:624-640.
- Stirnadel HA, Beck HP, Alpers MP & Smith TA.** Heritability and segregation analysis of immune responses to specific malaria antigens in Papua New Guinea. *Genet Epidemiol* 1999; 17:16-34.
- Tanabe K, Mackay M, Goman M & Scaife JG.** Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Mol Biol* 1987; 195:273-287.
- Tanaka K, Tanahashi N, Tsurumi C, Yokota KY & Shimbara N.** Proteasomes and antigen processing. *Adv Immunol* 1997; 64:1-38.
- Taylor JG, Ferdig MT, Su XZ & Wellems TE.** Toward quantitative genetic analysis of host and parasite traits in the manifestations of Plasmodium falciparum malaria. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10:314-319.

- Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S & Liew FY.** The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science* 1993; 260:1931-1934.
- Travers P, Blundell TL, Sternberg MJ & Bodmer WF.** Structural and evolutionary analysis of HLA-D-region products. *Nature* 1984; 310:235-238.
- Trigg PI & Kondrachine AV.** The current global malaria situation. in: Sherman IW, ed. *Malaria - parasite biology, pathogenesis, and protection* 1998 (Washington: ASM Press) 11-24.
- Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A & Kelly A.** Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 1990; 348:741-744.
- Troye-Blomberg M.** Human T-cell responses to blood stage antigens in Plasmodium falciparum malaria. *Immunol Lett* 1994; 41:103-107.
- Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B & et al.** An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* 1994; 145:1057-1069.
- Turrini F, Schwarzer E & Arese P.** The involvement of hemozoin toxicity in depression of cellular immunity. *Parasitol Today* 1993; 9:297-300.
- Udhayakumar V, Ongecha JM, Shi YP, Aidoo M, Orago AS, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, Hoffman SL, Weiss WR & Lal AA.** Cytotoxic T cell reactivity and HLA-B35 binding of the variant Plasmodium falciparum circumsporozoite protein CD8+ CTL epitope in naturally exposed Kenyan adults. *Eur J Immunol* 1997; 27:1952-1957.
- Udomsangpetch R, Todd J, Carlson J & Greenwood BM.** The effects of hemoglobin genotype and ABO blood group on the formation of rosettes by Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48:149-153.
- Udomsangpetch R, Wahlin B, Carlson J, Berzins K, Torii M, Aikawa M, Perlmann P & Wahlgren M.** Plasmodium falciparum-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. *J Exp Med* 1989; 169:1835-1840.
- Uebel S & Tampe R.** Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:203-208.
- Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM & Roberts DJ.** Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* 1999; 400:73-77.
- Usanga EA & Luzzatto L.** Adaptation of Plasmodium falciparum to glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient host red cells by production of parasite-encoded enzyme. *Nature* 1985; 313:793-795.
- Valdez E, del Carmen Martinez M, Gomez A, Cedillo R, Arellano J, Perez ME, Ramos F, Moran P, Gonzalez E, Valenzuela O, Melendro EI, Ramiro M, Kretschmer R, Munoz O & Ximenez C.** HLA characterization in adult asymptomatic cyst passers of Entamoeba histolytica/E. dispar. *Parasitol Res* 1999; 85:833-836.
- Vinitsky A, Anton LC, Snyder HL, Orlowski M, Bennink JR & Yewdell JW.** The generation of MHC class I-associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors: involvement of nonproteasomal cytosolic proteases in antigen processing? *J Immunol* 1997; 159:554-564.
- Wahlgren M, Treutiger CJ & Gysin J.** Cytoadherence and rosetting in the pathogenesis of severe malaria. in: Wahlgren M & Perlmann P, eds. *Malaria - molecular and clinical aspects* 1999 (Amsterdam: Harwood Academic Publishers).

- Waine GJ, Ross AG, Williams GM, Sleight AC & McManus DP.** HLA class II antigens are associated with resistance or susceptibility to hepatosplenic disease in a Chinese population infected with *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol* 1998; 28:537-542.
- Walliker D, Babiker H & Ranford-Cartwright L.** The genetic structure of malaria parasite populations. in: Sherman IW, ed. *Malaria - parasite biology, pathogenesis, and protection* 1998 (Washington: ASM Press) 235-252.
- Warrell DA, White NJ & Warrell MJ.** Dexamethasone deleterious in cerebral malaria. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 285:1652.
- Wattavidanage J, Carter R, Perera KL, Munasingha A, Bandara S, McGuinness D, Wickramasinghe AR, Alles HK, Mendis KN & Premawansa S.** TNF α *2 marks high risk of severe disease during *Plasmodium falciparum* malaria and other infections in Sri Lankans. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:350-355.
- Weatherall DJ.** Thalassaemia and malaria, revisited. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91:885-890.
- Weatherall DJ, Abdalla S & Pippard MJ.** The anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *Ciba Found Symp* 1983; 94:74-97.
- Weiss L.** The spleen in malaria: the role of barrier cells. *Immunol Lett* 1990; 25:165-172.
- White N.** Malaria. in: Cook GC, ed. *Manson's Tropical Disease* 1996 (London: WB Saunders Company Ltd) 1087-1164.
- White NJ.** Malaria pathophysiology. in: Sherman IW, ed. *Malaria - parasite biology, pathogenesis, and protection* 1998 (Washington: ASM Press) 371-386.
- WHO.** Standardization of procedures for the study of Glucose-6-phosphate dehydrogase. *WHO Technical Report Series* 1967; 366.
- WHO.** Fighting Disease. in: . *WHO report 1996* 1996 (Geneva: Fostering Development).
- WHO.** World malaria situation in 1994. I. Population at risk. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72:269-274.
- WHO.** Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94, supplement 1:1-90.
- Wickramasinghe SN, Abdalla S & Weatherall DJ.** Cell cycle distribution of erythroblasts in *P. falciparum* malaria. *Scand J Haematol* 1982; 29:83-88.
- Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, Brandts C, Jenne L & Wernsdorfer WH.** Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogooué, Gabon. *Trop Med Parasitol* 1995; 46:77-82.
- Williams TN, Maitland K, Bennett S, Ganczakowski M, Peto TE, Newbold CI, Bowden DK, Weatherall DJ & Clegg JB.** High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children. *Nature* 1996; 383:522-525.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO & Duff GW.** Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3195-3199.
- Wood WI, Gitschier J, Lasky LA & Lawn RM.** Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:1585-1588.
- Woodruff AW, Ansdell VE & Pettitt LE.** Cause of anaemia in malaria. *Lancet* 1979; 1:1055-1057.
- Wozencraft AO, Dockrell HM, Taverne J, Targett GA & Playfair JH.** Killing of human malaria parasites by macrophage secretory products. *Infect Immun* 1984; 43:664-669.

Yamazaki K, Boyse EA, Mike V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbott J, Boyse J, Zayas ZA & Thomas L. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 1976; 144:1324-1335.

Yazdanbakhsh M, Sartono E, Kruize YC, Kurniawan A, Partono F, Maizels RM, Schreuder GM, Schipper R & de Vries RR. HLA and elephantiasis in lymphatic filariasis. *Hum Immunol* 1995; 44:58-61.

Yorke W & McFie JWS. Observations on malaria made during treatment of general paralysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1924; 18:13-33.

Zevering Y, Khamboonruang C & Good MF. Natural amino acid polymorphisms of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* abrogate specific human CD4+ T cell responsiveness. *Eur J Immunol* 1994; 24:1418-1425.

Zinkernagel RM & Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974; 248:701-702.

Zinkernagel RM & Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 1979; 27:51-177.

6. Anhang

6.1. Abkürzungen

ABC	ATP-Bindungs-Kassette (engl. <i>ATP-binding cassette</i>)
ABS	Antigenbindungsregion (engl. <i>antigen binding side</i>)
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
APC	Antigen-präsentierende Zellen (engl. <i>antigen presenting cells</i>)
ASO	Allelspezifische Oligonukleotide
CSA	Circumsporozoiten-Oberflächen-Antigen (engl. <i>circumsporozoite surface antigen</i>)
CTL	zytotoxische T-Zellen (engl. <i>cytotoxic T cells</i>)
EMSA	Gelshift-Assay (engl. <i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HLA	Humane Leukozytenantigene
HMS	hyperreaktive Malaria-Splenomegalie
IFN- α	Alpha-Interferon
IFN- γ	Gamma-Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
Kap.	Kapitel
LMP	engl. <i>low molecular mass proteasome</i>
LSA-1	Leberstadien-spezifisches Antigen (engl. <i>liver stage-specific antigen 1</i>)
MECL-1	<i>multicatalytic endopeptidase complex-like</i>

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MLR	Gemischte Lymphozytenkultur (engl. <i>mixed lymphocyte reaction</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
<i>O. volvulus</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
OR	engl. <i>odds ratio</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PfEMP-1	engl. <i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
PECAM-1	engl. <i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
SALSA	engl. <i>sporozoite and liver stage antigen</i>
SSOP	Sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde (engl. <i>sequence-specific oligonucleotide probe</i>)
STARP	engl. <i>sporozoite threonine and asparagine-rich protein</i>
TAP	engl. <i>transporter associated with antigen presentation</i>
TNF	Tumornekrosisfaktor
TCR	T-Zellrezeptor (engl. <i>T cell receptor</i>)
VCAM-1	engl. <i>vascular cellular adhesion molecule-1</i>

6.2. Programm-Code zur Auswertung der Typisierungssignale ("BLOT")

Der Programmcode für BLOT ist in Visual Basic (Microsoft) als Makro für Excel Office 98 (Microsoft) auf einem MacIntosh geschrieben.

```
'----- BlotAnalyse v5.0 30.07.00 -----
Type GenotypBeschreibung
  AnzKombi As Single
  BinSumme As Double
  Kombi(25) As String
End Type

Type ProbenBeschreibung
  BinSumme As Double
  Name As String
End Type

Dim Genotyp(2000) As GenotypBeschreibung
Dim Probe(500) As ProbenBeschreibung
Dim Allel(100) As ProbenBeschreibung
Dim Sonde(40) As Single
Dim Result(1000, 500) As Single
Dim FehlerProbes(1000, 500) As Single
Dim FehlerProbesImp(1000, 500) As Single

Dim AnzGenotypen As Single
Dim AnzProben As Single
Dim AnzSonden As Single
Dim AnzAllele As Single
Dim MaxAnzKombi As Single

'-----
Sub Hauptroutine()
  Call Löschen
  Call ProbenLesen
  Call AlleleLesen
  Call SondenLesen
  Call GenotypenBerechnen
  Call Berechnen
  Call ResultsSchreiben2
End Sub

Sub Löschen()
  For u_Go = 1 To 2000
    Genotyp(u_Go).AnzKombi = 1
  Next u_Go
End Sub

Sub ProbenLesen()
  Dim u_Go As Single
  Sheets("Bits").Activate
  AnzSonden = SpaltenAnzahl(1) - 1
  AnzProben = ZeilenAnzahl(1) - 1
  For u_Go = 2 To AnzProben + 2
    BinärSum = 0
    For GoS = 2 To AnzSonden + 2
      Bit = Cells(u_Go, GoS)
      BinärSum = BinärSum + Bit * 2 ^ (GoS - 2)
    Next GoS
    Probe(u_Go - 1).BinSumme = BinärSum
    Probe(u_Go - 1).Name = Cells(u_Go, 1)
  Next u_Go
End Sub
```

```

Sub AlleleLesen()
Dim u_Go As Single
Sheets("Key").Activate
AnzAllele = ZeilenAnzahl(1) - 1
For u_Go = 2 To AnzAllele + 2
    BinärSum = 0
    For GoS = 2 To AnzSonden + 1
        Bit = Cells(u_Go, GoS)
        BinärSum = BinärSum + Bit * 2 ^ (GoS - 2)
    Next GoS
    Allel(u_Go - 1).BinSumme = BinärSum
    Allel(u_Go - 1).Name = Cells(u_Go - 1, 1)
Next u_Go
End Sub

Sub SondenLesen()
Dim Column As Single
For Column = 2 To AnzSonden + 2
    Sonde(Column - 1) = Cells(1, Column)
Next Column
End Sub

Sub GenotypenBerechnen()
Dim u_Go As Single: Dim GoO As Single: Dim GoI As Single
'BlattListe("key").Aktivieren
u_Go = 0
For GoO = 1 To AnzAllele
    For GoI = GoO To AnzAllele
        u_Go = u_Go + 1
        Genotyp(u_Go).BinSumme = Allel(GoO).BinSumme Or Allel(GoI).BinSumme
        x = Genotyp(u_Go).AnzKombi
        Genotyp(u_Go).Kombi(x) = Allel(GoO + 1).Name + "/" + Allel(GoI + 1).Name
        GoX = 1
        Do While GoX < u_Go
            If Genotyp(u_Go).BinSumme = Genotyp(GoX).BinSumme Then
                Genotyp(GoX).AnzKombi = Genotyp(GoX).AnzKombi + 1
                If Genotyp(GoX).AnzKombi > MaxAnzKombi Then MaxAnzKombi = _
                    Genotyp(GoX).AnzKombi
                x = Genotyp(GoX).AnzKombi
                Genotyp(GoX).Kombi(x) = Allel(GoO + 1).Name + "/" + _
                    Allel(GoI + 1).Name
                u_Go = u_Go - 1
            End If
            GoX = GoX + 1
        Loop
    Next GoI
    'ZelleListe(1; 1) = GoO
Next GoO
AnzGenotypen = u_Go
End Sub

Sub GenotypSchreiben()
Dim GoZ As Single: Dim u_Go As Single
Sheets("results").Activate
Call InhaltLöschen
For GoZ = 1 To AnzGenotypen
    Cells(GoZ + 1, 1) = GoZ
    Cells(GoZ + 1, 2) = Genotyp(GoZ).BinSumme
    For u_Go = 1 To Genotyp(GoZ).AnzKombi
        Cells(GoZ + 1, u_Go + 2) = Genotyp(GoZ).Kombi(u_Go)
    Next u_Go
Next GoZ
End Sub

Sub Berechnen()
Dim GoO As Single: Dim GoI As Single
For GoO = 1 To AnzGenotypen
    For GoI = 1 To AnzProben
        Result(GoO, GoI) = QuerSumme(Abs((Genotyp(GoO).BinSumme Eqv _
            Probe(GoI).BinSumme) + 1))
        FehlerProbes(GoO, GoI) = Abs((Genotyp(GoO).BinSumme Eqv _

```

```

        Probe(GoI).BinSumme) + 1)
        FehlerProbesImp(GoO, GoI) = Abs((Genotyp(GoO).BinSumme Imp _
        Probe(GoI).BinSumme) + 1)
    Next GoI
Next GoO
End Sub

Sub ResultsSchreiben()
Dim GoO As Single: Dim GoI As Single
Sheets("results").Activate
For GoO = 1 To AnzGenotypen
    For GoI = 1 To AnzProben
        Cells(GoO + 1, GoI + MaxAnzKombi + 2) = Result(GoO, GoI)
    Next GoI
Next GoO
ActiveSheet.Range(Columns("A"), Columns("AA")).AutoFit
End Sub

Sub ResultsSchreiben2()
Dim Row As Single: Dim Nr As Single: Dim Zähler As Single: Dim ZählerB As Single
Sheets("results2").Activate
Call InhaltLöschen
ActiveSheet.Rows(1).Orientation = xlUpward
Zähler = 1
For Column = MaxAnzKombi + 4 To AnzSonden + MaxAnzKombi + 3
    Cells(1, Column) = Sonde(Zähler)
    Zähler = Zähler + 1
Next Column
Row = 2
For Nr = 1 To AnzProben
    With Application.Range(Cells(Row, 1), Cells(Row, 30)).Borders(xlTop)
        .Weight = xlThin
        .Color = RGB(0, 0, 0)
    End With
    Cells(Row, 1) = Probe(Nr).Name
    Cells(Row, 2) = Probe(Nr).BinSumme
    Match = AnzSonden
    Row = Row + 1
    For Zähler = 1 To AnzGenotypen
        If Result(Zähler, Nr) < Match Then Match = Result(Zähler, Nr)
    Next Zähler
    For Zähler = 1 To AnzGenotypen
        If Result(Zähler, Nr) = Match Then
            Cells(Row, 2) = Result(Zähler, Nr)
            For ZählerB = 1 To Genotyp(Zähler).AnzKombi
                Cells(Row, ZählerB + 2) = Genotyp(Zähler).Kombi(ZählerB)
            Next ZählerB
            'ZelleListe(Zeile; 10) = FehlerProbes(Zähler; Nr)
            Call FehlerProbenSchreiben(FehlerProbes(Zähler, Nr), _
                FehlerProbesImp(Zähler, Nr), Row)
            Row = Row + 1
        End If
    Next Zähler
Next Nr
ActiveSheet.Range(Columns("A"), Columns("BB")).AutoFit
End Sub

Sub FehlerProbenSchreiben(x, y, Row)
Dim Column As Single
For Column = MaxAnzKombi + 4 To AnzSonden + MaxAnzKombi + 3
    While x > 0
        If x / 2 <> Fix(x / 2) Then
            'ZelleListe(Zeile; Spalte) = "X"
            If y / 2 <> Fix(x / 2) Then _
                Cells(Row, Column) = "-" Else Cells(Row, Column) = "+"
        End If
        x = Fix(x / 2)
        y = Fix(y / 2)
        Column = Column + 1
    Wend
Next Column
End Sub

```

```

Sub BinärSchreiben()
  Sheets("results3").Activate
  Call InhaltLöschen
  GoX = 3
  For GoZ = 1 To AnzGenotypen
    For u_Go = 1 To Genotyp(GoZ).AnzKombi
      Cells(GoX, 1) = Genotyp(GoZ).Kombi(u_Go)
      Column = 2
      x = Genotyp(GoZ).BinSumme
      While x > 0
        If x / 2 <> Fix(x / 2) Then Cells(GoX, Column) = 1 _
          Else Cells(GoX, Column) = 0
        x = Fix(x / 2)
        Column = Column + 1
      Wend
      GoX = GoX + 1
    Next u_Go
  Next GoZ
End Sub

Sub BinärSchreiben2()
  Sheets("results4").Activate
  Call InhaltLöschen
  GoX = 3
  For GoZ = 1 To AnzGenotypen
    For u_Go = 1 To Genotyp(GoZ).AnzKombi
      Cells(GoX, 1) = Genotyp(GoZ).Kombi(u_Go)
      Cells(u_Go, 2) = FehlerProbes(u_Go, GoZ)
      Column = 2
      x = Genotyp(GoZ).BinSumme
      While x > 0
        If x / 2 <> Fix(x / 2) Then Cells(GoX, Column) = 1 _
          Else Cells(GoX, Column) = 0
        x = Fix(x / 2)
        Column = Column + 1
      Wend
      GoX = GoX + 1
    Next u_Go
  Next GoZ
End Sub

Sub InhaltLöschen()
  'Löscht Inhalt des aktuellen Tabelleblatts
  Cells.Select
  Selection.ClearContents
  Selection.ClearFormats
  Range("A1").Select
End Sub

Function QuerSumme(x)
  BitCounter = 0
  While x > 0
    If x / 2 <> Fix(x / 2) Then BitCounter = BitCounter + 1
    x = Fix(x / 2)
  Wend
  QuerSumme = BitCounter
End Function

Function ZeilenAnzahl(SpaltenNr) As Integer
  'Zählt die Zeilen der Spalte (SpaltenNr), die einen Eintrag haben
  Dim u_Go As Integer
  u_Go = 1
  Do While Cells(u_Go, SpaltenNr).Value <> ""
    u_Go = u_Go + 1
  Loop
  ZeilenAnzahl = u_Go - 1
End Function

Function SpaltenAnzahl(ZeilenNr) As Integer
  'Zählt die Spalten der Zeile (ZeilenNr), die einen Eintrag haben
  Dim u_Go As Integer

```

```

u_Go = 1
Do While Cells(ZeilenNr, u_Go).Value <> ""
    u_Go = u_Go + 1
Loop
SpaltenAnzahl = u_Go - 1
End Function

'-----

Function BinärSumme(AnzSonden, ProbenNr)
    Dim u_Go As Single
    x = 0
    faktor = 1
    For u_Go = 1 To AnzSonden
        'ZelleInhalt = Bits(ProbenNr + 1; Go + 1)
        ZelleInhalt = Cells(ProbenNr + 1, u_Go + 1)
        x = x + ZelleInhalt * 2 ^ (u_Go - 1)
        faktor = faktor * 2
    Next u_Go
    BinärSumme = x
End Function

Function test1(x As Double, y As Double)
    test1 = x Eqv y
End Function

```

6.3. Programm-Code zur Berechnung von Allelfrequenzen polymorpher Genloci ("FAST")

Der Programmcode für FAST ist in Visual Basic (Microsoft) als Makro für Excel Office 98 (Microsoft) auf einem Macintosh geschrieben.

```

'-----FAST v5.1beta * 5.5.00-----
'VARIABLENDEFINITIONEN

Type ProbeBeschreibung
    KategorienName As String
    NameP(800) As String
    Zeiger(800) As Integer
    Category(800) As String
    LocusName(10) As String
    Allel(800, 10) As String
End Type

Type EpitopeBeschreibung
    LocusName As String
    AnzEpitope As Integer
    AnzAllele As Integer
    AnzFaktoren As Integer
    EpitopName(20) As String
    FaktorenName(150) As String
    Epitop(100, 20) As Integer
End Type

Type AnalyseBeschreibung
    AnzTotal As Single
    GF(2, 140) As Single
    PF(2, 140) As Single
    HF(120, 120) As Single
End Type
'Anz der Proben einer bestimmten Kategorie

```

```

Dim Probe As ProbeBeschreibung
Dim Epitop(2) As EpitopeBeschreibung
Dim Count(5, 2) As AnalyseBeschreibung
Dim Frequenz(2) As AnalyseBeschreibung
Dim Delta(4, 2) As AnalyseBeschreibung
Dim Statistik(3, 2) As AnalyseBeschreibung

Dim AllelZeiger(6, 2) As Integer
Dim EpitopZeiger(6, 2) As Integer
Dim AnzProben As Integer
Dim AnzPosProben As Integer
Dim AnzSuchLoci As Integer

Dim AnzLoci As Integer
Dim AnzKategorien As Integer

Dim SuchLocusSpalte(6) As Integer
Dim KategorienSpalte As Integer
Dim VergleichsAuswahl As Integer
Dim AnalyseAuswahl As Integer
Dim KategorieAuswahl(2) As String
Dim AnalyseArt As Integer

Dim KatName(100) As String
Dim ProName(10) As String
Dim Deltaformel As Integer
Dim CheckFlag As Boolean
Dim KategorienScan As Boolean
Dim YatesFlag As Boolean
Dim Bonferroni As Integer
Dim DeltaFlag As Integer

'-----
'HAUPTROUTINE

Sub HauptProgramm()
'Hauptroutine zur Suche von Assoziationen, die mit Wahl+Befehl+r aufgerufen wird
  Dim zähler As Integer
  Application.OnKey "{ESC}", "Schaltfläche3_BeiKlick"
  KategorienScan = False
  Call BasisDatenAnalyse
START: Call ErgebnisseLöschen
  Call ParameterEingabe
  Call DatenKopieren
  For zähler = 1 To AnalyseAuswahl
    Call ZählRoutine(zähler)
  Next zähler
  Call DatenAnalyse
  Call DatenAusgabe
  Beep
  GoTo START
End Sub

Sub ErgebnisseLöschen()
  Dim zählerZ As Integer: Dim zählerS As Integer
  For zählerZ = 1 To 140
    For zählerS = 1 To 2
      Count(1, 1).AnzTotal = 0: Count(1, 2).AnzTotal = 0
      Count(1, 1).GF(zählerS, zählerZ) = 0: Count(1, 2).GF(zählerS, zählerZ) = 0
      Count(1, 1).PF(zählerS, zählerZ) = 0: Count(1, 2).PF(zählerS, zählerZ) = 0
    Next zählerS
  Next zählerZ
  For zählerZ = 1 To 120
    For zählerS = 1 To 120
      Count(1, 1).HF(zählerS, zählerZ) = 0: Count(1, 2).HF(zählerS, zählerZ) = 0
    Next zählerS
  Next zählerZ
End Sub

```

```

'-----
'ZÄHL-ROUTINEN

Sub ZählRoutine(KategorieNr)
Dim zählerZ As Integer: Dim zähler As Integer: Dim NeunNeunNeunFlag As Boolean
For zählerZ = 1 To AnzPosProben
    NeunNeunNeunFlag = False
    If Probe.Category(zählerZ) = KategorieAuswahl(KategorieNr) Then
        For zähler = 1 To AnzSuchLoci
            AllelZeiger(zähler, 1) = AnalysiereAllelNr(Probe.Allel(zähler, _
                SuchLocusSpalte(zähler) - 1), zähler)
            AllelZeiger(zähler, 2) = AnalysiereAllelNr(Probe.Allel(zählerZ, _
                SuchLocusSpalte(zähler)), zähler)
            If AllelZeiger(zähler, 1) = 999 Or AllelZeiger(zähler, 2) = 999 Then
                Count(1, KategorieNr).AnzTotal = Count(1, KategorieNr).AnzTotal - 1
                NeunNeunNeunFlag = True
                Exit For
            End If
            For zählerX = 1 To Epitop(zähler).AnzEpitope + 1
                Allel1 = Epitop(zähler).Epitop(AllelZeiger(zähler, 1), zählerX)
                Allel2 = Epitop(zähler).Epitop(AllelZeiger(zähler, 2), zählerX)
                If Allel2 = Allel1 Then Allel2 = 0
                Call ZählFrequenzen(zähler, Allel1, Allel2, KategorieNr)
            Next zählerX
        Next zähler
        zähler = zähler - 1
        If NeunNeunNeunFlag = False Then
            For zählerX = 1 To Epitop(zähler).AnzEpitope + 1
                AllelA1 = Epitop(1).Epitop(AllelZeiger(1, 1), zählerX)
                AllelA2 = Epitop(1).Epitop(AllelZeiger(1, 2), zählerX)
                If AllelA2 = AllelA1 Then AllelA2 = 0
                For zählerY = 1 To Epitop(zähler).AnzEpitope + 1
                    AllelB1 = Epitop(2).Epitop(AllelZeiger(2, 1), zählerY)
                    AllelB2 = Epitop(2).Epitop(AllelZeiger(2, 2), zählerY)
                    If AllelB2 = AllelB1 Then AllelB2 = 0
                    Call ZählHaplotypen(AllelA1, AllelA2, AllelB1, AllelB2, KategorieNr)
                    If AllelA2 = 0 Or AllelB2 = 0 Then Call
                        ZählSichereHaplotypen(AllelA1, AllelA2, AllelB1, AllelB2, _
                            KategorieNr)
                Next zählerY
            Next zählerX
        End If
    End If
Next zählerZ
End Sub

Sub ZählFrequenzen(zähler, Allel1, Allel2, KategorieNr)
    Count(1, KategorieNr).GF(zähler, Allel1) = _
        Count(1, KategorieNr).GF(zähler, Allel1) + 1
    Count(1, KategorieNr).PF(zähler, Allel1) = _
        Count(1, KategorieNr).PF(zähler, Allel1) + 1
    If Allel2 = 0 Then
        Count(1, KategorieNr).GF(zähler, Allel1) = _
            Count(1, KategorieNr).GF(zähler, Allel1) + 1
    Else: Count(1, KategorieNr).GF(zähler, Allel2) = _
        Count(1, KategorieNr).GF(zähler, Allel2) + 1
        Count(1, KategorieNr).PF(zähler, Allel2) = _
            Count(1, KategorieNr).PF(zähler, Allel2) + 1
    End If
End Sub

Sub ZählHaplotypen(AllelA1, AllelA2, AllelB1, AllelB2, KategorieNr)
    Count(1, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB1) = _
        Count(1, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB1) + 1
    If AllelA2 <> 0 Then Count(1, KategorieNr).HF(AllelA2, AllelB1) = _
        Count(1, KategorieNr).HF(AllelA2, AllelB1) + 1
    If AllelB2 <> 0 Then Count(1, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB2) = _
        Count(1, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB2) + 1
    If AllelA2 <> 0 And AllelB2 <> 0
        Then Count(1, KategorieNr).HF(AllelA2, AllelB2) = _
            Count(1, KategorieNr).HF(AllelA2, AllelB2) + 1
    End Sub

```

```

Sub ZählSichereHaplotypen(AllelA1, AllelA2, AllelB1, AllelB2, KategorieNr)
'counting proven haplotypes (Anzahl(5)) according homozygosity
  If AllelA2 = 0 And AllelB2 = 0 Then Count(5, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB1) = _
    Count(5, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB1) + 2
  If AllelA2 = 0 And AllelB2 <> 0 Then
    Count(5, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB1) = _
      Count(5, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB1) + 1
    Count(5, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB2) = _
      Count(5, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB2) + 1
  End If
  If AllelB2 = 0 And AllelA2 <> 0 Then
    Count(5, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB1) = _
      Count(5, KategorieNr).HF(AllelA1, AllelB1) + 1
    Count(5, KategorieNr).HF(AllelA2, AllelB1) = _
      Count(5, KategorieNr).HF(AllelA2, AllelB1) + 1
  End If
End Sub

'-----
'ANALYSE-ROUTINEN

Sub DatenAnalyse()
  Call FrequenzAnalyse(1)
  Select Case AnalyseArt
    Case 2
      Call VerteilungsAnalyse(AnalyseAuswahl)
      Call HaplotypenAnalyse(AnalyseAuswahl)
    Case 3
      Call FrequenzAnalyse(2)
      Call HeterogenitätsAnalyse(KategorieAuswahl(1), KategorieAuswahl(2))
    Case 4
      Call FrequenzAnalyse(2)
      Call HeterogenitätsAnalyseHaplo(KategorieAuswahl(1), KategorieAuswahl(2))
  End Select
End Sub

Sub FrequenzAnalyse(KategorieNr)
Dim zähler As Integer: Dim zählerA As Integer
For zähler = 1 To AnzSuchLoci
  For zählerA = 1 To Epitop(zähler).AnzFaktoren
    Frequenz(KategorieNr).PF(zähler, zählerA) = _
      Count(1, KategorieNr).PF(zähler, zählerA) / _
      Count(1, KategorieNr).AnzTotal
    Frequenz(KategorieNr).GF(zähler, zählerA) = _
      Count(1, KategorieNr).GF(zähler, zählerA) / _
      (2 * Count(1, KategorieNr).AnzTotal)
  Next zählerA
Next zähler
For zähler = 1 To Epitop(1).AnzFaktoren
  For zählerA = 1 To Epitop(2).AnzFaktoren
    Frequenz(KategorieNr).HF(zähler, zählerA) = _
      Count(1, KategorieNr).HF(zähler, zählerA) / _
      Count(1, KategorieNr).AnzTotal
  Next zählerA
Next zähler
End Sub

Sub VerteilungsAnalyse(KategorieNr)
Dim zählerX As Integer: Dim zählerY As Integer
For zählerX = 1 To Epitop(1).AnzFaktoren
  For zählerY = 1 To Epitop(2).AnzFaktoren
    Count(2, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY) = _
      Count(1, KategorieNr).PF(1, zählerX) - _
      Count(1, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY)
    Count(3, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY) = _
      Count(1, KategorieNr).PF(2, zählerY) - _
      Count(1, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY)
    Count(4, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY) = _
      Count(1, KategorieNr).AnzTotal - _
      Count(1, KategorieNr).PF(2, zählerY) - _
      Count(2, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY)
  Next zählerY
Next zählerX

```

```

Next zählerY
Next zählerX
End Sub

Sub HaplotypenAnalyse(KategorieNr)
Dim zählerX As Integer: Dim zählerY As Integer
For zählerX = 1 To Epitop(1).AnzFaktoren
  For zählerY = 1 To Epitop(2).AnzFaktoren
    a = Count(1, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY)
    u_b = Count(2, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY)
    c = Count(3, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY)
    d = Count(4, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY)
    Delta(1, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY) = Chi(a, u_b, c, d)
    Delta(2, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY) =  $\frac{p(\text{Delta}(1, \text{KategorieNr}).\text{HF}(\text{zählerX}, \text{zählerY}))}{\text{Delta}(3, \text{KategorieNr}).\text{HF}(\text{zählerX}, \text{zählerY})}$ 
    Delta(3, KategorieNr).HF(zählerX, zählerY) = DeltaWert(a, u_b, c, d)
  Next zählerY
Next zählerX
End Sub

Sub HeterogenitätsAnalyse(KategorieNr1, KategorieNr2)
Dim zähler As Integer
For zähler = 1 To Epitop(VergleichsAuswahl).AnzFaktoren
  a = Count(1, KategorieNr1).PF(VergleichsAuswahl, zähler)
  u_b = Count(1, KategorieNr2).PF(VergleichsAuswahl, zähler)
  c = Count(1, KategorieNr1).AnzTotal - a
  d = Count(1, KategorieNr2).AnzTotal - u_b
  Delta(1, 1).PF(VergleichsAuswahl, zähler) = Chi(a, u_b, c, d)
  Delta(2, 1).PF(VergleichsAuswahl, zähler) =  $\frac{p(\text{Delta}(1, 1).\text{PF}(\text{VergleichsAuswahl}, \text{zähler}))}{\text{Delta}(3, 1).\text{PF}(\text{VergleichsAuswahl}, \text{zähler})}$ 
  Delta(3, 1).PF(VergleichsAuswahl, zähler) = OddsRatio(a, u_b, c, d)
Next zähler
For zähler = 1 To Epitop(VergleichsAuswahl).AnzFaktoren
  a = Count(1, KategorieNr1).GF(VergleichsAuswahl, zähler)
  u_b = Count(1, KategorieNr2).GF(VergleichsAuswahl, zähler)
  c = Count(1, KategorieNr1).AnzTotal * 2 - Count(1, 1).GF(VergleichsAuswahl, zähler)
  d = Count(1, KategorieNr2).AnzTotal * 2 - Count(1, 2).GF(VergleichsAuswahl, zähler)
  Delta(1, 1).GF(VergleichsAuswahl, zähler) = Chi(a, u_b, c, d)
  Delta(2, 1).GF(VergleichsAuswahl, zähler) = p(Delta(1, 1).GF(VergleichsAuswahl, zähler))
Next zähler
End Sub

Sub HeterogenitätsAnalyseHaplo(KategorieNr1, KategorieNr2)
Dim zählerX As Integer: Dim zählerY As Integer
For zählerX = 1 To Epitop(1).AnzFaktoren
  For zählerY = 1 To Epitop(2).AnzFaktoren
    a = Count(1, KategorieNr1).HF(zählerX, zählerY)
    u_b = Count(1, KategorieNr2).HF(zählerX, zählerY)
    c = Count(1, KategorieNr1).AnzTotal -  $\frac{\text{Count}(1, \text{KategorieNr1}).\text{HF}(\text{zählerX}, \text{zählerY})}{\text{Count}(1, \text{KategorieNr2}).\text{HF}(\text{zählerX}, \text{zählerY})}$ 
    d = Count(1, KategorieNr2).AnzTotal -  $\frac{\text{Count}(1, \text{KategorieNr2}).\text{HF}(\text{zählerX}, \text{zählerY})}{\text{Count}(1, \text{KategorieNr1}).\text{HF}(\text{zählerX}, \text{zählerY})}$ 
    Statistik(1, 1).HF(zählerX, zählerY) = Chi(a, u_b, c, d)
    Statistik(2, 1).HF(zählerX, zählerY) = p(Statistik(1, 1).HF(zählerX, zählerY))
    Statistik(3, 1).HF(zählerX, zählerY) = OddsRatio(a, u_b, c, d)
  Next zählerY
Next zählerX
End Sub

'-----
' INPUT-ROUTINEN

Sub ParameterEingabe()
'Lädt die EingabeParameter für die weiteren Analysen
Windows("FAST-Analyse").Activate
If KategorienScan = True And AnzKategorien + 1 > Cells(1, 2) Then  $\frac{\text{Cells}(1, 2)}{\text{Cells}(1, 2) + 1}$  Else Application.DialogSheets("Dialog1").Show
SuchLocusSpalte(1) = 2 * Cells(1, 1) - 2
SuchLocusSpalte(2) = 2 * Cells(2, 1) - 2
KategorienSpalte = Cells(1, 2)
KategorieAuswahl(1) = Cells(1, 5) - 1

```

```

KategorieAuswahl(2) = Cells(2, 5) - 1
VergleichsAuswahl = Cells(1, 3)
AnzSuchLoci = VergleichsAuswahl
AnalyseAuswahl = Cells(1, 4)
AnalyseArt = VergleichsAuswahl + (AnalyseAuswahl - 1) * 2
DeltaFlag = Cells(1, 6)
Bonferroni = Cells(1, 7)
KategorienScan = Cells(1, 11)
If Bonferroni = 0 Then Bonferroni = 1
YatesFlag = Cells(1, 8)
CheckFlag = Cells(1, 9)
End Sub

Sub BasisDatenAnalyse()
Dim zählerZ As Integer: Dim zählerS As Integer
Workbooks.Open FileName:="Datenblatt"
Sheets("Daten").Select
AnzLoci = SpaltenAnzahl(1) - 1
For zählerS = 2 To AnzLoci + 1 Step 2
    ProName(zählerS / 2) = Left(Cells(1, zählerS), 4)
Next zählerS
Sheets("Kategorien").Select
AnzKategorien = SpaltenAnzahl(1) - 1
For zählerS = 2 To AnzKategorien + 1
    KatName(zählerS - 1) = Cells(1, zählerS)
Next zählerS
Windows("FAST-Analyse").Activate
Sheets("Eingabe").Select
Call InhaltEingabeLöschen
For zählerZ = 4 To AnzLoci + 4
    Cells(zählerZ, 1) = ProName(zählerZ - 4)
Next zählerZ
For zählerZ = 4 To AnzKategorien + 4
    Cells(zählerZ, 2) = KatName(zählerZ - 4)
Next zählerZ
End Sub

Sub DatenKopieren()
'Lädt die Daten aus Datei "Datenblatt" im selben Ordner
Windows("Datenblatt").Activate
Dim LocusBlatt As String
Call KategorienKopieren
Call ProbenKopieren
Workbooks.Open FileName:="FASTKey"
For zähler = 1 To AnzSuchLoci
    LocusBlatt = Left(Probe.LocusName(SuchLocusSpalte(zähler) - 1), 4)
    Call EpitopeKopieren(LocusBlatt, zähler)
Next zähler
End Sub

Sub KategorienKopieren()
'Lädt Probanddaten zu Kategorien aus Tabellenblatt "Kategorien" der aktuellen Datei
Dim zählerZ As Integer
Sheets("Kategorien").Select
Probe.KategorienName = Cells(1, KategorienSpalte)
AnzProben = ZeilenAnzahl(1) - 1
AnzPosProben = 0
For zählerZ = 2 To AnzProben + 1
    If Cells(zählerZ, KategorienSpalte) = KategorieAuswahl(1) Or _
        Cells(zählerZ, KategorienSpalte) = KategorieAuswahl(2) Then
        AnzPosProben = AnzPosProben + 1
        Probe.NameP(AnzPosProben) = Cells(zählerZ, 1)
        Probe.Zeiger(AnzPosProben) = zählerZ
        Probe.Category(AnzPosProben) = Cells(zählerZ, KategorienSpalte)
        If Cells(zählerZ, KategorienSpalte) = KategorieAuswahl(1) Then _
            Count(1, 1).AnzTotal = Count(1, 1).AnzTotal + 1
        If Cells(zählerZ, KategorienSpalte) = KategorieAuswahl(2) Then _
            Count(1, 2).AnzTotal = Count(1, 2).AnzTotal + 1
        End If
    Next zählerZ
AnzProben = zählerZ - 2
End Sub

```

```

Sub ProbenKopieren()
'Lädt Probendaten aus Tabellenblatt "Daten" der aktuellen Datei
  Dim zählerZ As Integer: Dim zählerS As Integer
  Sheets("Daten").Select
  AnzLoci = SpaltenAnzahl(1) - 1
  For zählerS = 2 To AnzLoci + 1
    Probe.LocusName(zählerS - 1) = Cells(1, zählerS)
  Next zählerS
  For zählerZ = 1 To AnzPosProben
    For zählerS = 1 To AnzSuchLoci
      Probe.Allel(zählerZ, SuchLocusSpalte(zählerS) - 1) = _
        Cells(Probe.Zeiger(zählerZ), SuchLocusSpalte(zählerS))
      Probe.Allel(zählerZ, SuchLocusSpalte(zählerS)) = _
        Cells(Probe.Zeiger(zählerZ), SuchLocusSpalte(zählerS) + 1)
    Next zählerS
  Next zählerZ
End Sub

Sub EpitopeKopieren(LocusBlatt, Nr)
  Dim zählerZ As Integer: Dim zählerS As Integer: Dim zählerX As Integer: _
    Dim zähler As Integer
  Sheets(LocusBlatt).Select
  With Epitop(Nr)
    .LocusName = Cells(1, 1)
    .AnzEpitope = SpaltenAnzahl(1) - 1
    .AnzAllele = ZeilenAnzahl(1) - 1
    For zählerS = 2 To .AnzEpitope + 1
      .EpitopName(zählerS) = Cells(1, zählerS)
    Next zählerS
    For zählerZ = 1 To .AnzAllele + 1
      .FaktorenName(zählerZ) = Cells(zählerZ + 1, 1)
      .Epitop(zählerZ, 1) = zählerZ
    Next zählerZ
    zählerX = zählerZ - 1
    For zählerS = 2 To .AnzEpitope + 1
      For zählerZ = 2 To .AnzAllele + 1
        If Cells(zählerZ, zählerS) = "" Then _
          Exit For Else .FaktorenName(zählerX) = _
            .EpitopName(zählerS) + "-" + Cells(zählerZ, zählerS)
        zähler = .AnzAllele + 1
        Do While .FaktorenName(zählerX) <> .FaktorenName(zähler)
          zähler = zähler + 1
        Loop
        If zähler = zählerX Then zählerX = zählerX + 1
        .Epitop(zählerZ - 1, zählerS) = zähler
      Next zählerZ
    Next zählerS
    .AnzFaktoren = zählerX - 1
  End With
End Sub

'-----
'OUTPUT-ROUTINEN

Sub DatenAusgabe()
Workbooks.Add
Do While ActiveWorkbook.Sheets.Count < 10
  Sheets.Add
Loop
Select Case AnalyseArt
  Case 1
    Auswahl1 = AnalyseAuswahl
    Auswahl2 = VergleichsAuswahl
    Call Tabelle2Ausgabe(1, "Frequenzen", Auswahl2, Auswahl1, Frequenz(Auswahl1), 1)
    Call Tabelle2Ausgabe(2, "Zählung", Auswahl2, Auswahl1, Count(1, Auswahl2), 2)
    FileName = Epitop(1).LocusName + " " + Probe.KategorienName
  Case 2
    Auswahl1 = AnalyseAuswahl
    Call Tabelle1Ausgabe(1, "Frequenzen", Auswahl1, Frequenz(Auswahl1), 0, 1)
    Call Tabelle1Ausgabe(2, "++", Auswahl1, Count(1, Auswahl1), 0, 2)
    Call Tabelle1Ausgabe(3, "+-", Auswahl1, Count(2, Auswahl1), 0, 2)

```

```

Call Tabelle1Ausgabe(4, "--", Auswahl1, Count(3, Auswahl1), 0, 2)
Call Tabelle1Ausgabe(5, "--", Auswahl1, Count(4, Auswahl1), 0, 2)
Call Tabelle1Ausgabe(6, "PH", Auswahl1, Count(5, Auswahl1), 0, 2)
Call Tabelle1Ausgabe(7, "Chi", Auswahl1, Delta(1, Auswahl1), 3.84, 3)
Call Tabelle1Ausgabe(8, "p", Auswahl1, Delta(2, Auswahl1), 0, 4)
Call Tabelle1Ausgabe(9, "Delta", Auswahl1, Delta(3, Auswahl1), -1, 1)
FileName = Epitop(1).LocusName + "-" + Epitop(2).LocusName + " pop"
Case 3
Auswahl1 = VergleichsAuswahl
Call Tabelle3Ausgabe(1, "PF", Auswahl1)
FileName = Epitop(Auswahl1).LocusName + " " + Probe.KategorienName
Case 4
Auswahl1 = 1
Auswahl2 = 2
Call Tabelle1Ausgabe(1, "Frequenzen (1)", Auswahl1, Frequenz(Auswahl1), 0, 1)
Call Tabelle1Ausgabe(2, "++ (1)", Auswahl1, Count(1, Auswahl1), 0, 2)
Call Tabelle1Ausgabe(3, "Frequenzen2", Auswahl2, Frequenz(Auswahl2), 0, 1)
Call Tabelle1Ausgabe(4, "++ (2)", Auswahl2, Count(1, Auswahl2), 0, 2)
Call Tabelle1Ausgabe(5, "Chi", Auswahl2, Statistik(1, 1), 3.84, 3)
Call Tabelle1Ausgabe(6, "p", Auswahl2, Statistik(2, 1), 0, 4)
Call Tabelle1Ausgabe(6, "OR", Auswahl2, Statistik(3, 1), 0, 3)
FileName = Epitop(1).LocusName + "-" + Epitop(2).LocusName + " " + _
    Probe.KategorienName
Case Else
    Error 65534
End Select
ActiveWorkbook.SaveAs FileName:=FileName
ActiveWorkbook.Close
End Sub

Sub Tabelle1Ausgabe(BlattName, BlattNameNeu, Selection, ObjektName As _
    AnalyseBeschreibung, UntereGrenze As Single, FormatCode As Integer)
'Vergleich 2 Faktoren auf 2 Loci
Sheets(BlattName).Select
Sheets(BlattName).Name = BlattNameNeu
Call Tabelle1Formatieren(FormatCode)
Cells(3, 3) = Count(1, Selection).AnzTotal
Cells(3, 1) = "PF"
Cells(3, 2) = "GF"
Cells(1, 3) = "PF"
Cells(2, 3) = "GF"
Cells(2, 1) = Epitop(1).LocusName
Cells(1, 2) = Epitop(2).LocusName
Cells(2, 2) = KategorieAuswahl(Selection)
Cells(1, 1) = Probe.KategorienName
For zählerS = 1 To Epitop(2).AnzFaktoren
    Cells(1, zählerS + 3) = ObjektName.PF(2, zählerS)
    Cells(2, zählerS + 3) = ObjektName.GF(2, zählerS)
    Cells(3, zählerS + 3) = Epitop(2).FaktorenName(zählerS)
Next zählerS
For zählerZ = 1 To Epitop(1).AnzFaktoren
    Cells(zählerZ + 3, 1) = ObjektName.PF(1, zählerZ)
    Cells(zählerZ + 3, 2) = ObjektName.GF(1, zählerZ)
    Cells(zählerZ + 3, 3) = Epitop(1).FaktorenName(zählerZ)
    For zählerS = 1 To Epitop(2).AnzFaktoren
        If ObjektName.HF(zählerZ, zählerS) > UntereGrenze And _
            ObjektName.HF(zählerZ, zählerS) <> 0 Then _
            Cells(zählerZ + 3, zählerS + 3) = ObjektName.HF(zählerZ, zählerS)
    Next zählerS
Next zählerZ
ActiveSheet.Range(Columns("A"), Columns("GZ")).AutoFit
End Sub

Sub Tabelle2Ausgabe(BlattName, BlattNameNeu, LocusNr, KategorieNr, ObjektName As _
    AnalyseBeschreibung, FormatCode As Integer)
Sheets(BlattName).Select
Sheets(BlattName).Name = BlattNameNeu
Call Tabelle2Formatieren(FormatCode)
Cells(1, 1) = KategorieAuswahl(KategorieNr)
Cells(1, 3) = Count(1, KategorieNr).AnzTotal
Cells(3, 1) = Epitop(1).LocusName
Cells(3, 2) = "PF"

```

```

Cells(3, 3) = "GF"
For zählerZ = 1 To Epitop(LocusNr).AnzFaktoren
    Cells(zählerZ + 3, 1) = Epitop(LocusNr).FaktorenName(zählerZ)
    Cells(zählerZ + 3, 2) = ObjektName.PF(LocusNr, zählerZ)
    Cells(zählerZ + 3, 3) = ObjektName.GF(LocusNr, zählerZ)
Next zählerZ
ActiveSheet.Range(Columns("A"), Columns("CC")).AutoFit
End Sub

```

```

Sub Tabelle3Ausgabe(BlattName, BlattNameNeu, LocusNr)
'Vergleich 2 Faktoren auf 1 Locus
    Sheets(BlattName).Select
    Sheets(BlattName).Name = BlattNameNeu
    Call Tabelle3Formatieren
    Cells(1, 1) = Probe.KategorienName
    Cells(2, 2) = Count(1, 1).AnzTotal
    Cells(2, 3) = Count(1, 2).AnzTotal
    Cells(2, 4) = "PF"
    Cells(2, 6) = "chi"
    Cells(2, 7) = "p"
    Cells(2, 8) = "OR"
    Cells(3, 1) = Epitop(LocusNr).LocusName
    Cells(3, 2) = KategorieAuswahl(1)
    Cells(3, 3) = KategorieAuswahl(2)
    Cells(3, 4) = KategorieAuswahl(1)
    Cells(3, 5) = KategorieAuswahl(2)
    For zählerZ = 1 To Epitop(LocusNr).AnzFaktoren
        Cells(zählerZ + 3, 1) = Epitop(LocusNr).FaktorenName(zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 2) = Count(1, 1).PF(LocusNr, zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 3) = Count(1, 2).PF(LocusNr, zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 4) = Frequenz(1).PF(LocusNr, zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 5) = Frequenz(2).PF(LocusNr, zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 6) = Delta(1, 1).PF(LocusNr, zählerZ)
        DeltaText = Format(Delta(2, 1).PF(LocusNr, zählerZ))
        If DeltaText = "0" Then DeltaText = "n.s."
        Cells(zählerZ + 3, 7) = DeltaText
        If DeltaText <> "n.s." Then
            ORText = Delta(3, 1).PF(LocusNr, zählerZ)
            If ORText = 0 Then ORText = "n.c."
            Cells(zählerZ + 3, 8) = ORText
        End If
    Next zählerZ
    ActiveSheet.Range(Columns("A"), Columns("Z")).AutoFit

    Sheets(2).Select
    Sheets(2).Name = "GF"
    Call Tabelle3Formatieren
    Cells(1, 1) = Probe.KategorienName
    Cells(2, 2) = Count(1, 1).AnzTotal
    Cells(2, 3) = Count(1, 2).AnzTotal
    Cells(2, 4) = "GF"
    Cells(2, 6) = "chi"
    Cells(2, 7) = "p"
    Cells(3, 1) = Epitop(LocusNr).LocusName
    Cells(3, 2) = KategorieAuswahl(1)
    Cells(3, 3) = KategorieAuswahl(2)
    Cells(3, 4) = KategorieAuswahl(1)
    Cells(3, 5) = KategorieAuswahl(2)
    Cells(3, 6) = KategorieAuswahl(1)
    Cells(3, 7) = KategorieAuswahl(2)
    For zählerZ = 1 To Epitop(LocusNr).AnzFaktoren
        Cells(zählerZ + 3, 1) = Epitop(LocusNr).FaktorenName(zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 2) = Count(1, 1).GF(LocusNr, zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 3) = Count(1, 2).GF(LocusNr, zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 4) = Frequenz(1).GF(LocusNr, zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 5) = Frequenz(2).GF(LocusNr, zählerZ)
        Cells(zählerZ + 3, 6) = Delta(1, 1).GF(LocusNr, zählerZ)
        DeltaText = Format(Delta(2, 1).GF(LocusNr, zählerZ))
        If DeltaText = "0" Then DeltaText = "n.s."
        Cells(zählerZ + 3, 7) = DeltaText
    Next zählerZ

```

```

ActiveSheet.Range(Columns("A"), Columns("Z")).AutoFit
End Sub

```

```

'-----
'TABELLENFORMAT-ROUTINEN

```

```

Sub Tabelle1Formatieren(FormatCode As Integer)
ActiveSheet.Cells(1, 1).Font.Color = RGB(255, 0, 0)
ActiveSheet.Cells(2, 2).Font.Color = RGB(255, 0, 0)
ActiveSheet.Cells(1, 2).Font.Color = RGB(0, 0, 255)
ActiveSheet.Cells(2, 1).Font.Color = RGB(0, 0, 255)
Select Case FormatCode
Case 1
    ActiveSheet.Range(Cells(1, 4), Cells(2, 150)).NumberFormat = "##0.000"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 1), Cells(150, 2)).NumberFormat = "##0.000"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 4), Cells(150, 150)).NumberFormat = "##0.000"
Case 2
    ActiveSheet.Range(Cells(1, 4), Cells(2, 150)).NumberFormat = "##0"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 1), Cells(150, 2)).NumberFormat = "##0"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 4), Cells(150, 150)).NumberFormat = "##0"
Case 3
    ActiveSheet.Range(Cells(1, 4), Cells(2, 150)).NumberFormat = "##0"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 1), Cells(150, 2)).NumberFormat = "##0"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 4), Cells(150, 150)).NumberFormat = "##0.0"
Case 4
    ActiveSheet.Range(Cells(1, 4), Cells(2, 150)).NumberFormat = "##0"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 1), Cells(150, 2)).NumberFormat = "##0"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 4), Cells(150, 150)).NumberFormat = "0E+00"
End Select
With Application.Range(Cells(3, 1), Cells(3, Epitop(2).AnzFaktoren + _
3)).Borders(xlBottom)
.Weight = xlMedium
.Color = RGB(0, 0, 0)
End With
With Application.Range(Cells(3, 4), Cells(3, Epitop(2).AnzFaktoren + _
3)).Borders(xlTop)
.Weight = xlThin
.Color = RGB(0, 0, 0)
End With
With Application.Range(Cells(1, 3), Cells(Epitop(1).AnzFaktoren + _
3, 3)).Borders(xlRight)
.Weight = xlMedium
.Color = RGB(0, 0, 0)
End With
With Application.Range(Cells(4, 3), Cells(Epitop(1).AnzFaktoren + _
3, 3)).Borders(xlLeft)
.Weight = xlThin
.Color = RGB(0, 0, 0)
End With
End Sub

```

```

Sub Tabelle2Formatieren(FormatCode As Integer)
ActiveSheet.Cells(1, 1).Font.Color = RGB(255, 0, 0)
ActiveSheet.Range(Cells(1, 1), Cells(1, 6)).NumberFormat = "##0"
Select Case FormatCode
Case 1
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 2), Cells(150, 6)).NumberFormat = "##0,000"
Case 2
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 2), Cells(150, 6)).NumberFormat = "##0"
End Select
With Application.Range(Cells(2, 1), Cells(2, 3)).Borders(xlBottom)
.Weight = xlMedium
.Color = RGB(0, 0, 0)
End With
With Application.Range(Cells(3, 1), Cells(3, 3)).Borders(xlBottom)
.Weight = xlThin
.Color = RGB(0, 0, 0)
End With
With Application.Range(Cells(3, 1), Cells(Epitop(VergleichsAuswahl).AnzFaktoren + _
4, 1)).Borders(xlRight)
.Weight = xlThin
.Color = RGB(0, 0, 0)

```

```

    End With
End Sub

Sub Tabelle3Formatieren()
'8te Spalte
    ActiveSheet.Cells(1, 1).Font.Color = RGB(255, 0, 0)
    ActiveSheet.Cells(1, 2).Font.Color = RGB(255, 0, 0)
    ActiveSheet.Range(Cells(1, 1), Cells(1, 6)).NumberFormat = "##0"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 4), Cells(200, 6)).NumberFormat = "##0.000"
    ActiveSheet.Range(Cells(4, 8), Cells(200, 8)).NumberFormat = "##0.00"
    With Application.Range(Cells(2, 1), Cells(2, 8)).Borders(xlBottom)
        .Weight = xlMedium
        .Color = RGB(0, 0, 0)
    End With
    With Application.Range(Cells(3, 1), Cells(3, 8)).Borders(xlBottom)
        .Weight = xlThin
        .Color = RGB(0, 0, 0)
    End With
    With Application.Range(Cells(3, 1), Cells(Epitop(VergleichsAuswahl).AnzFaktoren + _
        3, 1)).Borders(xlRight)
        .Weight = xlThin
        .Color = RGB(0, 0, 0)
    End With
End Sub

Sub Farbe(Zeile, Spalte, Wert)
    FarbWert = Int(Wert * 10)
    If FarbWert > 255 Then FarbWert = 255
    ActiveSheet.Cells(Zeile, Spalte).Interior.Color = RGB(FarbWert, FarbWert, FarbWert)
End Sub

'-----
'HILFS-ROUTINEN

Sub InhaltLöschen()
'Löscht Inhalt des aktuellen Tabelleblatts
    Cells.Select
    Selection.ClearContents
    Range("A1").Select
End Sub

Sub InhaltEingabeLöschen()
'Löscht Inhalt des Tabelleblatts "Eingabe"
    ActiveSheet.Range(Cells(5, 1), Cells(50, 2)).ClearContents
    Range("A1").Select
End Sub

'-----
'FUNKTIONEN

Function AnalysiereAllelNr(Allel As String, Nr As Integer) As Integer
'Analysiert die laufende Nr des Allels eines Locus; gibt Nr, 0 ("-"), 999 (" " oder "?")
'oder Fehler 65535 (anderes Zeichen, auch " ") zurück
    Dim zählerZ As Integer
    Select Case Allel
        Case "-"
            AnalysiereAllelNr = 0
            Exit Function
        Case " ", "?"
            AnalysiereAllelNr = 999
            Exit Function
        Case "#"
            AnalysiereAllelNr = 998
            Exit Function
    End Select
    zählerZ = 1
    Do While zählerZ <= Epitop(Nr).AnzAllele
        If Allel = Epitop(Nr).FaktorenName(zählerZ) Then
            AnalysiereAllelNr = zählerZ
            Exit Function
        End If
        zählerZ = zählerZ + 1
    End Do
End Function

```

```

Loop
Error 65535
End Function

```

```

Function Chi(a, u_b, c, d) As Single
'Berechnet Chi-Quadrat und gibt "Leer" als Ergebnis, wenn unerlaubte Division
'durch 0 erfolgte
n = a + u_b + c + d
If (a + u_b) * (a + c) * (u_b + d) * (c + d) <> 0 Then
    Select Case YatesFlag
        Case True
            Chi = (n * (Abs(a * d - u_b * c) - (n / 2)) ^ 2) / _
                ((a + u_b) * (a + c) * (u_b + d) * (c + d))
        Case False
            Chi = (n * (Abs(a * d - u_b * c)) ^ 2) / _
                ((a + u_b) * (a + c) * (u_b + d) * (c + d))
    End Select
Else: Chi = Empty
End If
End Function

```

```

Function OddsRatio(a, u_b, c, d) As Single
'Berechnet OddsRatio und gibt "Leer" als Ergebnis, wenn unerlaubte Division
'durch 0 erfolgte
Haldane = False
If a <> 0 And u_b <> 0 And c <> 0 And d <> 0 Then
    Select Case Haldane
        Case True
            OddsRatio = 0
        Case False
            OddsRatio = (a * d) / (u_b * c)
    End Select
Else: OddsRatio = Empty
End If
End Function

```

```

Function DeltaWert(a, u_b, c, d) As Single
'Berechnet Deltawert und gibt "Leer" als Ergebnis, wenn unerlaubte Division
'durch 0 erfolgte
n = a + u_b + c + d
r = ((a + u_b) / n)
q = ((a + c) / n)
Select Case DeltaFlag
    Case 1

    Case 2
        If n <> 0 Then
            DeltaWert = Sqr(d / n) - Sqr((u_b + d) * (c + d) / (n ^ 2))
        Else: DeltaWert = Empty
        End If
    Case 3
        If n <> 0 Then
            Dstore = n - r * q
            If Dstore > 0 Then
                If r * (1 - q) < q * (1 - r) Then Dmax = r * (1 - q) Else _
                    Dmax = q * (1 - r)
                Else: If r * q < (1 - r) * (1 - q) Then Dmax = r * q Else _
                    Dmax = r * q < (1 - r) * (1 - q)
            End If
            DeltaWert = Dstore / Dmax
        Else: DeltaWert = Empty
        End If
    End Select
End Function

```

```

Function p(ChiWert) As Single
'Liefert die Signifikanz (p) des Chi-Wertes in 5 Kategorien
Select Case ChiWert
    Case Empty
        p = Empty
    Case Is > 15
        p = 0.0001

```

```

    Case Is < 3.841
        p = 0
    Case Is < 6.635
        p = 0.05
    Case Is < 7.879
        p = 0.01
    Case Is < 10.83
        p = 0.005
    Case Is < 12.12
        p = 0.001
    Case Is < 15.15
        p = 0.0005
    Case Is < 16.47
        p = 0.0001
    Case Is < 19.61
        p = 0.00005
    Case Is < 21.04
        p = 0.00001
    Case Is < 25.06
        p = 0.000005
End Select
p = p * Bonferroni
End Function

Function ZeilenAnzahl(SpaltenNr) As Integer
'Zählt die Zeilen der Spalte (SpaltenNr), die einen Eintrag haben
    Dim zähler As Integer
    zähler = 1
    Do While Cells(zähler, SpaltenNr).Value <> ""
        zähler = zähler + 1
    Loop
    ZeilenAnzahl = zähler - 1
End Function

Function SpaltenAnzahl(ZeilenNr) As Integer
'Zählt die Spalten der Zeile (ZeilenNr), die einen Eintrag haben
    Dim zähler As Integer
    zähler = 1
    Do While Cells(ZeilenNr, zähler).Value <> ""
        zähler = zähler + 1
    Loop
    SpaltenAnzahl = zähler - 1
End Function

```

6.4. Bibliographie der zitierten eigenen Veröffentlichungen

May J, Lell B, Luty AJF, Meyer CG, Kreamsner PG. HLA-DQB1*0501-restricted Th1-type immune responses to a *Plasmodium falciparum* liver stage antigen protect from anemia in malarial infection. *J Infect Dis* 2001;183:168-172.

May J, Lell B, Luty AJF, Meyer CG, Kreamsner PG. Plasma Interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)- α ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis* 2000;182:1570-1573.

May J, Mockenhaupt F, Ademowo PO, Falusi AG, Olumese P, Bienzle U, Meyer CG. Impact of subpatent multi-species and multi-clonal plasmodial infections on anaemia in children from Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:399-403.

May J, Meyer CG, Falusi AG, Ademowo OG, Olumese PE, Großterlinden L, Mockenhaupt FP, Luzzatto L, Bienzle U. Red cell glucose-6-phosphat dehydrogenase status and pyruvat kinase activity in a Nigerian population. *Trop Med Int Health* 2000; 5:119-123.

Mockenhaupt FP, May J, Bergqvist Y, Ademowo OG, Olumese PE, Falusi AG, Großterlinden L, Meyer CG, Bienzle U. Concentrations of chloroquine and malaria parasites in Blood in Nigerian children. *Antimicrob Agent Chemother* 2000; 44:835-839.

May J, Meyer CG, Kun JFJ, Lell B, Luckner D, Dippmann AK, Bienzle U, Kreamsner PG. HLA class II factors associated with *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen allele families. *J Inf Dis* 1999; 179:1042-1045.

May J, Mockenhaupt F, Ademowo OG, Falusi AG, Olumese PE, Bienzle U, Meyer CG. High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:339-343.

Lell B, May J, Schmidt-Ott R, Lehmann LG, Kuckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herbich K, Meyer CG, Bienzle U, Kreamsner PG. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and suscepibility to malaria. *Clin Infect Dis* 1999; 28:794-799 (1999)

Mockenhaupt FP, Bienzle U, May J, Falusi A, Ademowo OG, Olumese PE, Meyer CG. *Plasmodium falciparum*-infection: influence on haemoglobin levels in α -thalassaemia and microcytosis. *J Infect Dis* 1999; 180:925-928.

Kun JFJ, Klabunde J, Lell B, Luckner D, Alpers M, May J, Meyer CG, Kreamsner PG. Association of the ICAM-1^{Kilifi} mutation with protection against severe malaria in Lambaréné, Gabon. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:776-779.

Mockenhaupt F, May J, Stark K, Falusi AG, Meyer CG, Bienzle U. Serum transferrin receptor levels in *Plasmodium falciparum*-infection. *Hematologica* 1999; 84:869-873.

May J, Mockenhaupt FP, Löliger CC, Ademowo OG, Falusi AG, Jenisch S, Dippmann AK, Schnittger L, Kreamsner PG, Bienzle U, Meyer CG. HLA DPA1/DPB1 genotype and haplotype frequencies, and linkage disequilibria in Nigeria, Liberia, and Gabon. *Tissue Antigen* 1998; 52:199-207.

May J, Kreamsner PG, Milovanovic D, Schnittger L, Löliger CC, Bienzle U, Meyer CG. HLA-DP control of human *Schistosoma haematobium* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 302-306.

Meyer CG, May J, Stark K. Human leucocyte antigens in tuberculosis and leprosy. *Trends Microbiol* 1998; 6:148-154.

Meyer CG, May J, Schnittger L. HLA-DP - part of the concert. *Immunol Today* 1997; 18:58-61.

Schnittger L, May J, Loeliger CC, Gallin MY, Erttmann KD, Bienzle U, Kreamsner PG, Meyer CG. HLA-DRB1-DQA1-DQB1 haplotype diversity in in two African populations. *Tissue Antigens* 1997; 50:546-551.

Meyer CG, Schnittger L, Kretschmer C, May J. Met-11 of class II DP α 1 first domain associated with onchocerciasis. *Exp Clin Immunogenet* 1996; 13:12-19.

May J, Kretschmer C, Schnittger L, Striecker R, Kreamsner PG, Meyer CG. DPA1*0105, a novel DPA1-variant in a negroid population. *Tissue Antigens* 1996; 48:593-594.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. U. Bienzle danke ich für die kontinuierliche Unterstützung und Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit am Institut für Tropenmedizin Berlin.

Herrn PD Dr. C. G. Meyer danke ich für die seit langem bestehende enge und produktive Zusammenarbeit, die konstruktiven Diskussionen sowie die wertvolle Kritik bei der Erstellung der Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. P. G. Kremsner danke ich für die ergiebige Kooperation, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Tübinger Institut für Tropeninstitut 1998/99, die wissenschaftliche Diskussion und seine hilfreichen Ermutigungen.

Frau K. Nolde und Frau B. Jacob danke ich für die vertrauensvolle und hochwertige Arbeit im wissenschaftlichen Labor am Institut für Tropenmedizin.

Für die anregenden "Tübinger Diskurse" danke ich PD Dr. M. Klinkert, Dr. J. Kun, Dr. B. Lell, Dr. A. J. F. Luty, und Dr. B. Mordmüller.

Für die Untersuchungen der Patientenproben im Institut für Tropenmedizin danke ich Dr. A. K. Dippmann, Dr. C. Glückstein, Dr. L. Großterlinden, M. Huss, A. Kempa, Dr. A. Kretschmer, I. Moosmayer, C. Ritz, Dipl. biol. R. Striecker und Dipl. biol. M. Wagner.

Bei der Durchführung der Studien in Nigeria haben mitgewirkt Dr. G. O. Ademowo, Dr. A. Falusi, Dr. F. P. Mockenhaupt und Dr. P. E. Olumese.

Bei der Durchführung und Fortführung der longitudinalen Studie in Gabun waren u. a. beteiligt B. Bojowald, O. Dangelmaier, Dr. B. Greve, K. Herbich, H. Knoop, Dr. L. Lehman, Dr. D. Luckner, Dr. P. Matousek, A. Missinou, D. Schmid, Dr. R. Schmidt-Ott und Dr. M. Sovric.

Die Arbeiten zu den Studien wurden finanziell unterstützt von der Volkswagenstiftung, der Forschungsförderung der Charité, der Europäischen Gemeinschaft (EU-INCO DC), der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem *fortune*-Programm der Universität Tübingen.

Nicht zuletzt danke ich all denjenigen, die durch ihre Teilnahme die hier vorgestellten Studien ermöglicht haben, insbesondere den Kindern und ihren Familien.

Und ich danke Vera, ohne die alles viel schwieriger gewesen wäre.