

Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene der Universität Göttingen  
(ehem. Leiter: Prof. Dr. W. Bommer) (1)  
Hygiene-Institut der Universität Göttingen, Abt. Medizinische Mikrobiologie  
(Direktor: Prof. Dr. R. Thomssen) (2)

## Prolongierte haemolytische Anämie bei Malaria: Die Bedeutung von Autoantikörpern gegen Triosephosphat-Isomerase

A. Kuhlencord<sup>1</sup>, K. Ritter<sup>2</sup>, R. Thomssen<sup>2</sup>, W. Bommer<sup>1</sup>

### Einleitung

Die Entwicklung einer Anämie bei Malariapatienten ist häufig stärker und dauert länger, als es durch die Parasitämie erklärt werden kann (26). Als Ursache ist eine negative Beeinflussung der Erythropoese möglich, die sich unter anderem in einer inadäquaten Entwicklung der kompensatorischen Retikulozytose manifestiert. In vielen Fällen wird auch eine verstärkte Hämolyse beobachtet, die teilweise noch nach Eliminierung der Parasiten persistieren kann (27, 30). Die Genese dieser prolongierten Hämolyse ist bisher nicht sicher geklärt. Neben einer gesteigerten Erythrophagozytose durch unspezifische Makrophagenaktivierung wurden auch andere zelluläre und humorale Ursachen beobachtet und diskutiert (1, 5, 12, 20, 27).

Kürzlich entdeckten wir in Seren von Patienten mit akuter Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion Autoantikörper der Immunglobulinklasse M (IgM) mit Spezifität für das glykolytische Enzym Triosephosphat-Isomerase (TIM) (16, 17). Die anti-TIM-Antikörper können an Erythrozyten binden und unter Komplementaktivierung zur Lyse der Erythrozyten führen (18).

Im Verlauf einer Malaria kann es vorübergehend zu einer ausgeprägten zellulären und humoralen Immundefizienz kommen (23). Während dieser immunsuppressiven Phase durch die *Malaria tropica* kann das EBV reaktiviert werden (9, 28). Hier stellt sich auch ein Zusammenhang zwischen dem gemeinsamen Auftreten von Malaria- und EBV-Infektionen als Ursache für das EBV-assoziierte Burkitt-Lymphom (4, 6).

### Material und Methoden

#### Patienten

Zehn Patienten mit *Malaria tropica* und fünf Patienten mit *Malaria tertiana* wurden untersucht. Die Parasitämie wurde durch Auszählen von mindestens 1.000 Erythrozyten ermittelt. Eine Therapie wurde unmittelbar nach der Diagnosestellung je nach Parasitenart und Parasitämie mit Mefloquin, Chinin oder Chloroquin begonnen. Venöses Blut, unter anderem zur Bestimmung der Parasitämie, des Hämoglobingehaltes (Hb), der Laktatdehydrogenase (LDH), des Haptoglobins und des IgM sowie zur Durchfüh-

nung einer Epstein-Barr-Virus-Serologie, eines Coombs-Tests und zum Nachweis von Antikörpern gegen die Triosephosphat-Isomerase, wurde mindestens zum Diagnosezeitpunkt, nach zwei bis vier Tagen, nach sechs bis acht Tagen, nach ca. 14 Tagen sowie nach dem 28. Tag durch Punktion einer Armvene gewonnen. Seren für Verlaufsuntersuchungen wurden zwischenzeitlich bei  $-25^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Klinisch-chemische Untersuchungen

Hämoglobinkonzentration, LDH, Haptoglobin und IgM wurden nach üblichen Methoden photometrisch, enzymatisch bzw. nephelometrisch bestimmt. Qualitätskontrollen wurden entsprechend den Vorschriften und Anforderungen an die Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien durchgeführt.

Prolongierte Hämolyse wurde folgendermaßen definiert: Bei fehlendem Nachweis von Plasmodien im „Dicken Tropfen“ Zeichen einer persistierenden Hämolyse ( $\text{LDH} > 200 \text{ U/l}$ , Haptoglobin  $< 0,7 \text{ g/l}$ ) zwischen dem 7. und 14. Tag nach Diagnosestellung.

#### Epstein-Barr-Virus-Serologie

IgM- und IgG-Antikörper gegen das Kapsidantigen (VCA) des EBV wurden mittels indirektem Immunfluoreszenztest bestimmt (10, 22). Antikörper gegen das EBV-assoziierte Kernantigen (EBNA) wurde an Raji-Zellen über einen Anti-Komplement-Immunfluoreszenz-Test mit Meerschweinchen-Komplement und FITC-konjugiertem Anti-Meerschweinchen-C3 vom Kaninchen bestimmt (14). Der Nachweis von IgM-Anti-VCA und/oder ein positiver Anti-EA<sup>g</sup>-Wert bei positivem Anti-EBNA wurden als Zeichen einer reaktivierten EBV-Infektion gewertet.

#### Coombs-Test

Der Coombs-Test wurde wie von RINAS (15) beschrieben durchgeführt. In einem Zentrifugenröhrchen wird ein Tropfen Anti-Human-Globulin (DAKO) mit einem Tropfen einer Suspension der in physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Patientenerythrozyten (5vol.%ige Aufschwemmung) versetzt, anschließend 1 Min. bei 200 g zentrifugiert, kurz aufgeschüttelt und im Gegenlicht beurteilt.

#### Antigenpräparation

Humane Erythrozyten (0/Rh negativ) eines gesunden Blutspenders wurden dreimal in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS: 2 mmol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9 mmol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 180 mmol NaCl) gewaschen. 500  $\mu\text{l}$  gepackte Erythrozyten wurden mit 1 ml Lysispuffer (9,5 M Harnstoff, 2% [w/v] NP-40 und 5%  $\beta$ -Mercaptoäthanol) versetzt und gut gemischt. Nach fünf Einfrier-Auftau-Zyklen ( $-25^{\circ}\text{C}$ /Raumtemperatur) wurde das Gemisch zentrifugiert (12.000 g, 10 Min.). Der Überstand wurde als Antigen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) eingesetzt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von NEUHOFf et al. bestimmt (13).

#### Isolierung der Triosephosphat-Isomerase (TIM)

TIM wurde aus 100 g frischen humanen Erythrozyten (0/Rh negativ) nach der Methode von GRACY (7) isoliert. Das gereinigte Enzym wurde auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

#### Immunoblot

Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE): Die Zusammensetzung und die Elektrophorese von SDS-13% (w/v) Polyacrylamid-Flachgelen wurden nach der Methode von LAEMMLI durchgeführt (11). Die Gele wurden im „Mighty Small multiple gel caster“

(Hoefler Scientific Instruments, USA) hergestellt. 5  $\mu$ l (= 50  $\mu$ g Protein) des Erythrozytenlysates oder 5  $\mu$ l gereinigte TIM (= 5  $\mu$ g Protein) wurden in eine Tasche des Acrylamidgels gelegt. Die Elektrophorese wurde in einer "Mighty Small slab unit" (Hoefler Scientific Instruments, USA) mit 30 mA für 30 Min. bei 4° C durchgeführt.

Proteinblot: Der Elektrotransfer der Proteine von SDS-Gelen auf die PVDF-Membrane (hydrophobe Durapore Membrane GVHP 0,2  $\mu$ m, Millipore) wurde in Transferpuffer (0,192 mM Glycin, 25 mM Tris, 10% (v/v) Methanol, pH 8,3) als Transversalelektrophorese bei 100 V für drei Stunden oder mit 20 V über Nacht nach der Methode von GÜLTEKIN und HEERMANN bei 4° C durchgeführt (8). Im Anschluß an den Transfer können die Membranen getrocknet und im Exsikkator aufbewahrt werden. Vor der Benutzung müssen diese Membranen mit Methanol benetzt und kurz in Wasser gespült werden.

Immunfärbung der Blotmembranen: Zum Absättigen des Hintergrundes wurden die Membranen 30 Min. in 20% FKS/PBS (v/v) geschwenkt. Zum Nachweis der Antikörper wurden sowohl die Seren als auch die Meerrettich-Peroxidase-markierten 2. Antikörper in 20% FKS/PBS (v/v) verdünnt. Die 2. Antikörper waren spezifisch für humanes Ig/H  $\mu$  und Ig/H  $\gamma$  sowie für Ig/L kappa und Ig/L lambda (Dako, Dänemark). Diese Antikörper wurden 1 : 1.000 verdünnt eingesetzt. Die Antikörper wurden eine Stunde bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert. Serienuntersuchungen wurden mit Hilfe einer 15-Schlitzkammer nach HEERMANN (Froebel, Lindau, FRG) durchgeführt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Blotmembran in 0,5% Tween/PBS (v/v) gewaschen. Zur Entwicklung der Antigen-Antikörper-Reaktionen wurden die Blotmembranen in 0,01% Diaminobenzidin/PBS (w/v) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Spülen mit Wasser beendet. Die Auswertung erfolgte nach dem Trocknen der Membranen.

#### Affinitätsreinigung der Anti-TIM-Antikörper

Aus den Seren der Patienten wurden die Anti-TIM-Antikörper über eine Membran-Affinitätsreinigung isoliert wie kürzlich beschrieben (19).

#### Immunfluoreszenz

Erythrozyten (0/Rh negativ) eines gesunden Spenders wurden nach intensivem Waschen in Diglyzero-Veronal-Puffer (29) auf Glasobjektträger gegeben und durch Behandlung mit eiskaltem Azeton-Methanol Gemisch (1 + 1, v/v) fixiert. Es folgte die Inkubation mit affinitätsgereinigtem IgM-Anti-TIM (1  $\mu$ g/ml) für zwei Stunden bei 37° C in einer feuchten Kammer. Als Kontrolle diente ein monoklonales IgM von einem Patienten mit Morbus Waldenström (dieser Antikörper wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. N. Hilschmann, MPI für experimentelle Medizin, Göttingen, zur Verfügung gestellt). Nach wiederholtem Waschen wurden die Erythrozyten für eine Stunde bei 37° C mit Fluorescein-markierten Anti-human-IgM-Antikörpern (Dako, Dänemark) inkubiert (1 : 25 in PBS). Nach dem Waschen wurden die Objektträger in 70% Glycerin/PBS (v/v) eingebettet und sofort ausgewertet.

#### <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest

500  $\mu$ l einer 10%igen Suspension aus Testerythrozyten wurde mit 0,1 mCi<sup>51</sup>Cr (Amersham Buchler, Braunschweig, BRD) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. 10  $\mu$ l der markierten Erythrozyten wurden mit 10  $\mu$ l des inaktivierten Probandenserums oder mit 10  $\mu$ l des entsprechenden affinitätsgereinigten Antikörpers für zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jedem Ansatz 10  $\mu$ l Meerschweinchenserum, das an humanen Erythrozyten (0/Rh negativ) absorbiert war, als Komplementquelle zugesetzt. Die spezifische <sup>51</sup>Cr-Freisetzung wurde nach zwei Stunden aus Vierfach-Ansätzen bestimmt nach der Formel:

$$^{51}\text{Cr Freisetzung (\%)} = \frac{\text{cpm}_{\text{Überstand}} - \text{cpm}_{\text{spontan}}}{\text{cpm}_{\text{maximal}} - \text{cpm}_{\text{spontan}}} \times 100$$

## Ergebnisse

Patienten mit Malaria tertiana:

Alle fünf Patienten mit einer Malaria tertiana (*Plasmodium vivax*) zeigten einen unkomplizierten klinischen Verlauf. Zum Diagnosezeitpunkt und während der folgenden zehn Tage konnten Hämoglobin-Konzentrate zwischen 11,7 und 16,4 g/dl, erhöhte LDH-Werte bis maximal 395 U/ml, Haptoglobin-Werte zwischen 0 und 2,7 mg/ml sowie erhöhte IgM-Konzentrationen zwischen 2,8 und 7,0 mg/ml nachgewiesen werden. Alle Patienten hatten im Sinne einer früher durchgemachten EBV-Infektion IgG-Anti-VCA- und Anti-EBNA-Antikörper, Zeichen einer EBV-Reaktivierung ließen sich nicht nachweisen. Bei nachfolgenden Kontrolluntersuchungen konnten keine pathologischen Laborparameter festgestellt werden.

Patienten mit Malaria tropica:

Zehn Patienten mit einer Malaria tropica wurden untersucht. Zwei Patienten erlitten eine komplizierte Malaria mit einer Parasitämie von über 7% und einem akuten Nierenversagen. Spätestens nach dem fünften Tag nach Therapiebeginn konnten bei allen Patienten keine Parasiten mehr nachgewiesen werden. Fieberschübe traten nicht mehr auf. Bei sechs Patienten entsprachen klinischer Verlauf und EBV-Antikörperwerte jenem der Malaria tertiana-Patienten (s. o.). Bei vier Patienten ließen sich die Zeichen einer prolongierten Hämolyse nachweisen (Tab. 1). Der direkte Coombs-Test war bei allen Patienten negativ. Bei einzelnen Patienten konnte eine Dynamik im EBV-Antikörperverlauf nachgewiesen werden (temporärer Titeranstieg der IgG-Anti-VCA-Antikörper). Bei dem Patienten U. G., Nr. „8“, konnten Anti-EA<sup>d</sup> sowie IgM-Anti-VCA-Antikörper grenzwertig nachgewiesen werden.

Reaktion von Malaria-Serum mit Erythrozytenbestandteilen

Die Trennung eines humanen Erythrozytenlysates in der denaturierenden SDS-13% Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt in der Coomassie Blau-Färbung im Bereich der Molekularmasse 31 kD bis 26 kD eine breite Bande, die von einer schmalen begleitet ist (Abb. 1A). Wird das Erythrozytenlysat nach Trennung und Durchführung des Westernblots mit Serum eines Patienten mit Malaria tropica-Infektion inkubiert, stellt sich im Bereich der Molekularmasse 29 kD eine deutliche Bande dar; zwei sehr schwache Immunreaktionen finden sich zusätzlich bei 45 kD und 67 kD, wie Abbildung 1B zeigt. Abbildung 1A, Spur 3 zeigt aus humanen Erythrozyten gewonnene Triosephosphat-Isomerase, die eine Bande bei 29 kD bildet. Mit dieser Bande reagiert das Malaria-Serum sehr stark (Abb. 1B, Spur 2).

Nachweis von Anti-TIM in Malaria-Seren

Seren von zehn Patienten mit Malaria tropica und von fünf Patienten mit Malaria tertiana wurden auf Antikörper gegen gereinigte TIM getestet. Im Immunoblot reagierten vier der zehn Tropica-Seren positiv (Abb. 2A), jedoch keines von den Tertiana-Seren. Abbildung 2B zeigt die Bestimmung der Immunglobulinklasse und der leichten Ketten von Anti-TIM Antikörpern bei zwei Patienten. Die Anti-TIM Antikörper zeigten in den vier Fällen eine positive Reaktion auf Ig/H  $\mu$ . In keinem Fall wurde als schwere Kette „ $\gamma$ “

TABELLE 1

**Hämatologische Werte von vier Patienten mit einer Malaria tropica  
und einer prolongierten Hämolyse**

(Normalwerte: Hämoglobin [Hb] 12 - 18 g/dl, Laktatdehydrogenase [LDH] 80 - 200 U/l,  
Haptoglobin 0,7 - 3,2 mg/ml, Immunglobulin M [IgM] 0,6 - 2,8 mg/ml).

Patient 4: R. M., 40 Jahre						
Tage	Diagnose	+ 2	+ 4	+ 8	+ 14	
Parasitämie (%)	3,5	1,5	0	0	0	
Hb (g/dl)	11,9	10,0	9,7	9,3	11,7	
LDH (U/l)	798	701	n. d.	363	310	
Haptoglobin (g/l)	0,1	0,3	0,4	0,1	0,1	
IgM (g/l)	7,7	9,1	11,4	9,6	9,5	
Anti-TIM (Titer)	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 1600	1 : 1600	
Patient 5: D. H., 52 Jahre						
Tage	Diagnose	+ 7	+ 12	+ 22	+ 24	+ 47
Parasitämie (%)	17,0	0	0	0	0	0
Hb (g/dl)	11,5	7,8	6,4	7,0	6,4	9,8
LDH (U/l)	1009	354	307	223	232	192
Haptoglobin (g/l)	0,5	0,3	0,6	0,9	0,5	2,7
IgM (g/l)	2,5	6,3	7,6	7,8	8,0	5,5
Anti-TIM (Titer)	1 : 3200	1 : 3200	1 : 1600	1 : 1600	1 : 1600	1 : 100
Patient 6: A. S., 30 Jahre						
Tage	Diagnose	+ 3	+ 6	+ 20	+ 34	+ 55
Parasitämie (%)	7,0	0,2	0	0	0	0
Hb (g/dl)	12,2	9,4	8,4	10,5	11,5	13,2
LDH (U/l)	852	732	399	369	283	197
Haptoglobin (g/l)	0,2	0,1	1,3	0,0	0,7	1,8
IgM (g/l)	5,4	5,6	7,3	8,5	7,8	6,0
Anti-TIM (Titer)	1 : 1600	> 1 : 200	1 : 1600	> 1 : 200	1 : 800	1 : 100
Patient 8: U. G. 26 Jahre						
Tage	Diagnose	+ 2	+ 8	+ 47		
Parasitämie (%)	0,01	0,001	0	0		
Hb (g/dl)	17,9	16,5	14,4	15,9		
LDH (U/l)	315	491	290	246		
Haptoglobin (g/l)	0,7	0,1	0,1	0,9		
IgM (g/l)	1,8	6,2	8,0	2,6		
Anti-TIM (Titer)	1 : 100	1 : 250	1 : 400	1 : 50		

TABELLE 2

**Chrom-51-Freisetzung aus Erythrozyten nach Inkubation mit Serum oder affinitäts-gereinigtem IgM-Anti-TIM (aff. IgM) von Patienten mit Malaria tropica.**

Patient	Probe	eigene Erythrozyten	Spender-Erythrozyten (O/Rh negativ)
		(% spezifische Chrom-51-Freisetzung)	
4: R. M	Serum aff. IgM	21	16
		30	24
5: D. H.	Serum aff. IgM	17	12
		32	23
6: A. S.	Serum aff. Igm	15	10
		28	18
8: U. G.	Serum aff. IgM	n. d.	6
		n. d.	14

nachgewiesen. Die Charakterisierung der leichten Ketten ergab bei den Patienten „4“ und „5“ nur das Vorhandensein von lambda-Ketten. In den beiden anderen Fällen „6“ und „8“ dagegen wurde sowohl lambda als auch kappa als leichte Kette des IgM-Anti-TIM identifiziert (Daten nicht gezeigt).

Die Seren mit dem positiven IgM-Anti-TIM Befund wurden mittels Immunoblot austriert. Dabei fanden sich Titer-Werte von 1 : 400 bis 1 : > 3.200 (Grenzwert 1 : 100) (vgl. Abb. 3 und Tabelle 1).

#### Reaktion von affinitätsgereinigtem IgM-Anti-TIM auf Erythrozyten

Anti-TIM-Antikörper binden an Erythrozyten und induzieren in der Immunfluoreszenz eine feingranuläre Fluoreszenz, die im Bereich der Zellmembran lokalisiert ist. Eine Fluoreszenz im Zytoplasma war nicht meßbar.

Die Behandlung der Patienten-Erythrozyten und der Spender-Erythrozyten mit Patienten-Serum aus der akuten Phase der Hämolyse bzw. affinitätsgereinigtem IgM-Anti-TIM führte zur <sup>51</sup>Cr-Freisetzung aus den markierten Zellen in einer Größenordnung von 6 - 32%. Dabei zeigte es sich, daß die <sup>51</sup>Cr-Freisetzung aus den eigenen Erythrozyten höher war als aus den Spender-Erythrozyten (Abb. 3 und Tabelle 2).

## Diskussion

Patienten mit einer Malaria können aus verschiedenen Gründen eine Anämie entwickeln. Sicher werden parasitierte Zellen durch die Malariaparasiten zerstört. Beschrieben wurde auch eine Beeinträchtigung der Erythropoese im Knochenmark, Splenomegalie mit ausgeprägter Phagozytose auch nicht parasitierter Erythrozyten und Bildung von Autoantikörpern (26, 27, 30).

In früheren Arbeiten berichteten wir über den Nachweis von Autoantikörpern gegen Triosephosphat-Isomerase (IgM-Anti-TIM) bei Patienten mit einer akuten Epstein-Barr-Virus-Infektion (18). Vor kurzem gelang uns bei einem 18jährigen Patienten mit einer akuten EBV-Infektion und einer ausgeprägten Hämolyse der Nachweis dieses Auto-

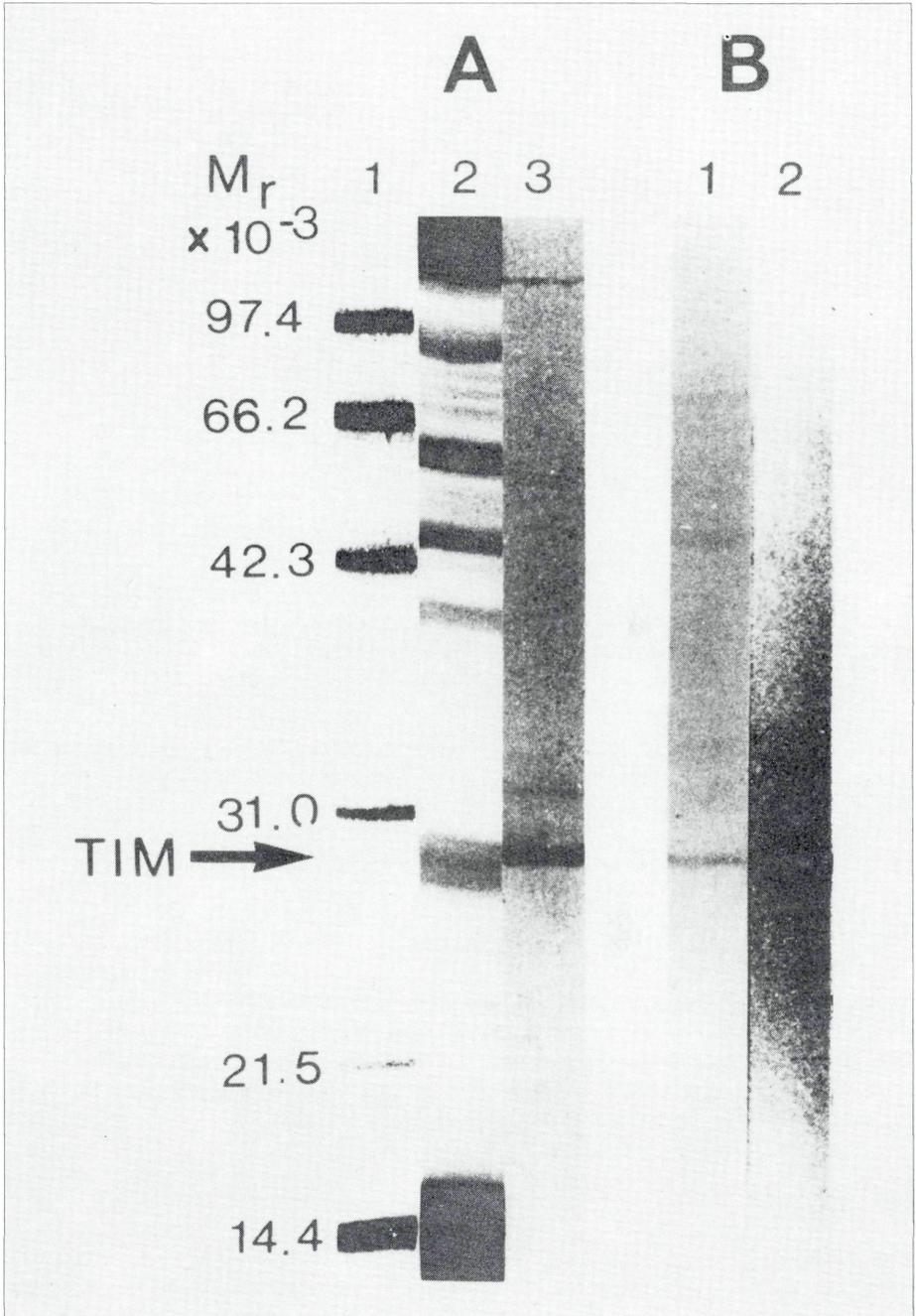


Abb. 1:

A: SDS-13% PAGE, Coomassie Blau Färbung  
Spur 1: Molekulargewichtsmarker · Spur 2: Humanes Erythrozytenlysat · Spur 3: Gereinigte humane TIM aus Erythrozyten

B: SDS-13% PAGE, Immunoblot mit Serum eines *Malaria tropica*-Patienten  
Spur 1: Humanes Erythrozytenlysat · Spur 2: Gereinigte humane TIM aus Erythrozyten



Abb. 2:

A: Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern gegen TIM in Seren von 10 Patienten mit *Malaria tropica*: Ko = Kontrolle mit Anti-TIM Hyperimmunserum vom Kaninchen.

B: Immunoblot zur Bestimmung der Immunglobulinklasse (Ig/H) und der leichten Ketten (Ig/I).

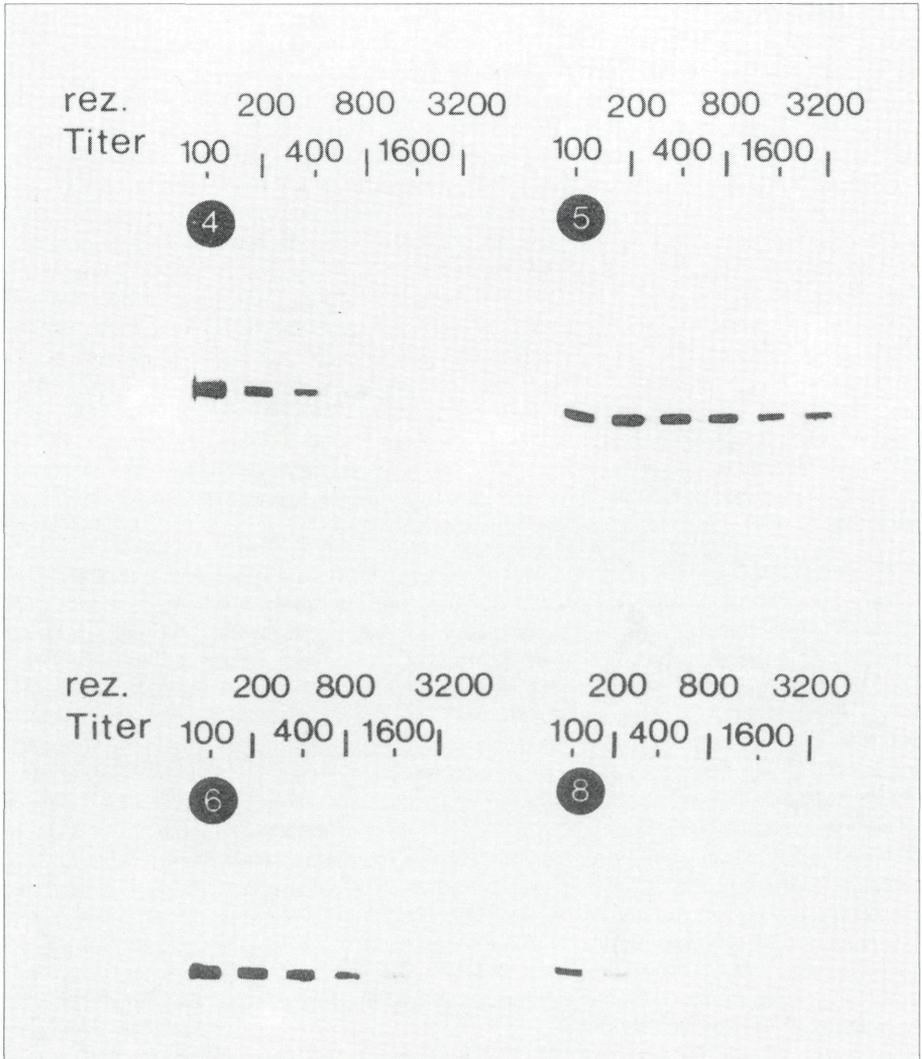


Abb. 3:

Immunoblot: Titration von IgM-Anti-TIM bei vier Patienten mit *Malaria tropica*.

antikörpers. Nach Affinitätsreinigung reagierten die Autoantikörper mit den Patientene-rythrozyten und führten unter Komplementaktivierung zu einer erhöhten  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung als Zeichen einer Hämolyse (17). Auch bei einer 17jährigen Patientin, die im Verlauf einer akuten EBV-Infektion eine schwere Hämolyse und hämolytische Anämie entwickelte, wurden hohe Antikörperwerte gegen TIM nachgewiesen.

Bei Malariapatienten kann gelegentlich eine über das Ausmaß der Parasitämie verstärkte und nach erfolgreicher Therapie persistierende Hämolyse nachgewiesen werden (27). Bei keinem der von uns untersuchten Malariapatienten mit einer *Malaria tertiana* konnte eine prolongierte Hämolyse nachgewiesen werden. Autoantikörper gegen TIM wurden in keinem Fall von *Malaria tertiana* gemessen. Dagegen hatten vier Patienten mit einer *Malaria tropica* eine prolongierte Hämolyse. Eine deutliche Erhöhung der Laktatdehydrogenase im Serum sowie erniedrigte Haptoglobin-Werte ließen sich bei

diesen Patienten länger als 30 Tage nach Erkrankungs- und Therapiebeginn nachweisen. Diese vier Patienten wiesen im Immunoblot eine hoch positive Reaktion mit dem 29 kD-Monomer der humanen Triosephosphat-Isomerase auf. Im Immunfluoreszenztest konnte gezeigt werden, daß aus Patientenseren gewonnenes affinitätsgereinigtes Anti-TIM an Erythrozyten bindet. Komplementaktivierung führte zu einer Freisetzung von  $^{51}\text{Cr}$  aus markierten Erythrozyten. Dabei war die Wirkung auf eigene Erythrozyten größer als auf Fremd-Erythrozyten. Möglicherweise ist der Anteil membranassoziierter TIM unterschiedlich groß (24). Etwa parallel zum Rückgang der Hämolyse fielen auch die Autoantikörper ab. Unter der Vorstellung, daß Malaria eine starke Immunsuppression verursacht (23), war zu prüfen, ob die Anti-TIM-Antikörper möglicherweise im Rahmen einer reaktivierten EBV-Infektion gebildet wurden. Nur in einem Fall (Patient U. G., Nr. „8“) ließen sich IgM-Anti-VCA und Anti-EA<sup>d</sup> als Hinweis auf eine EBV-Reaktivierung nachweisen. Bei den Patienten „4“, „5“ und „6“ konnte eine Reaktivierung serologisch ausgeschlossen werden. Das Auftreten von Anti-TIM scheint nicht ausschließlich an die Aktivität des EBV gebunden zu sein. Nicht nur die EBV-Infektion sondern auch die Malaria kann zu einer ausgeprägten B-Zell-Aktivierung führen (21, 25), die häufig von einer Hypergammaglobulinämie begleitet ist. Die gebildeten Immunglobuline haben nicht nur Spezifität für Erregerantigene, sondern reagieren mit einer Vielzahl heterogener und/oder autologer Antigene (3).

ROSENBERG et al. (20) fielen bei der Untersuchung von Patienten mit *Plasmodium falciparum* erhöhte Serum-IgM-Werte auf. Parallel konnte immunfluoreszenz-serologisch ein IgM-Antikörper gegen humane Erythrozyten nachgewiesen werden, der eine vermehrte Freisetzung von  $^{51}\text{Cr}$  aus markierten Erythrozyten induziert. Es bestand ein klarer Zusammenhang zwischen dem Verlauf der hämolytischen Anämie und dem Auftreten der IgM-Anti-Erythrozyten-Antikörper. Der von uns erstmals bei akuten EBV-Infektionen beschriebene und charakterisierte IgM-Autoantikörper gegen die TIM (18) konnte jetzt auch bei Malariapatienten nachgewiesen werden. ROSENBERG et al. (20) konnten dem von ihnen nachgewiesenen IgM-Antikörper keine Spezifität zuweisen. Es ist nicht auszuschließen, daß IgM-Anti-TIM mit jenem Antikörper identisch ist. LUNDGREN et al. (12) transformierten B-Lymphozyten von Malaria Patienten mit EBV. Dabei erhielten sie Klone, die Antikörper gegen *Plasmodium falciparum* und/oder Erythrozyten produzierten. Die Antikörper gehörten der Immunglobulinklasse M an; beide leichten ( $\kappa$  und  $\lambda$ ) Ketten waren vertreten. In unseren Untersuchungen hatten zwei Patienten (Nr. „4“ und „5“) sehr wahrscheinlich ein monoklonales IgM-Anti-TIM, da als leichte Kette nur  $\lambda$  nachgewiesen wurde. Die IgM-Anti-TIM-Antikörper der Patienten „6“ und „8“ hatten als leichte Kette  $\lambda$  und  $\kappa$ . Hämolyse-Versuche wurden von LUNDGREN et al. (12) nicht durchgeführt. Es wurde aber vermutet, daß der Autoantikörper mit Spektrin der Erythrozytenmembran reagiert. Auf welche Weise Anti-TIM-Autoantikörper die Erythrozytenfunktion beeinträchtigen, ist noch unbekannt. Da Antikörper intakte Zellmembranen nicht durchdringen können, die TIM aber ein zytoplasmatisches Enzym ist, muß davon ausgegangen werden, daß ein Teil des Enzyms mit der Membran in Kontakt steht. Hinweise auf membranassoziierte TIM wurden bereits früher erhalten (24). Im Verlauf der physiologischen Alterung von Erythrozyten zerfällt die TIM in ihre beiden monomeren Polypeptidketten (31). Durch einen “shuttling“-Prozeß, der kürzlich für Nukleoproteine nachgewiesen wurde (2), könnten TIM-Monomere vom Zytoplasma in die Zellmembran gelangen. Auch ein “molecular mimicry” zwischen einem Epitop der TIM und einem Bestandteil der Zellmembran kann der Antikörperwirkung zugrunde liegen. Die Charakterisierung der Antigenbindungsstelle auf der TIM wird hier weiteren Aufschluß bringen. Die Wirkung der Anti-TIM-Antikörper könnte sich in zwei Phasen entwickeln. In einem initialen Abschnitt wird unter Komplementaktivierung die Zellmembran so geschädigt, daß nachfolgend Antikörper auch in die Zelle hinein gelangen. Intrazellulär könnten die Antikörper dann durch Komplexbildung die Enzymfunktion stören.

## Zusammenfassung

Im Anschluß an eine parasitologisch ausgeheilte Malaria tropica zeigten vier von zehn Patienten eine prolongierte Hämolyse. In den Seren dieser Patienten wurden Antikörper mit Spezifität für das glykolytische Enzym Triosephosphat-Isomerase (TIM) nachgewiesen. Die Autoantikörper gegen Triosephosphat-Isomerase gehörten ausschließlich der Immunglobulinklasse M an (IgM-Anti-TIM). Aus den Seren der vier Patienten mit Hämolyse reagierte affinitätsgereinigtes IgM-Anti-TIM mit Erythrozyten und induzierte unter Komplementaktivierung eine erhöhte <sup>51</sup>Cr-Freisetzung aus markierten Erythrozyten. Die klinische Besserung und der Rückgang der Hämolyse verliefen parallel zum Abfall der Autoantikörper. Die Autoantikörper könnten wesentlich für die prolongierte Hämolyse verantwortlich sein.

## Schlüsselwörter

Malaria, prolongierte Hämolyse, Anämie, Autoantikörper, EBV-Infektion.

## Summary

Prolonged hemolysis in malarial infections: The significance of autoantibodies against triosephosphate isomerase

Four out of ten patients with falciparum malaria showed prolonged hemolysis after parasitological cure. Antibodies specific for the glycolytic enzyme triosephosphate isomerase (TPI) were detected in the sera of these patients. The autoantibodies against TPI belonged without exception to the immunoglobulin class M (IgM anti-TPI). Affinity purified IgM anti-TPI from sera of these patients with hemolysis reacted with erythrocytes and induced complement activation and increased <sup>51</sup>Cr release from marked erythrocytes. Patient recovery and recession of hemolysis were found to accompany the decrease of the autoantibodies. The occurrence of these antibodies might be a reason for prolonged hemolysis in malaria tropica.

## Key words

Malaria, prolonged hemolysis, autoantibodies, Epstein-Barr virus infection.

## Literatur

1. ABDALLA, S., WEATHERALL, D. J. (1982):  
The direct antiglobulin test in *P. falciparum* malaria.  
*Br. J. Haematol.* 51, 415-425.
2. BACHMANN, M., PFEIFER, K., SCHRÖDER, H. C., MÜLLER, E. G. (1990):  
Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties.  
*Cell* 60, 85-93.
3. DANIEL-RIBEIRO, C., DRUILHE, P., MONJOUR, L., HOMBERG, L.-C., GENTILINI, M. (1983):  
Specificity of autoantibodies in malaria and the role of polyclonal activation.  
*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 185-188.
4. EPSTEIN, M. A. (1984):  
Burkitt's lymphoma: Clues to the role of malaria.  
*Nature* 312, 388.

5. FACER, C. A., BRAY, R. S., BROWN, J. (1979):  
Direct Coombs antiglobulin test in Gambian children with *P. falciparum* malaria. I. Incidence and class specificity.  
*Clin. Exp. Immunol.* 35, 119-127.
6. FACER, C. A., PLAYFAIR, J. H. L. (1989):  
Malaria, Epstein-Barr virus and the genesis of lymphomas.  
*Adv. Cancer Res.* 53, 33-72.
7. GRACY, R. W.:  
Triosephosphat isomerase from human erythrocytes.  
In: Wood, W. A. (ed.): *Methods in enzymology*.  
Vol. 41, Academic Press, New York, 1975.
8. GÜLTEKIN, H., HEERMANN, K. H. (1988):  
The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix.  
*Anal. Biochem.* 172, 320-329.
9. GUNAPALA, D. E., FACER, C. A., DAVIDSON, R., WEIR, W. R. C. (1990):  
In vitro analysis of Epstein-Barr virus: host balance in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria.  
*Parasitol. Res.* 76, 531-535.
10. HENLE, G., HENLE, W. (1966):  
Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma.  
*J. Bacteriol.* 91, 1248-1251.
11. LAEMMLI, U. K. (1970):  
Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T<sub>4</sub>.  
*Nature* 227, 680-685.
12. LUNDGREN, K., WAHLGREN, M., TROYE-BLOMBERG, M., BERZINS, K., PERLMANN, H., PERLMANN, P. (1983):  
Monoclonal anti-parasite and anti-RBC antibodies produced by stable EBV-transformed B Cell lines from malaria patients.  
*J. Immunol.* 131, 2000-2003.
13. NEUHOFF, V., PHILIPP, K., ZIMMER, H. G., MESECKE, S. (1979):  
A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences.  
*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 256, 1657-1670.
14. REEDMAN, B. M., KLEIN, G. (1973):  
Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV) — associated complementfixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines.  
*Int. J. Cancer* 11, 499-520.
15. RINAS, U.:  
*Blutgruppenserologie*.  
3. Auflage, Berlin, 1988.
16. RITTER, K., BRESTRICH, H., THOMSEN, R. (1990):  
IgM autoantibodies against two cellular antigens always appear in acute Epstein-Barr virus infection.  
*Scand. J. Infect. Dis.* 22, 135-143.
17. RITTER, K., LAMBERTS, R., THOMSEN, R. (1990):  
Infektiöse Mononukleose: Hämolyse durch Autoantikörper gegen Triosephosphat-Isomerase.  
*Dtsch. Med. Wschr.* 115, 1432-1435.
18. RITTER, K., BRESTRICH, H., NELLEN, B., KRATZIN, H., EIFFERT, H., THOMSEN, R. (1990):  
Autoantibodies against triosephosphat isomerase. A possible clue to pathogenesis of hemolytic anemia in infectious mononucleosis.  
*J. Exp. Med.* 171, 565-570.
19. RITTER, K. (1991):  
Affinity purification of antibodies from sera using polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes as coupling matrices for antigens presented by autoantibodies to triosephosphate isomerase.  
*J. Immun. Methods* 137, 209-215.
20. ROSENBERG, E. B., STRICKLAND, T., YANG, S.-L., WHALEN, G. E. (1973):  
IgM antibodies to red cells and autoimmune anemia in patients with malaria.  
*Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 22, 146-152.

21. ROSENBERG, Y. J. (1978):  
Autoimmune and polyclonal B cell response during murine malaria.  
*Nature (London)* 274, 170-172.
22. SCHMITZ, H., SCHERER, M. (1972):  
IgM antibodies to Epstein-Barr virus in infectious mononucleosis.  
*Arch. Virusforsch.* 37, 333-340.
23. TERRY, R., HUDSON, K. (1982):  
Immunodepression in parasitic infections.  
*Fortschr. Zoologie* 27 (Suppl. 12), 125-139.
24. TILLMANN, W., CORDUA, A., SCHRÖTER, W. (1975):  
Organization of enzymes of glycolysis and of glutathione metabolism in human red cell membranes.  
*Biochem. Biophys. Acta* 382, 157-171.
25. TOSATO, G., BLAESE, R. M. (1985):  
Epstein-Barr virus infection and immunoregulation in man.  
*Adv. Immunol.* 37, 99-149.
26. WEATHERALL, D. J., ABDALLA, S. (1982):  
The anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria.  
*British Med. Bull.* 38, 147-151.
27. WEATHERALL, D. J., ABDALLA, S., PIPPARD, M. J. (1983):  
The anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria.  
In: Evered, D., Whelan, J.: *Malaria and the red cell.*  
Ciba Foundation symposium 94, London, 1983.
28. WHITTLE, H. C., BROWN, J., MARSH, K., GREENWOOD, B. M., SEIDELIN, P., TIGHE, H.,  
WEDDERBURN, L. (1984):  
T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B cells is lost during *P. falciparum* malaria.  
*Nature (London)* 312, 449-450.
29. WINKLE, S.:  
Mikrobiologische und serologische Diagnostik.  
3. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1979.
30. WOODRUFF, A. W., ANSDELL, V. E., PETTITT, L. E. (1979):  
Cause of anaemia in malaria.  
*Lancet* i, 1055-1057.
31. YUAN, F. M., TALENT, J. M., GRACY, R. W. (1981):  
Molecular basis for the accumulation of acidic isoenzymes of triosephosphate isomerase on aging.  
*Mech. Ageing. Dev.* 17, 151-162.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Armin Kuhlencord  
Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene  
Windausweg 2  
D-W 3400 Göttingen · Bundesrepublik Deutschland



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1992

Band/Volume: [14](#)

Autor(en)/Author(s): Kuhlencord A., Ritter K., Thommsen R., Bommer Wolfgang

Artikel/Article: [Prolongierte haemolytische Anämie bei Malaria: Die Bedeutung von Autoantikörpern gegen Triosephosphat-Isomerase. 293-306](#)