

Mit. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 7 (1985) 271–277

Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene der Universität Göttingen (Vorstand: Prof. Dr. med. W. Bommer) (1)
Kinderklinik der Universität Göttingen (Vorstand: Prof. Dr. med. W. Schröter) (1)
Institut für Biochemie II der Universität Heidelberg (Vorstand: Prof. Dr. med. Brosser) (1)

Die Entwicklung von *Plasmodium falciparum* in normalen und in β -Thalassaemie-Erythrozyten

Ronald Kaminsky¹, Claudia Huppach¹, Norbert Krüger², Ernst Hempelmann³, Wolfgang Bommer¹

Einleitung

Auf der Suche nach Schutzmechanismen gegen eine Malaria-Infektion werden die Forschungsschwerpunkte heute vor allem auf den Gebieten Immunologie und Chemotherapie gesetzt. Auf den Einsatz einer evtl. möglichen Vakzine wird man noch mehrere Jahre warten müssen. Die Entwicklung neuer Chemotherapeutika erleidet gerade auf dem Gebiet der Malaria immer wieder neue Rückschläge; vermehrt treten Resistenzen der Plasmodien auch gegen neu entwickelte Medikamente auf.

In der Natur dagegen sind schon seit langem vererbte Resistenzen bestimmter Bevölkerungsgruppen gegen Malaria bekannt wobei die Resistenzmechanismen allerdings noch weitgehend ungeklärt sind. Einige Modifikationen des Blutsystems, z.B. Sichelzellenanaemie, G-6-P-D-Mangel und die Thalassaemie, scheinen eine Schutzwirkung gegen *Plasmodium falciparum*, den Erreger der Malaria tropica zu haben (ALLISON 1961, LUZZATTO 1974, NURSE 1979, PASVOL und WILSON 1982).

Die β -Thalassaemie ist eine vererbte Störung der Haemoglobin-Produktion, die durch eine verminderte oder fehlende Synthese der β -Kette des Haemoglobins gekennzeichnet ist. Die homozygote β -Thalassaemie ist mit einer schweren Anaemie verbunden und führt unbehandelt zum frühen Tode. Bei der heterozygoten β -Thalassaemie gibt es keine abnormen klinischen Symptome (FAIRBANKS 1980, WHO Working Group 1982). Das an sich nachteilige Gen für β -Thalassaemie scheint allerdings in Malaria-Gebieten einen Selektionsvorteil zu haben. Aufgrund der geographischen Korrelation von Gebieten mit Malaria und mit dem β -Thalassaemie-Gen wird eine Resistenz der Menschen mit heterozygoter β -Thalassaemie gegen *Plasmodium falciparum*-Malaria vermutet (FRIEDMANN 1983, WILLCOX et al. 1983).

Die erfolgreiche in-vitro-Kultivierung von *P. falciparum* hat das ganze Feld der Untersuchungen über die zellulären Grundlagen der vererbten Resistenz gegen Malaria eröffnet. Wir haben erste in-vitro-Studien über die Entwicklung von *P. falciparum* in normalen und β -Thalassaemie-Erythrozyten von heterozygoten Spendern durchgeführt.

Material und Methoden

In allen Versuchen verwendeten wir den *Plasmodium falciparum*-Stamm FCB von den Behring Werken, Marburg. Die Kultivierung wurde nach der von JENSEN und TRAGER (1977) beschriebenen Kerzentopf-Methode durchgeführt mit der Abänderung, daß wir das RPMI 1640 Medium mit 15%igem Humanserum benutzten. Außerdem führten wir täglich zwei- oder dreimal einen Mediumwechsel durch. Die Versuche wurden mit einem niedrigen Hämatokrit von 3–5% und einer Anfangsparasitämie von 0,5–1,5% begonnen. Die Erythrozyten wurden mit Ausnahme der ersten Versuche und der

Kreuzversuche mit Sorbitol-synchronisierten Kulturen (Ringformen) infiziert (LAMBROS und VANDENBERG 1979).

Spender der heterozygoten β -Thalassämie-Erythrozyten waren Eltern von homozygoten Patienten der Kinderklinik Göttingen. An dem jeweils gleichen Tag wurden Kontrollerythrozyten von verschiedenen Spendern gewonnen. Wenn die Erythrozyten nicht am selben Tag für einen Versuch verwendet werden konnten, wurden sie für einige Tage bei 4° C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Parasitämie und des prozentualen Anteils der Ringformen wurden von GIEMSA-gefärbten Ausstrichen 1000 Erythrozyten ausgezählt (bei Parasitämien über 20% nur 500 Erythrozyten).

Die Untersuchungen über die Membranproteine (Erythrozyten-Ghost Präparation, SDS Polyacrylamid-Gel Elektrophorese, Silberfärbung) wurden nach bereits beschriebenen Methoden durchgeführt (DODGE et al. 1963, HEMPELMANN 1982, HEMPELMANN et al. 1984).

Ergebnisse

Zunächst wurde die Entwicklung von *P. falciparum* in normalen und in β -Thalassaemie-Erythrozyten unter den üblichen von TRAGER und JENSEN (1978) beschriebenen Kulturbedingungen untersucht. In diesen Experimenten konnte kein Unterschied in der Parasiten-Entwicklung beobachtet werden. (Abb. 1).

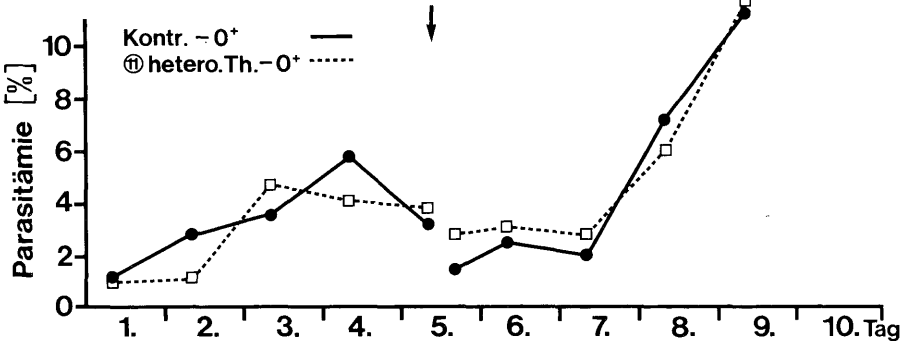


Abbildung 1: Die Entwicklung von *P. falciparum* in normalen und heterozygoten β -Thalassaemie-Erythrozyten unter üblichen Kulturbedingungen. (Der Pfeil "↓" gibt den Zeitpunkt der Subkultivierung an).

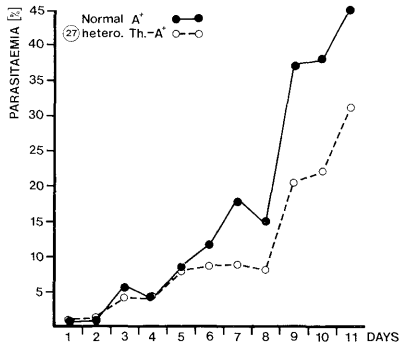


Abbildung 2: Die Entwicklung von *P. falciparum* in normalen und in heterozygoten β -Thalassaemie-Erythrozyten in Kulturen ohne Subkultivierung.

Unterschiede im Parasiten-Wachstum traten jedoch auf, wenn keine Subkultivierung vorgenommen wurde, d.h. wenn der Kultur keine neuen - nicht infizierten - Erythrozyten zugegeben wurden (Abb. 2).

Bis zum 5. bzw. 6. Tag verlief die Entwicklung in beiden Erythrozyten-Typen gleich. Ab dem 6. Tag traten dann in allen fünf durchgeführten Versuchen Unterschiede im Parasiten-Wachstum auf, wobei zum Ende des jeweiligen Versuches das Wachstum in den β -Thalassaemie-Erythrozyten um etwa 50% gegenüber dem Wachstum in normalen Erythrozyten reduziert war.

Um mögliche Ursachen für dieses unterschiedliche Parasiten-Wachstum zu finden, wurde zunächst geprüft, ob nicht aufgrund des unterschiedlichen Nahrungs- bzw. Energieangebots in Thalassaemie-Erythrozyten eine andere Zykluslänge als die sonst normalen 48 Stunden vorliegt. In Abbildung 3 wird aber deutlich, daß der Zyklus in beiden Erythrozyten-Typen übereinstimmend 2 Tage lang war.

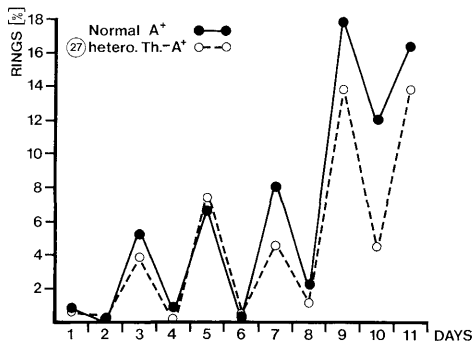


Abbildung 3: Prozentualer Anteil von Ringformen in normalen und in heterozygoten β -Thalassaemie-Erythrozyten.

Um zu untersuchen, ob das physiologische Alter der Erythrozyten für die Differenz in der Parasiten-Entwicklung verantwortlich sein kann, wurden nicht infizierte Erythrozyten 6, 8 und 12 Tage vorbehandelt, bevor sie mit *P. falciparum* infiziert wurden. Dazu wurden die nicht infizierten Erythrozyten zunächst bei 37° C in Kulturmedium mit zweimal täglichem Mediumwechsel gehalten. Bei einer Vorbehandlung von 6 und 8 Tagen traten die Unterschiede im Parasiten-Wachstum genau wie in den oben dargestellten Ergebnissen ab dem 6. Tag auf. Erst bei einer Vorbehandlungszeit von 12 Tagen wurde das unterschiedliche Parasiten-Wachstum 2 Tage eher deutlich als in den Versuchen ohne Vorbehandlung der Erythrozyten.

Außerdem wurde untersucht, ob nicht Unterschiede in der Membran von normalen und von β -Thalassaemie-Erythrozyten die Ursache für das unterschiedliche Parasiten-Wachstum sein könnten. Mit einer neu entwickelten Silberfärbung können nach elektrophoretischer Auftrennung wesentlich mehr Membran-Proteine erfaßt werden als mit der üblichen Coomassie-Färbung. Die Proteinmuster von mehreren normalen Erythrozyten-Membranen sind einheitlich, dagegen gibt es bei Proteinmustern der heterozygoten β -Thalassaemie-Erythrozyten mehrere Unterschiede. Trotz der bisher geringen Anzahl von Versuchen ist es sehr wahrscheinlich, daß es Unterschiede in der Zusammensetzung der Membran-Proteine von normalen und von β -Thalassaemie-Erythrozyten gibt.

Um die Bedeutung von Serumfaktoren für die Entwicklung von *P. falciparum* zu untersuchen, wurden Kreuz-Experimente durchgeführt. Erste Ergebnisse zeigen, daß Serum-Faktoren einen hemmenden Einfluß auf die Parasiten-Entwicklung haben können. *P. falciparum* wächst in normalen und in β -Thalassaemie-Erythrozyten gleich gut in RPMI-Medium mit normalen AB-Serum. In Medium mit Thalassaemie-Serum dagegen ist die Entwicklung in β -Thalassaemie-Erythrozyten deutlich schlechter als in normalen Erythrozyten (Abb. 4).

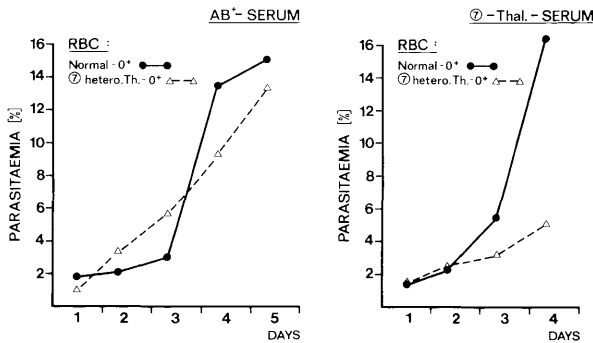


Abbildung 4: Die Entwicklung von *P. falciparum* in normalen und in heterozygoten β -Thalassaemie-Erythrozyten kultiviert in RPMI 1640 Medium mit normalem AB-Serum und in Medium mit Serum eines heterozygoten β -Thalassaemie-Spenders.

Diskussion

Unsere Ergebnisse der *in-vitro*-Studien über die Entwicklung von *P. falciparum* in normalen und in heterozygoten β -Thalassaemie-Erythrozyten unterstützen die Hypothese, daß es eine Resistenzwirkung der heterozygoten β -Thalassaemie gegen *Malaria tropica* gibt. Unter üblichen Kulturbedingungen kann zunächst kein unterschiedliches Parasiten-Wachstum beobachtet werden. Bei Einfluß von bestimmten Streßfaktoren jedoch wird die Entwicklung von *P. falciparum* in β -Thalassaemie-Erythrozyten gehemmt.

FRIEDMANN (1979, 1983) beobachtete ein vermindertes Parasiten-Wachstum in Thalassaemie-Erythrozyten, wenn die Gaskonzentration von den üblichen 17% O₂ auf 25 - 30% O₂ erhöht oder wenn reduziertes Glutathion, ein Bestandteil des RPMI 1640 Mediums, weggelassen wurde. Reduziertes Glutathion schützt die Parasiten vor oxidativer Beschädigung. Ohne diesen Schutz ist das Parasiten-Wachstum in Thalassaemie-Erythrozyten vermindert, weil sie für oxidativen Streß besonders anfällig sind.

In unseren Experimenten waren andere Mechanismen als der oxidative Streß für ein vermindertes Parasiten-Wachstum verantwortlich. Die Untersuchungen über die hemmenden Faktoren bei unseren Langzeitversuchen ergaben verschiedene Ansatzpunkte für eine Erklärung der vorteilhaften Eigenschaften der β -Thalassaemie gegen *P. falciparum*-Infektionen.

Wurde keine Subkultivierung vorgenommen, trat nach 6 Tagen ein vermindertes Parasiten-Wachstum in β -Thalassaemie-Erythrozyten auf, wenn sich in der Kultur eine hohe Parasitaemie entwickelt hatte. Diese reduzierte Entwicklung könnte auf eine drastische Änderung der Kulturbedingungen (z.B. pH-Wert) durch die Stoffwechselaktivität der inzwischen hochkonzentrierten Parasiten zurückzuführen sein, obwohl ein häufiger Mediumwechsel durchgeführt wurde.

Die festgestellten Unterschiede der Membran-Proteine der Erythrozyten könnten ebenso für das verminderte Parasiten-Wachstum in β -Thalassaemie-Erythrozyten von Bedeutung sein. Die verschiedenen Membran-Proteine sollen weiter untersucht werden, darüberhinaus ist zu klären, ob die abweichende Membran-Proteine in allen Erythrozyten eines β -Thalassaemie Spenders vorkommen oder nur in einem gewissen Prozentsatz zu finden sind. Sollte das letztere der Fall sein, könnte dies eine Erklärung für das unterschiedliche Parasiten-Wachstum in den Langzeitversuchen sein: Erst wenn die Plasmodien sich in den leichter zu invadierenden Erythrozyten entwickelt und diese zerstört hätten, könnten sich bei den nun in der Kultur noch verbliebenen Thalassaemie-Erythrozyten mit anderen Membranzuständen Unterschiede im Parasiten-Wachstum zeigen.

Zusätzlich weisen die Ergebnisse der Kreuzversuche daraufhin, daß Serum-Faktoren eine bisher unterschätzte Rolle bei der Resistenz gegen *P. falciparum*-Malaria spielen könnten.

Alle in-vitro-Studien sind allerdings unzureichend, da sie viele Faktoren nicht erfassen können, die für den gesamten Organismus eine Schutzfunktion gegen *Malaria tropica* haben können. Beispielsweise ist bereits bekannt, daß β -Thalassaemie-Erythrozyten weniger gut verformbar sind als normale Erythrozyten (TILLMANN und SCHRÖTER 1979). Dies könnte für die Resistenz von Bedeutung sein, weil alle Erythrozyten - sowohl die infizierten als auch die nicht infizierten - in der Milz starken Verformungen ausgesetzt sind. Schlechter verformbare Erythrozyten würden hier eher ausgefiltert.

Weitere Untersuchungen über Streßmechanismen, Serum- und Membranfaktoren sind notwendig, um den Selektionsvorteil der heterozygoten β -Thalassaemie in Malaria-Gebieten zu erklären.

Zusammenfassung

(Die Entwicklung von *Plasmodium falciparum* in normalen und in β -Thalassaemie-Erythrozyten).

Es sind verschiedene Modifikationen des Blutsystems bekannt, wie z.B. Haemoglobinopathien, Enzym-Mangel-Krankheiten und die Thalassaemien, die anscheinend einen gewissen Schutz gegen *Plasmodium falciparum*-Malaria gewährleisten. Allerdings ist der eigentliche Schutzmechanismus noch ungeklärt.

Wir haben in-vitro-Studien mit Blut von heterozygoten β -Thalassaemie Spendern durchgeführt. Unter den üblichen Kulturbedingungen konnte nur in einigen wenigen Fällen ein unterschiedliches Parasiten-Wachstum beobachtet werden. Unterschiede in der Parasiten-Entwicklung traten jedoch auf, wenn die Erythrozyten längere Zeit in der Kultur blieben und keine Subkultivierung vorgenommen wurde. Der Einfluß von möglichen hemmenden Faktoren wird diskutiert. Kreuzversuche mit Erythrozyten und Serum von normalen und von β -Thalassaemie-Heterozygoten weisen darauf hin, daß nicht nur die Erythrozyten, sondern auch Serumfaktoren eine Bedeutung für die Entwicklung von *P. falciparum* haben.

Wir haben darüberhinaus Untersuchungen über die Membran-Proteine von heterozygoten β -Thalassaemie-Erythrozyten durchgeführt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Proteinmuster der Membranen von β -Thalassaemie-Erythrozyten und von normalen Erythrozyten verschieden sind. Unterschiede der Membran-Proteine in einigen Erythrozyten könnten wichtig werden, wenn die bevorzugt invadierten Erythrozyten bereits infiziert oder zerstört sind.

Weitere Untersuchungen über Streßmechanismen, Serum- und Membranfaktoren sind notwendig, um den Selektionsvorteil der heterozygoten β -Thalassaemie in Malaria Gebieten zu erklären.

Summary

Development of *Plasmodium falciparum* in Normal and in β -Thalassaemic-Erythrocytes.

Various inherited red-cell modifications are known, including haemoglobinopathies, enzyme deficiencies and the thalassaemic syndromes, which appear to provide protection against *Plasmodium falciparum* malaria. The actual protective mechanism, however, is still a matter of speculation.

We performed culture studies with blood from thalassaemic heterozygotes. Under usual culture conditions differences in parasitic development were only found in a few cases compared to normal erythrocytes. Differences in parasitic development occurred when erythrocytes remained in the culture medium for a longer time without any subcultivation. The influence of some possible inhibitory factors is discussed. Cross experiments with erythrocytes and serum from normal and β -thalassaemic heterozygotes yielded evidence that not only the red blood cells (RBC's) but also serum factors are involved in the development of *P. falciparum*.

Furthermore, we studied the RBC membrane proteins of thalassaemic heterozygotes. It seems quite obvious that the thalassaemic RBC membrane proteins are different from those of normal RBC's. Membrane differences in some of the RBC's may become important when the preferred invaded RBC's are already infected or destroyed.

Further experiments on stress mechanisms, serum and membrane factors are necessary to clarify why β -thalassaemia is a favourable selective factor in malarial environments.

Literatur

- ALLISON, A. C. (1961): Genetic factors in resistance to malaria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 91, 710-721.
- BETKE, K., H., R., MARTI and I. SCHICHT (1959): Estimation of small percentages of foetal hemoglobin. *Nature* 184, 1877-1878.
- CARTWRIGHT, G. E.: *Diagnostic Laboratory Hematology*, 4th edn. p. 155. Gruned & Stratton, New York, 1968.
- DODGE, J. T., C. MITCHELL and D. J. HANAHAN (1963): The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 100, 119-130.
- FAIRBANKS, V. F.: *Thalassemias and Related Disorders*. In: *Hemoglobinopathies and Thalassemias*, ed. by B. C. DECKER, Thieme Verlag, Stuttgart New York 1980, 196-205.
- FRIEDMAN, M. J. (1979): Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. *Nature* 280, 245-247.
- FRIEDMAN, M. J.: Expression of inherited resistance to malaria in culture. In: *Malaria and the Red Cell*, ed. by Ciba Foundation, Pitman, London 1983, 196-205.
- HEMPELMANN, E.: Bilden und Auflösen von Proteinkapseln. In: Radola B. J. (ed) *Elektrophorese Forum* 1982. 111-116.
- HEMPELMANN, E., M. SCHULZE, O. GÖTZE: Free SH-groups are important for the polychromatic staining of proteins with silver nitrate. In: Neuhoff V. (ed) *Electrophoresis*, 328-330 Verlag Chemie, Weinheim, 1984.

- JENSEN, J. B. and W. TRAGER (1979): Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. J. Parasitol. 63, 883-886.
- LAMBROS, L. - and J. P. VANDENBERG (1979): Synchronization of Plasmodium falciparum Erythrocytic Stages in Culture. J. Parasitol. 65, 41-420.
- LUZZATTO, L. (1974): genetic factors in malaria. Bull. WHO 50, 195-202.
- NURSE, G. T. (1979): Iron, the thalassaemia, and malaria. Lancet 1979, 938-940.
- PASVOL, C. und R. J. M. WILSON (1982): The interaction of malaria parasites with red blood cells. Br. Med. Bull. 38, 133-140.
- TILLMANN, W. und W. SCHRÖTER (1979): Rheological Properties of Erythrocytes in Heterozygous and Homozygous β -Thalassaemia. British Journal of Haematology, 401-411.
- TRAGER, W. und J. B. JENSEN (1978): Cultivation of malarial parasites. Nature 273, 621-622.
- WEHNINGER, H. und M. ALEBOUYE (1970): Densitometrische-quantitative Bestimmungen von Hämoglobin A₂ nach Mikrozonon-Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folie. Klinische Wochenschrift 48. 701-703.
- WHO Working Group (1982): Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. Bull WHO 60, 643-660.
- WILLCOX, M., A. BJÖRKMAN und J. BROHULT (1983): Falciparum Malaria and β -Thalassaemia trait in northern Liberia. Ann. trop. Med. Parasitol. 77, 335-347.

ANSCHRIFT DES VERFASSERS:

Dr. R. Kaminsky
Institut für Allgemeine Hygiene
und Tropenhygiene
Windausweg 2

D-3400 Göttingen

ZOBODAT - 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: 1985

Band/Volume: [7](#)

Autor(en)/Author(s): Kaminsky Ronald, Huppach Claudia, Krüger Norbert, Hempelmann Ernst, Bommer Wolfgang

Artikel/Article: [Die Entwicklung von Plasmodium falciparum in normalen und in \$\beta\$ -Thalassaemie-Erythrozyten. 271-277](#)