

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung VII, Tropenmedizin
Schwerpunkt: Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin, Humanparasitologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. P. G. Kremsner

**Entwicklung eines Western-Blot-Verfahrens
zur semiquantitativen Bestimmung der
Antikörperkonzentration gegen den
Malariaimpfstoffkandidat *GMZ2* - ein
MSP3-GLURP-Fusionsprotein**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Marie Adrienne Rupp, geb. Gloger
aus
Stuttgart

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner

2. Berichterstatter: Professor Dr. C.-T. Bock

Abkürzungsverzeichnis

ADCI	antibody-dependent cellular inhibition assay (Antikörperabhängige Hemmung von Zellen)
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
C	konstante Domäne
CCD	Charge-coupled Device (ladungsgekoppeltes Bauteil)
CDC	Center of disease control (amerikanische Gesundheitsbehörde)
dest.	destilliert
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ELISPOT	Enzyme-linked Immunospot Assay (enzymgekoppelter Immunospottest)
Fc	fragment crystallizable (kristallisierbares Fragment)
FCS	Foetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
GLURP	Glutamate Rich Protein (glutamatreiches Protein)
H	heavy chain (schwere Kette)
HRPO	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution (Hanks ausgeglichene Salzlösung)
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
L	light chain (leichte Kette)
LSP	Long Synthetic Protein (langes synthetisches Protein)
MSP3	Merozoite Surface Protein 3 (Merozoitenoberflächenprotein 3)
P.	Plasmodium
PC	Positivkontrolle
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PfPR ₂₋₁₀	durchschnittliche jährliche Parasitenrate von <i>P. falciparum</i> in 2-10jährigen Kindern
PfSPZ	<i>P. falciparum</i> Sporozoit
POD	Peroxidase
RPM	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

σ	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-Page	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
Std.	Standard
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
V	variable Domäne
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
\tilde{x}	Median

Inhaltsverzeichnis

0	Inhaltsverzeichnis	3
1	Einleitung	4
1.1	Malaria	4
1.1.1	Lebenszyklus am Beispiel von <i>P. falciparum</i>	5
1.1.2	Krankheitsbild der <i>Malaria tropica</i>	6
1.1.3	Pathologie der Erkrankung <i>Malaria tropica</i>	7
1.1.4	Erworbene Immunität bei <i>P. falciparum</i>	8
1.1.5	Therapie	8
1.1.6	Bekämpfung und Prophylaxe	9
1.2	Antikörper (Immunglobuline)	11
1.2.1	Aufbau der Antikörper am Beispiel von Immunglobulin G	12
1.2.2	Immunglobulinklassen	13
1.2.3	Immunglobulin G	13
1.3	Antigene	14
1.3.1	<i>Glutamate rich protein (GLURP)</i>	14
1.3.2	<i>Merozoite surface protein 3 (MSP3)</i>	15
1.3.3	<i>GMZ2</i>	15
1.4	Surrogatmarker	16
1.4.1	Kriterien, die ein Surrogatmarker erfüllen sollte	17
1.4.2	Allgemeine Probleme von Surrogatmarkern	18
1.5	Ziel der Doktorarbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial	19
2.1.2	Verwendete Puffer, Gele und Lösungen	24
2.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien	26
2.1.4	Software	28

2.2	Herkunft der Proben	28
2.3	Methoden	29
2.3.1	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	29
2.3.2	<i>Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT)</i>	31
2.3.3	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)</i>	32
2.3.4	<i>Western Blot</i>	33
2.4	Auswertung	34
2.4.1	<i>ELISA</i>	34
2.4.2	<i>ELISPOT</i>	34
2.4.3	<i>Western Blot</i>	34
2.4.4	Statistische Auswertung aller Verfahren	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Beschreibung der Stichprobe	37
3.2	Auswertung des <i>Western Blot</i>	37
3.2.1	Proteinbanden	37
3.2.2	Positivkontrolle	38
3.2.3	Auswahl der Verdünnung	39
3.2.4	Deskriptive Statistik des <i>Western Blot</i>	39
3.2.5	Auswahl des Algorithmus	40
3.2.6	Univariate Varianzanalyse nach Gruppen	43
3.3	Auswertung des <i>ELISA</i>	43
3.3.1	Deskriptive Statistik des <i>ELISA</i>	43
3.3.2	Univariate Varianzanalyse nach Gruppen	44
3.4	Auswertung der Auszählung Ak-sezernierender Zellen mit dem <i>ELISPOT</i>	44
3.4.1	Deskriptive Statistik des <i>ELISPOT</i>	44
3.4.2	Univariate Varianzanalyse nach Gruppen	44
3.5	Vergleich der Ergebnisse des <i>Western Blot</i> mit denen des <i>ELISA</i> und des <i>ELISPOT</i>	45
3.5.1	Vergleich der Daten aller Tage	45
3.5.2	Vergleich der Daten von Tag 84	50
3.5.3	Vergleich der Veränderung über die Zeit	53
4	Diskussion	56
4.1	Vorteile der verschiedenen Methoden	59
4.2	Nachteile der verschiedenen Methoden	59
4.2.1	Mögliche Verbesserungen des <i>Western-Blot</i> -Verfahrens	61

4.3	Ausblick	62
4.4	Schlussfolgerung	62
5	Zusammenfassung	64
	Literaturverzeichnis	65
	Abbildungsverzeichnis	76
	Tabellenverzeichnis	78
	Anhang	79
A	Einleitung	80
A.1	Klinische Studie	80
B	Ergebnisse	82
B.0.1	Deskriptive Statistik des <i>Western Blot</i>	82
B.0.2	Deskriptive Statistik des <i>ELISA</i>	86
B.0.3	Deskriptive Statistik des <i>ELISPOT</i>	86
B.1	Vergleich der Ergebnisse des <i>Western Blot</i> mit denen des <i>ELISA</i> und des <i>ELISPOT</i>	86
B.1.1	Vergleich der Veränderung über die Zeit	86

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Malaria

Malaria ist eine der wichtigsten parasitären Erkrankungen in den Tropen und Subtropen, die 3,3 Milliarden Personen - etwa 50% der Weltbevölkerung - betrifft (1). Im Jahr 2009 erkrankten 225 Millionen Menschen; etwa 781.000 Personen, davon 85% Kinder unter 5 Jahren, erlagen der Krankheit (2). Einhundertundsechs Länder wurden im Jahr 2010 als endemisch eingestuft, von diesen Ländern liegen 43 in Afrika (2) (s. Abb. 1.1).

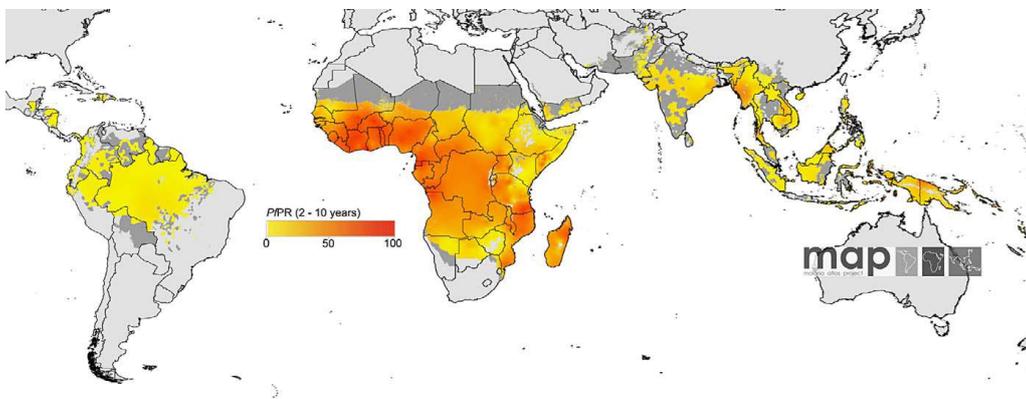


Abbildung 1.1: Die räumliche Verteilung von *P. falciparum* Malaria anhand der durchschnittlichen jährlichen Parasitenrate von *P. falciparum* in 2-10jährigen Kindern (PfPR₂₋₁₀) für das Jahr 2007 in Gebieten mit stabiler Malariaübertragung (3).

Dargestellt als eine kontinuierliche Skala von Gelb nach Rot von 0% bis 100%. Dunkelgraue Gebiete: Instabiles Risiko einer Malariaübertragung (Inzidenz für das Auftreten einer Parasitämie beträgt 0,1/1000 pro Jahr). Hellgraue Gebiete: Kein Risiko einer Übertragung (Inzidenz für das Auftreten einer Parasitämie beträgt 0/1000 pro Jahr)

Die Erkrankung wird durch Plasmodien, einzellige Parasiten der Ordnung *Haemosporida*, hervorgerufen, die durch weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles* als Vektoren von Mensch zu Mensch übertragen werden (4).

Es sind fünf humanpathogene Plasmodienarten bekannt: *Plasmodium (P.) falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi* (5–7). Sie lösen unterschiedliche Krankheitsmanifestationen aus, wobei der Erreger der *Malaria tropica* (*P. falciparum*) die gefährlichste Variante darstellt (5).

1.1.1 Lebenszyklus am Beispiel von *P. falciparum*

Ungeschlechtliche Vermehrung im Menschen

Nach der Inokulation von Sporozoiten in die Haut durch den Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke gelangt der Erreger über die Blutbahn in die Leber des Wirtes (8). Dort dringt er in Hepatozyten ein und bildet eine parasitophore Vakuole (5). In dieser entwickelt sich der Sporozoit zum Schizont weiter, vermehrt sich ungeschlechtlich und bildet Tausende Merozoiten (5). Diese werden je nach Plasmodienart nach ein bis sechs Wochen in die Blutbahn entlassen und dringen dort in rote Blutkörperchen ein. Im Gegensatz zu *P. vivax* und *P. ovale* kann *P. falciparum* keine Form bilden, die in der Leber überdauert (sogenannte Hypnozoiten) (4). Intraerythrozytär vermehrt sich der Erreger weiter, wobei er verschiedene Stadien durchläuft (Ringform, Trophozoit und Schizont) (8). Im letzten intraerythrozytären Stadium werden Merozoiten gebildet, die nach Lyse des Erythrozyten neue rote Blutkörperchen infizieren (9). Die Merozoiten können sich auch zu den Geschlechtsformen, weibliche Makrogameten und männliche Mikrogameten, entwickeln (4) (s. Abb. 1.2 auf S. 6).

Geschlechtliche Vermehrung in der *Anopheles*-Mücke

Werden die Mikro- und Makrogameten von der *Anopheles*-Mücke, dem parasitologischen Hauptwirt, bei einer Blutmahlzeit aufgenommen, reifen sie in deren Mitteldarm zu Gameten (4, 5). Dort vereinigen sie sich zu einem Ookinet, der in die Epithelzellen des Magens eindringt und sich als Oozyste dort ungeschlechtlich vermehrt (8). Schließlich platzt die Oozyste und setzt Tausende Sporozoiten frei (8). Diese gelangen in die Speicheldrüsen der Mücke und bei deren nächster Blutmahlzeit mit dem Speichel in das menschliche Blut (4).

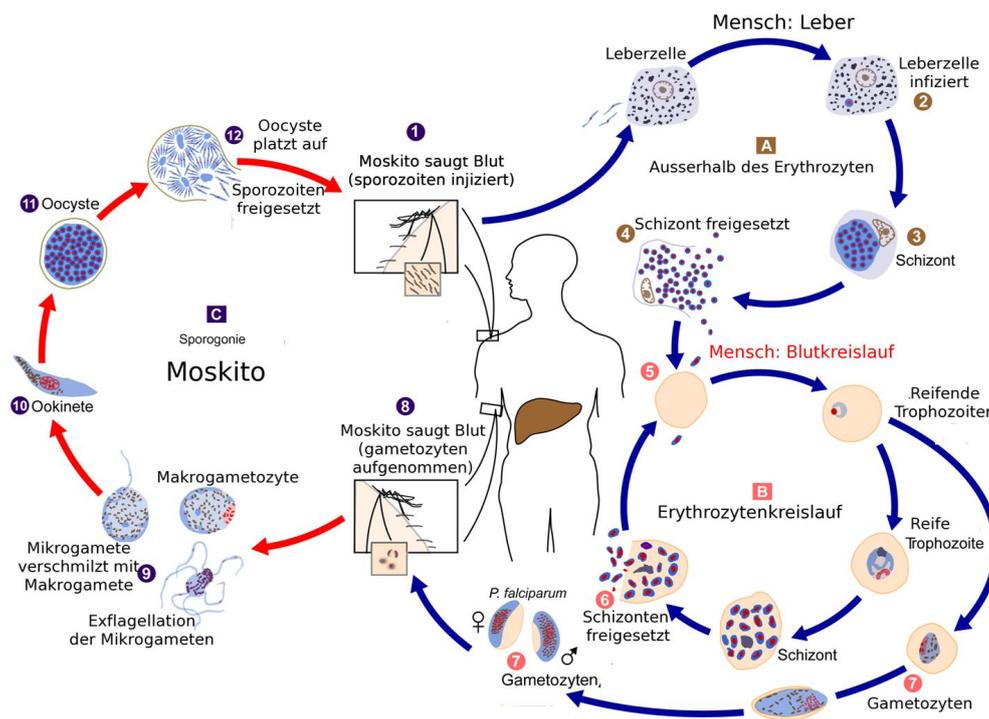


Abbildung 1.2: Lebenszyklus von *P. falciparum* nach Center of Disease Control (CDC)/ Alexander J. da Silva, PhD/Melanie Moser

1.1.2 Krankheitsbild der *Malaria tropica*

Nach einer Inkubationszeit von 8-15 Tagen kommt es typischerweise zu unspezifischen Symptomen wie Fieberschüben, Schüttelfrost, Husten, Luftnot, Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen, wässriger Diarrhoe, Erbrechen und Krämpfen (4, 10). Häufig ist keine Periodizität der Fieberschübe zu erkennen, da die Schizogonie nicht zwingend synchron verläuft und Mehrfachinfektionen vorliegen können (4). Des Weiteren kann eine Hypovolämie auftreten, die zusammen mit der Blutarmut und einer mikrovaskulären Obstruktion zu einer Abnahme der Gewebeversorgung mit Sauerstoff und damit zu einer Laktatazidose führen kann (11). Im weiteren Verlauf kann es zu einem Ikterus, akutem Nierenversagen und einem Lungenödem kommen.

Besonders bei Kindern und Schwangeren kann es zu einem schweren Verlauf der Infektion mit hoher Letalität kommen. Die Komplikationen, die von der WHO 1990 als Kriterien der komplizierten Malaria definiert und 2000 ergänzt wurden (12), sind in Tab. 1.1 auf S. 7 aufgeführt. Von Marsh et al. wurden Indikatoren für eine lebensbedrohliche Malariaerkrankung bei afrikanischen Kindern definiert (13). Diese Kriterien wurden in Spalte 2 der Tabelle 1.1 auf S. 7 mit einem „+“ markiert. Komplikationen, die mit einer

Tabelle 1.1: Komplikationen der *Malaria tropica* nach (12, 13)

Komplikation	Indikator	einer	Assoziation	mit
	lebensbedrohlichen	Malariaerkrankung	erhöhter Todesrate	erhöhter Todesrate
		bei Kindern	bei Kindern	bei Erwachsenen
äußerste Erschöpfung der Körperkräfte (prostration)				
Beeinträchtigung des Bewusstseins	+		+	+
Luftnot	+		+	
mehrere Krampfanfälle				
Kreislaufkollaps				
pulmonales Ödem				+
ungewöhnliche Blutungen				+
Gelbsucht				(+) ¹
Hämoglobinurie				
schwere Anämie			+	

¹ nur in Kombination mit anderen Anhaltspunkten für eine komplizierte Malariaerkrankung

erhöhten Todesrate bei Kindern beziehungsweise Erwachsenen assoziiert sind, wurden in Spalte 3 beziehungsweise 4 mit einem „+“ markiert.

1.1.3 Pathologie der Erkrankung *Malaria tropica*

Es gibt unterschiedliche Hypothesen, wie die Auswirkungen durch eine Infektion mit *P. falciparum* auf den menschlichen Körper zustande kommen. Unter anderem werden als Ursache der Blutarmut der Zerfall der Erythrozyten, eine frühere Auslese in der Milz aufgrund abnehmender Flexibilität der befallenen und nichtbefallenen roten Blutkörperchen sowie die Dyserythropoese diskutiert (14). Infizierte Erythrozyten sollen knötchenförmige Protuberanzen ausbilden, die eine Adhärenz an das Gefäßendothel des Wirtes erleichtern und somit den Abbau in der Milz verhindern (15). Auch komme es zur Aggregation infizierter Erythrozyten vermittelt durch Thrombozyten (16).

Des weiteren wird diskutiert, dass es zu Mikrozirkulationsstörungen im zentralen Nervensystem, im Herzen, in der Lunge, in den Nieren, im subkutanen Gewebe und in der Plazenta kommt (10).

1.1.4 Erworbene Immunität bei *P. falciparum*

Anders als bei Nichtimmunen, die einer Malariainfektion nur die unspezifische Immunabwehr entgegenstellen können (17), kommt es nach wiederholten Plasmodieninfektionen zu einer Semiimmunität bei Personen in hyper- und holoendemischen Malariagebieten (4, 17, 18). Schon 1920 wurden die entscheidenden Charakteristiken dieser erworbenen Immunität beschrieben (18). Sie erfordert ständige Neuinfektionen und klingt bei einem Aufenthalt in nichtendemischen Gebieten ab (4, 17, 18). Semiimmune Personen können zwar an Malaria erkranken, erleiden jedoch keine Komplikationen. An der spezifischen Immunabwehr sind unterschiedliche Mechanismen beteiligt, die ihren Angriffspunkt in verschiedenen Parasitenstadien haben. Passive Transferexperimente haben gezeigt, dass Antikörper (Ak) eine zentrale Rolle spielen (19). Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass diese spezifischen Antikörper zusammen mit zytotoxischen T-Lymphozyten die Invasion von Sporozoiten in die Leber blockieren, Merozoiten gezielt schädigen (4) und die Opsonierung befallener Erythrozyten durch Makrophagen einleiten können (20). Diese noch nicht vollständig verstandene erworbene Immunität (18) ist sehr robust, geht jedoch mit einer beträchtlichen Kindersterblichkeit einher (21).

1.1.5 Therapie

Bei der Therapie der akuten Malariainfektion muss unterschieden werden zwischen der Behandlung der unkomplizierten und der komplizierten Malariaerkrankung (22).

Therapie einer unkomplizierten Malariaerkrankung

Das Ziel der Therapie einer einfachen Malariaerkrankung ist es, die Parasiten aus dem Blut des Erkrankten zu eliminieren, eine schwere Malariaerkrankung zu verhindern und die Übertragung der Infektion auf Andere zu reduzieren (22, 23). Um die Gefahr einer Resistenzentwicklung des Erregers zu vermindern, empfiehlt die WHO eine Kombination unterschiedlicher Therapeutika (22). Dabei ist die sogenannte artemisininbasierte Kombinationstherapie Verfahren erster Wahl.

Therapie einer komplizierten Malariaerkrankung

Das Auftreten einer schweren Malariainfektion muss als Notfall angesehen und als solcher therapiert werden (22). Ziel ist es, den Tod des Erkrankten zu verhindern (22). Durch eine parenterale Medikamentengabe werden möglichst schnell therapeutische Konzentrationen im Blut erreicht, um die Parasitämie effektiv zu senken. Gemäß neuen Erkenntnissen der Aquamat Gruppe sollte Artesunat parenteral gegeben werden, da gezeigt werden konnte, dass unter Artesunat die Mortalitätsrate von Kindern mit komplizierter Malaria

signifikant geringer war als unter einer Quinitherapie (24). Chloroquin wird wegen weit verbreiteter Resistenzen nicht mehr eingesetzt (22).

1.1.6 Bekämpfung und Prophylaxe

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, die Ausbreitung von Malaria zu verhindern oder Personen in Endemiegebieten vor einer Erkrankung zu schützen. Dazu gehören der Schutz vor Moskitostichen und die Reduktion der Krankheitsüberträger, Chemoprophylaxe und Schutzimpfungen (25).

Diese Maßnahmen sind besonders wichtig für gefährdete Bevölkerungsgruppen – im Falle der Malariaerkrankung Kinder, Schwangere und Reisende –, um die Morbiditäts- und Mortalitätsrate in diesen Risikogruppen effektiv zu senken.

Vektorkontrolle

Die wichtigsten Maßnahmen zur Reduktion der Anopheles-Populationen sind der Gebrauch von insektizidimprägnierten Moskitonetzen und das Besprühen von Hausinnenwänden mit Insektiziden (25, 26). Außerdem kann versucht werden, die Anzahl der Brutplätze durch deren Entwässerung zu verringern und die Larven der Anopheles-Mücke gezielt mit Larviziden abzutöten (25).

Als Insektizid wird Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) verwandt, soweit noch keine Resistenzen bestehen. Zur Imprägnierung der Bettnetze ist bisher nur Pyrethroid zugelassen, wobei auch hier Resistenzentwicklungen drohen (26).

Expositionsprophylaxe

Der Gebrauch von Moskitonetzen schützt Individuen vor einer Infektion und der weitverbreitete Gebrauch erhöht das Überleben von Kindern und die Gesundheit (25, 26). Als persönliche Expositionsprophylaxe wird das Tragen heller, langer Kleidung und der Gebrauch von Insektenschutzmitteln empfohlen.

Chemoprophylaxe

Intermittent preventive treatment (IPT): Beim Intermittent preventive treatment handelt es sich um die präventive Gabe einer therapeutischen Dosis eines Malariamedikaments. Diese wird gefährdeten Personen zu bestimmten Zeitpunkten verabreicht ungeachtet der Tatsache, ob eine Infektion vorliegt oder nicht (27).

Klinische Studien haben gezeigt, dass das Intermittent preventive treatment im Kindesalter (IPTi) die Anzahl der Erkrankungen klinischer Malaria und schwerer Anämien

reduzieren kann (28). Auch die Behandlung von Säuglingen kann vor einer klinischen Malariaerkrankung, einer Anämie und der Krankenhauseinweisung aufgrund der Parasitämie schützen (29).

Chemoprophylaxe für Schwangere: Die Infektion einer Schwangeren mit *P. falciparum* hat neben den Krankheitsfolgen für die Schwangere wie einer schweren Anämie und Fieber Auswirkungen auf den Fötus. So kann die Besiedelung der Plazenta durch den Erreger zur Unterernährung des Kindes, Früh- und Totgeburten führen (30).

2004 wurde deshalb das Intermittent preventive treatment für Schwangere (IPTp) mit Sulfadoxin-Pyrimethamin von der WHO in Regionen mit stabiler Transmission empfohlen (31).

Chemoprophylaxe für Reisende: In der Wahl der Chemoprophylaxe für Reisende sollte abgewogen werden zwischen dem Infektionsrisiko und den Risiken durch Nebenwirkungen (32).

Ausblick: Impfung

Schutzimpfungen sind traditionell die billigste und effektivste Maßnahme der Krankheitskontrolle (33, 34). Zur Zulassung eines neuen Impfstoffes erfolgt die immunologische Bewertung anhand dreier Parameter: der Serokonversionsrate, der Seroprotektionsrate und dem Anstieg des mittleren geometrischen Antikörpertiters. Außerdem sollte die Unbedenklichkeit des Impfstoffes in einer repräsentativen Studie dargelegt worden sein. Die wichtigste Anforderung an die Vakzine ist, dass sie nach nicht mehr als drei Impfdosen Schutz über mehrere Jahre bieten sollte (35). Das Besondere bei einer Impfung gegen Malaria ist, dass aufgrund der hohen Inzidenz zusätzlich die Effektivität der Impfung direkt anhand des Rückgangs der Neuerkrankungen bestimmt werden kann. Dies wurde in Impfstudien mit dem am weitesten fortgeschrittenen Impfstoffkandidat RTS,S beispielhaft gezeigt (36).

Bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen Malaria gibt es unterschiedliche Angriffspunkte. Eine Impfung mit Antigenen, die das Plasmodium im Leberstadium erzeugt, reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass eine Person erkrankt. Eine Vakzination gegen das asexuelle Blutstadium des Erregers reduziert die Erkrankungsschwere und die Letalität einer Infektion. Während ein Impfstoff gegen Gametozyten die Verbreitung der Malaria verhindern soll (37).

Außerdem muss bei der Herstellung eines Impfstoffes gegen Malaria unterschieden werden zwischen der Vakzination mit attenuierten Sporozoiten und der Vakzination mit Untereinheiten des Erregers (Subunit-Impfstoff). Schon 1942 wurde von Russel und

Mohan eine Impfung von Hühnern durch inaktivierte Sporozoiten beschrieben (38). Im Jahr 1967 wurden dann von Nussenzweig et al. die ersten erfolgreichen Impfungen von Mäusen mit röntgenbestrahlten *Plasmodium berghei* dokumentiert (39). 2003 wurde die Entwicklung eines Impfstoffes aus metabolisch aktiven, nichtreplizierenden Sporozoiten des *Plasmodiums falciparum* (PfSPZ) von Wissenschaftlern wiederaufgenommen (40). Dies führte in der Zwischenzeit zu einer Phase I-Studie dieses Impfstoffes in den USA (40). Des weiteren arbeiten einige Forschungsgruppen an der Entwicklung genetisch attenuierter Plasmodien als alternativem Impfstoff (41).

Auf Grund der großen Fortschritte in der Sequenzierung des Plasmodiengenoms (42) und in der Herstellung einzelner Antigene sind inzwischen mehrere rekombinante Proteine als Vakzine in der klinischen Erprobung. Es werden einzelne und kombinierte Antigene aus verschiedenen Stadien der Plasmodienentwicklung getestet. Solch ein Subunit-Impfstoff erfordert einen geringeren logistischen Aufwand (26). Der in der Entwicklung am weitesten fortgeschrittene Impfstoff ist das aus einem Sporozoitenprotein gebildete RTS,S (43). Die Wirksamkeit dieses Impfstoffes lag in Phase II-Studien zwischen 30 und 50 Prozent (44, 45) und wird aktuell als erster Impfstoff an einer größeren Gruppe in einer Phase III-Studie weiter untersucht.

Bei der Entwicklung einer Impfung gegen Malaria gibt es jedoch folgende allgemeine Probleme: Es wird eine ineffiziente Induktion von Immunität beobachtet, die auf den bekannten Antigenpolymorphismus, schlechte Immunogenizität einzelner Antigene, das Vermögen des Parasiten mit der Entwicklung der Immunantwort zu interferieren und T- und B-Gedächtniszellen zur Apoptose zu bringen, zurückgeführt werden kann (33). Cohen et al. zeigten 1961 durch Versuche zum passiven Transfer von Antikörpern deren bedeutende Rolle als Schutz vor einer Malariaerkrankung bei Kindern (19). Dennoch ist bisher kein sicheres immunologisches Korrelat für den Schutz gegen Malaria bekannt und es existieren sich widersprechende Publikationen, ob Antikörper, die *in vitro* das Wachstum von Plasmodien hemmen, dies auch *in vivo* tun (46–48).

1.2 Antikörper (Immunglobuline)

Immunglobuline (Ig) kommen im menschlichen Körper in zwei Formen vor. Als B-Zell-Rezeptoren auf der Zelloberfläche reifer B-Lymphozyten und als lösliche Antikörper ohne Transmembrandomäne, gebildet von terminal-differenzierten B-Zellen, den Plasmazellen. Nach ihrer Aktivierung produziert jede dieser Plasmazellen Antikörper einer Spezifität (49). Die Funktion der Immunglobuline ist die Erkennung von Antigenen und das Auslösen immunologischer Effektormechanismen gegen das erkannte Antigen (Ag) (49).

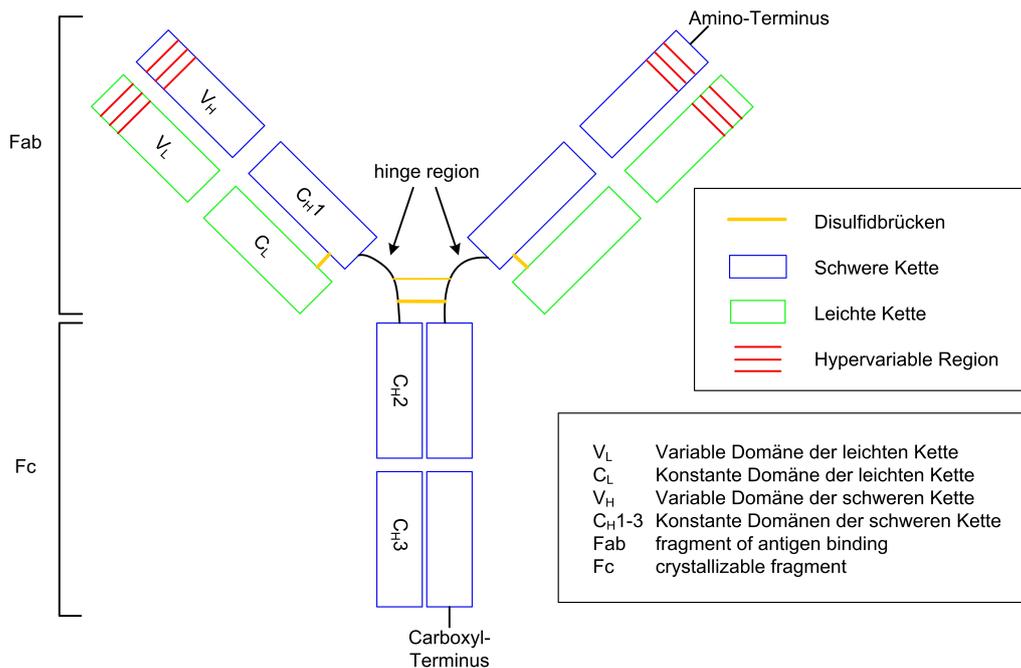


Abbildung 1.3: Aufbau von Immunglobulin G

1.2.1 Aufbau der Antikörper am Beispiel von Immunglobulin G

Immunglobuline sind Glykoproteine, die eine „Y“-Form aufweisen (s. Abb 1.3) (50, 51). Es handelt sich um ein achsensymmetrisches Heterotetramer mit zwei molekular identischen schweren (H = „heavy chain“) und leichten Ketten (L = „light chain“) (51). Durch diese divalente Struktur kann es an zwei identische Strukturen gleichzeitig binden. Disulfidbrücken verknüpfen je eine leichte mit einer schweren Kette und die schweren Ketten kovalent untereinander (52). Die schweren Ketten bestehen aus drei konstanten Domänen (C_{H1-H3} vom aminoterminalen Ende aus durchnummeriert) und einer variablen (V_H), die leichten Ketten aus einer konstanten (C_L) und einer variablen Domäne (V_L) (51). Zwischen der ersten und zweiten konstanten Domäne der schweren Kette befindet sich eine Gelenkstruktur, die sogenannte *hinge region*, die für große räumliche Flexibilität sorgt (53). Sie kann durch Enzyme proteolytisch aufgespalten werden.

Die beiden Arme, auch als Fab (fragment of antigen binding) bezeichnet (51, 54), besitzen innerhalb von V_H und V_L je drei besonders hypervariable Regionen. Sie werden als komplementaritätsdeterminierende Regionen bezeichnet und bilden gemeinsam die Bindungsstelle für das Antigen (55, 56). Die Variabilität wird durch Rekombination der Gene während der Ausdifferenzierung erreicht (57) und führt zu schätzungsweise 10⁶ unterschiedlichen Antikörper-Spezifitäten. Die Antigen-Antikörperbindung kommt durch physikochemische Wechselwirkungen zustande und ist sowohl spezifisch als auch reversibel (49). Sie kann eine sehr hohe Affinität erreichen.

Tabelle 1.2: Immunglobulinklassen (49)

Klasse	C _H -Typ	Form	Vorkommen	Aufgabe
IgA	α	meist Dimer	epitheliale Oberflächen	Neutralisation eindringender Mikroorganismen
IgD	δ	Monomer	Oberfläche von B-Zellen	unbekannt
IgE	ε	Monomer	Mastzellrezeptor	Abwehr multizellulärer Parasiten und allergische Reaktionen vom Soforttyp
IgG	γ	Monomer	Serum und Extrazellulärflüssigkeit	s. Kap. 1.2.3
IgM	μ	Pentamer	B-Zell-Rezeptor naiver B-Zellen	Komplementaktivierung

Der Stamm, auch als Fc (fragment crystallizable) bezeichnet (51, 54), hat eine Effektorfunktion als Bindungsstelle für Komplement und Zellen und dient als Angriffspunkt für den aktiven Transport durch Zellen in unterschiedliche Körperkompartimente (49).

1.2.2 Immunglobulinklassen

Die gebildeten Immunglobuline können in fünf Hauptgruppen unterteilt werden (s. Tab. 1.2). Diese werden charakterisiert durch die konstanten Abschnitte der schweren Ketten (49).

1.2.3 Immunglobulin G

Immunglobuline der Subklasse G (IgG) machen circa 75% der im Serum vorhandenen Antikörper aus (58). Sie sind die einzigen Antikörper, die über einen IgG-Transportrezeptor (FcRn) plazentagängig sind (59). Auch sind IgG die wichtigsten Antikörper zum Schutz vor Malaria (60).

Es wurden vier Subklassen mit unterschiedlichen γ-Ketten gefunden, die nach der im Serum vorhandenen Menge durchnummeriert wurden (IgG1-IgG4), wobei IgG1 die häufigste Subklasse darstellt (58). IgG1 und IgG3 werden als zytophile Antikörper bezeichnet, da sie besser an die Fc-Rezeptoren von Monozyten und Neutrophilen binden (61). Diesen Subtypen wird höchste Wichtigkeit in der erworbenen Immunität gegen Malaria zugerechnet (62, 63).

Funktionen der IgG

Auslösung der Komplementkaskade: Nach der Bindung zweier IgG-Moleküle mit einem Antigen kommt es durch eine leichte Konformationsänderung zu einer spezifischen Bindung mit dem Komplementfaktor C1q. Dadurch wird die Komplementkaskade ausgelöst und die Zielzelle lysiert (64).

Toxinneutralisation: IgG kann durch Bindung an ein Toxin dessen Bindung an zelluläre Rezeptoren hindern und so die biologische Wirkung von Toxinen neutralisieren (65).

Kooperation mit Zellen: Verschiedene Zellen können durch Bindung des IgG an sogenannte Fc-Rezeptoren aktiviert werden. So kann entweder eine Phagozytose ermöglicht oder eine Ausschüttung gespeicherter Mediatoren ausgelöst werden (49, 66, 67).

Inhibition und Apoptoseinduktion: Die Antikörper der Klasse IgG können durch eine Kreuzvernetzung des Rezeptors FcγRIIB mit dem B-Zell-Rezeptor auch eine weitere Aktivierung von B-Zellen und die Mastzelldegranulation inhibieren oder über die Vernetzung zweier FcγRIIB die aktivierte B-Zelle zur Apoptose bringen (68).

1.3 Antigene

Als Antigene werden Stoffe bezeichnet, die an einen spezifischen Antikörper binden können (49). Der Bereich, an den ein Antikörper bindet, wird als Epitop bezeichnet (49).

Im Folgenden werden die Antigene *GLURP* und *MSP3* beschrieben, aus denen das Fusionsprodukt *GMZ2* gebildet wurde.

1.3.1 *Glutamate rich protein (GLURP)*

GLURP ist ein 220 kDa großes, glutamatreiches Protein, das auf dem Chromosom 10 des Plasmodienstammes 3D7 liegt (42, 69, 70). Es besteht aus einer aminoterminalen nichtrepetitiven Region (R0) und zwei Abschnitten repetitiver Sequenzen (R1 und R2) (69) (s. Abb. 1.4 auf S. 15). Die repetitiven Sequenzen des Abschnitts R2 stellen sich als konserviert heraus (69).

Das Antigen wurde elektronenmikroskopisch in der parasitophoren Vakuole von Leber- und intraerythrozytären Schizonten, auf der Oberfläche von Merozoiten und auch im Zytoplasma Gametozyten-haltiger roter Blutkörperchen nachgewiesen (69). Zytophile Antikörper gegen *GLURP* können in Zusammenarbeit mit Monozyten die Invasion und

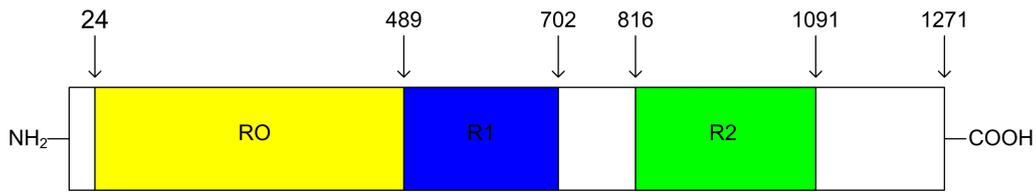


Abbildung 1.4: *GLURP* nach M. Theisen (70)

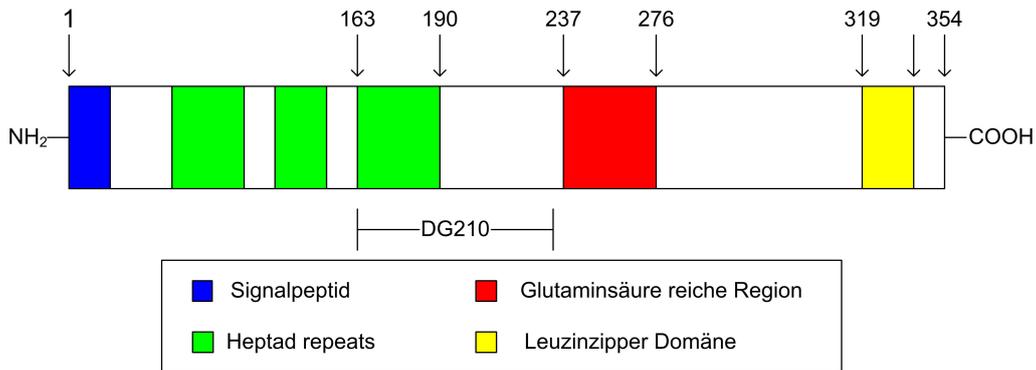


Abbildung 1.5: *MSP3* nach S. Singh (79)

das Wachstum von *P. falciparum in vitro* hemmen (71, 72). Es wurde außerdem gezeigt, dass eine signifikante Korrelation zwischen hohen Anikörpertitern gegen *GLURP* und einem Schutz gegen eine Malaria-Erkrankung besteht (73–75).

1.3.2 *Merozoite surface protein 3 (MSP3)*

Das Merozoitenoberflächenprotein *MSP3* ist etwa 48 kDa groß (76), wird ebenfalls von Chromosom 10 kodiert (42) und spielt vermutlich eine Rolle beim Eindringen der Merozoiten in die Erythrozyten (77) (s. Abb. 1.5). Die Sequenz des Proteins ist stark konserviert, wobei ein Dimorphismus beschrieben wurde (78).

Es wurde *in vitro* gezeigt, dass Antikörper gegen *MSP3* in Kooperation mit Monozyten das Parasitenwachstum hemmen können (antibody-dependent cellular inhibition assay (ADCI)) (80). Diese Resultate wurden durch den Transfer der Antikörper in mit *P. falciparum*-infizierte Mäuse *in vivo* untermauert (46, 79). Auch im Menschen sind Antikörper gegen *MSP3* mit einem klinischen Schutz gegen eine Erkrankung assoziiert (81, 82).

1.3.3 *GMZ2*

GMZ2 ist ein Fusionsprotein von etwa 75 kDa, welches das 5'-Ende des *P. falciparum GLURP* und das 3'-Ende des *P. falciparum MSP3* enthält (s. Abb. 1.6). Als Expressionssystem wurde *Lactococcus lactis* verwandt (83). Im Mäusemodell lief das Fusionsprodukt



Abbildung 1.6: GMZ2 nach M. Theisen (83)

eine stärkere Immunreaktion hervor als eine Kombination der einzelnen Moleküle (83). Die Vakzination von *Saimiri sciureus* Affen mit dem rekombinanten Protein zeigte eine statistisch signifikante Korrelation hoher Antikörpertiter mit einem partiellen Schutz in Form niedriger Parasitämien (84).

1.4 Surrogatmarker

Gemäß der „Biomarker Definitions Working Group“ ist ein Surrogatmarker

ein Biomarker¹, der dazu gedacht ist, einen klinischen Endpunkt zu ersetzen. Von einem Surrogatmarker wird erwartet, einen klinischen Nutzen (oder Schaden oder einen fehlenden Nutzen oder Schaden) vorausszusagen, basierend auf epidemiologischen, therapeutischen, pathophysiologischen oder anderen wissenschaftlichen Belegen. (86)

Ein Surrogatmarker korreliert mit dem klinischen Endpunkt, es muss aber kein kausaler Zusammenhang zwischen dem Surrogatmarker und dem klinischen Endpunkt bestehen. Im besten Fall ist ein Surrogatmarker eine Vorstufe des für den Patienten relevanten klinischen Endpunktes (z.B. der Morbidität/Mortalität) (87).

Beispiel für einen akzeptierten Surrogatmarker ist HbA_{1c}, das zur Überwachung der Blutzuckereinstellung bei Typ 2-Diabetikern verwendet wird (88).

Um einen Surrogatmarker zu validieren, sollten mehrere randomisierte kontrollierte Studien durchgeführt werden, die sowohl den Surrogatmarker als auch den klinischen Endpunkt messen (87, 89). Im Anschluss kann durch ein Regressionsmodell der Anteil des therapeutischen Effekts, der durch den Surrogatmarker erklärt wird, bestimmt werden (89). Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass die Validität eines Surrogatmarkers immer vom Umfeld abhängt (89). Außerdem ist die Validität technologiespezifisch und sollte deshalb nicht auf andere Technologien übertragen werden (87).

¹Per definitionem versteht man unter einem Biomarker dabei eine objektiv messbare Eigenschaft, die als Indikator normaler biologischer oder pathogener Prozesse oder als pharmakologische Antwort auf eine therapeutische Intervention gewertet wird (85)

Gründe für die Verwendung eines Surrogatmarkers

Durch die Einführung eines Surrogatmarkers wird einerseits die Probengröße verringert und der Versuchsaufbau vereinfacht, wenn der Surrogatmarker früher und öfter auftritt oder leichter zu messen ist als der klinisch relevante Endpunkt (89). Dies kann zu einer starken Kostenreduktion (89) führen und die Markteinführung dringend benötigter Medikamente beschleunigen. Auch kann bei vielen vorbeugenden Therapiestrategien der erwünschte Erfolg nicht direkt beobachtet werden, da die abzuwendenden Krankheitsereignisse zu selten auftreten (90) oder wie im Falle der hier untersuchten Studie die Probanden künstlich dem Erkrankungsrisiko ausgesetzt werden müssten.

1.4.1 Kriterien, die ein Surrogatmarker erfüllen sollte

Die Deutsche Agentur für Health Technology hat in ihrem Bericht zu Surrogatendpunkten (87) die wichtigsten Kriterien angeführt, die hier kurz zusammengefasst werden sollen.

Biologische Plausibilität: Experimentelle oder epidemiologische Studien weisen auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Surrogatmarker und klinischem Endpunkt hin. Dabei sollte der Surrogatmarker eine Vorstufe des klinisch relevanten Endpunktes bilden (87).

Ausmaß der Beziehung zwischen Surrogatendpunkt und klinischem Endpunkt: Veränderungen des Surrogatmarkers sollten mit qualitativ und quantitativ parallelen Veränderungen des klinisch relevanten Endpunktes einhergehen. Auch sollte im Rahmen von randomisierten kontrollierten Studien nachgewiesen werden, dass der Surrogatmarker die Auswirkung der Intervention vollständig wiedergibt (87).

Nullhypothesen-Satz von Prentice

Ross L. Prentice definiert in seiner Publikation einen Surrogatmarker außerdem dadurch, dass

ein Surrogatendpunkt eine Reaktionsvariable ist, für die die Prüfung der Nullhypothese, dass keine Beziehung zu den zu vergleichenden Behandlungsgruppen besteht, ebenso eine valide Prüfung der korrespondierenden, auf dem wahren Endpunkt basierenden, Nullhypothese ist (89) (eigene Übersetzung).

1.4.2 Allgemeine Probleme von Surrogatmarkern

Durch die Verwendung eines Surrogatmarkers wird bewusst ein gewisser Messfehler, betreffend den Zeitpunkt oder das Auftreten des klinischen Endpunkts, eingeführt (89). In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass Surrogatmarker trotz eines starken Zusammenhangs mit dem klinischen Endpunkt irreführend sein können. So verhinderten z.B. Antiarrhythmika der Klasse I das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien, erhöhten aber die Mortalität in Studien (87). Auch sollte beachtet werden, dass Surrogatmarker nicht viel über das relevante Ziel der Therapie aussagen und nur einen der möglichen Effekte der Intervention abbilden. Dadurch kann es sowohl zu einer Über- als auch einer Unterschätzung des Effekts der Therapie kommen (87). Letztlich sollte die Korrelation des Markers mit dem klinischen Endpunkt nicht als kausaler Zusammenhang verstanden werden.

1.5 Ziel der Doktorarbeit

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Malaria ist durch das Fehlen eines validen Surrogatmarkers, der den Immunstatus korrekt abbildet, deutlich erschwert (48, 91). In Studien, die am Pasteur Institut in Paris durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass der positive Nachweis von Immunglobulinen in einem *Western Blot* gegen Sporozoitenproteine mit der wachstumsinhibierenden Wirkung des jeweiligen Serums korreliert (46).

In dieser Arbeit soll eine semiquantitative Bestimmung der IgG-Konzentration gegen GMZ2 im Serum von Probanden, die im Rahmen einer Phase-Ia-Studie gegen GMZ2 geimpft wurden, durch eine Messung mit dem *Western-Blot*-Verfahren entwickelt werden. Als Referenzmethoden wurden die etablierten Messverfahren *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* und *Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT)* verwendet.

Die Fragestellung war, ob das *Western-Blot*-Verfahren neue Informationen über die Immunreaktion im Rahmen einer Impfung gegen Malaria liefern kann, wobei folgende Hypothesen formuliert wurden:

Nullhypothese:

Ergebnisse des *Western Blot* entsprechen denen des *ELISA* oder *ELISPOT*.

Alternativhypothese:

Ergebnisse des *Western Blot* entsprechen nicht denen des *ELISA* oder *ELISPOT*.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial

Tabelle 2.1: Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für *ELISA*

Substanz	Summenformel	Produzent/Art.nr.
GMZ2		Henogen, Charleroi, Belgien
γ -Globulin (IgG), Goat Anti-Human, Horseradish Peroxidase (HRPO) conjugate		Caltag TM Laboratories, Invitrogen GmbH, Karlsruhe/H10507
Natriumazid	NaN ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/71290
Naturaflor® Magermilchpulver		Töpfer GmbH, Dietmannsried
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tabletten (0,14 M NaCl, 0,01 M PO ₄ Puffer, 0,003 M KCl, pH 7,45)		GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe/18912014
Polyclonal IgG - Purified		The binding site GmbH, Birmingham, UK/AP004
Schwefelsäure, 95-97%	H ₂ SO ₄	Merck KGaA, Darmstadt/100731

Tabelle 2.1: Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für *ELISA*

Substanz	Summenformel	Produzent/Art.nr.
Semiimmune Seren		aus beendeter Studie, Institut für Tropenmedizin, Tübingen (92)
Tetramethylbenzidin (TMB) ONE, ready-to-use substrate solution	$C_{37}H_{44}N_2O_{13}S$	KEM EN TEC diagnostics, Taastrup, Dänemark/4380L
Tween® 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/63158

Tabelle 2.2: Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für *ELISPOT*

Substanz	Summenformel	Produzent/Art.nr.
Agarose		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/A6013
Albumine bovine fraction V (BSA)		SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg/11924
2-Amino-2-methyl-1-propanol	$(CH_3)_2C(NH_2)CH_2OH$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/A9199
GMZ2		Henogen, Charleroi, Belgien
Biotin-labelled goat anti-human IgG antibody		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/B1140
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat p-Toluidinsalz	$C_8H_6BrClNO_4P \cdot C_7H_9N$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/B8503
Chlorwasserstoff	HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/H7020

Tabelle 2.2: Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für *ELISPOT*

Substanz	Summenformel	Produzent/Art.nr.
CpG - 2006		TIB - MOLBIOL GmbH, Berlin
Dimethylsulfoxid	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/D5879
Foetal Calf Serum (FCS)		PAA laboratories GmbH, Pasching/A15-649
FICOLL-Paque TM PLUS		GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg/17-1440- 02
Goat Anti-Human IgG, gamma chain specific		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/I3382
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)		Invitrogen GmbH, Darmstadt/14170
IL-15, recombinant human		R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
L-glutamine 200 mM		GIBCO®, Invitrogen GmbH, Darmstadt/25030
Magnesiumchlorid	MgCl_2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/M4880
MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM		Invitrogen GmbH, Darmstadt/11140
2-Mercaptoethanol 50 mM	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Invitrogen GmbH, Darmstadt/31350
Natriumpyruvat 100mM	$\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$	Invitrogen GmbH, Darmstadt/11360

Tabelle 2.2: Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für *ELISPOT*

Substanz	Summenformel	Produzent/Art.nr.
Penicillin-Streptomycin-Flüssiglösung (10.000 Einheiten Penicillin; 10.000 µg Streptomycin)		GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe/15140
PBS Tabletten (0,14 M NaCl, 0,01 M PO ₄ Puffer, 0,003 M KCl, pH 7,45)		GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe/18912014
RPMI Media 1640		GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe/31870
Streptavidin-AP conjugate		Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim/11089161001
Triton® X-405		Sciencelab.com, Inc., Houston, USA/SLT3022
Trypanblau (0,4%)	C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/T8154
Tween® 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/63158

Tabelle 2.3: Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für *SDS-Page*

Substanz	Summenformel	Produzent/Art.nr.
30% Acrylamid/Bis-acrylamid	C ₃ H ₅ NO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/A3574
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	H ₈ N ₂ O ₈ S ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/9592
β-Mercaptoethanol	C ₂ H ₆ OS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz/M3148

Tabelle 2.3: Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für *SDS-Page*

Substanz	Summenformel	Produzent/Art.nr.
Bromphenolblau	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/B5525
Glycerin	$C_3H_8O_3$	Merck KGaA, Darmstadt/104093
Sodium dodecylsulfate (SDS) ultrapure	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/4360
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe/2367
TRIS-Puffer	$C_4H_{11}NO_3$	scienova GmbH, Jena/60005

Tabelle 2.4: Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für *Western Blot*

Substanz	Summenformel	Produzent/Art.nr.
Albumine bovine fraction V (BSA)		SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg/11924
GMZ2		Henogen, Charleroi, Belgien
Isopropanol	C_3H_8O	Merck KGaA, Darmstadt/109634
Lumigo Reagent A	$C_8H_7N_3O_2$	Cell signaling technology, Inc., Danvers MA, USA/7003
Methanol	CH_3OH	Merck KgaA, Darmstadt/106009
PBS Tabletten (0,14 M NaCl, 0,01 M PO_4 Puffer, 0,003 M KCl, pH 7,45)		GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe/18912014
Peroxide Reagent B		Cell signaling technology, Inc., Danvers MA, USA/7003

Tabelle 2.4: Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für *Western Blot*

Substanz	Summenformel	Produzent/Art.nr.
Precision Plus Protein Standards Dual Color		Bio-Rad Laboratories GmbH, München/161-0374
Semiimmune Seren		aus beendeter Studie, Institut für Tropenmedizin, Tübingen (92)
Trizma® base	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/T1410
Tween® 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München/63158

2.1.2 Verwendete Puffer, Gele und Lösungen

ELISA

PBS: 1 Tablette auf 500 ml Aqua dest.: 0,14 M NaCl, 0,01 M PO_4 , 0,003 M KCl, pH 7,45

PBST: PBS, 0,1% Tween® 20 (v/v)

Blockpuffer: PBS, 0,1% Tween® 20 (v/v), 3% Milchpulver (g/v)

Verdünnungspuffer: PBS, 0,1% Tween® 20 (v/v), 1% Milchpulver (g/v)

Serum-Verdünnungspuffer: PBS, 0,1% Tween® 20 (v/v), 1% Milchpulver (g/v), 0,02% NaN_3 gelöst (v/v)

Stopplösung: 0,2 M H_2SO_4

ELISPOT

Zellkulturmedium: RPMI, 1% Natriumpyruvat (v/v), 1% MEM non essential Amino Acids (v/v), 1% L-Glutamin 200mM (v/v), 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (v/v), 1% 2-Mercaptoethanol 50mM (v/v), 10% Hitze-inaktiviertes (30 min bei 56°C) fetales Kälberserum (v/v)

Friermedium: 90% FCS (v/v), 10% Dimethylsulfoxid (v/v)

Wasch- und Blockpuffer: PBS, 3% BSA (g/v)

Verdünnungspuffer: PBS, 3% BSA (g/v), 0,5% Tween® 20 (v/v)

AMP-Puffer (1 M): 9,5% 2-Amino-2-methyl-1-propanol (v/v), 0,015% Magnesiumchlorid (g/v), 10% Triton® X-405; Anpassung des pH auf 10,25 mit Chlorwasserstoff;

Sterilisierung durch Filtration

Entwicklungspuffer: 10 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 10 ml AMP-Puffer; 20 min Inkubation bei 65°C; Addition von 2,5 ml geschmolzener Agarose 3% (v/v)

SDS-Page

4× SDS-Page Probenpuffer: 125 mM Trizma base (pH 6,8), 6% SDS (g/v), 30% Glycerin (v/v), 0,2% Bromphenolblau (g/v), 10% β-Mercaptoethanol (v/v)

Sammelgel 5%: 0,33 ml 30% Acrylbisacrylamid, 0,25 ml 1,5 M Tris (pH 6,8), 0,02 ml 10% SDS, 0,02 ml 10% APS, 0,002 ml TEMED auf 1,4 ml Aqua dest.

Trenngel 12%: 4 ml 30% Acrylbisacrylamid, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 0,004 ml TEMED auf 3,3 ml Aqua dest.

1× Laufpuffer: 1% SDS (g/v), 0,3% Tris (g/v), 1,44% Glycin (g/v)

Western Blot

Semidry Transferpuffer: 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10% Methanol (v/v)

Blockpuffer: PBS, 0,1% Tween® 20 (v/v), 4% BSA (g/v)

PBST: PBS, 0,1% Tween® 20 (v/v)

Serum-Verdünnungspuffer: PBS, 0,1% Tween® 20 (v/v), 1% BSA (g/v)

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Material	Produzent
Analysenwaage PM 4000	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Eppendorf Tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Feinwaage AT 260-S DeltaRange	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Glaspipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Multipipette: Costar12-pette	Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande
Pipettierhelfer accu-jet®	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipetten: Labmate TM , L10, L20, L200, L1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht
Vortex Schüttler	neoLab GmbH, Heidelberg
Zentrifuge Biofuge fresco Heraeus	DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, England

ELISA

Material	Produzent
Nunc TM -Immuno Platten MaxiSorp F96	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Nunc TM -Immuno Washer 12	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
ELISA-Schüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Wiesbaden
ELISA-Reader Expert 96 Type G018065	ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Österreich

ELISPOT

Material

Lithium-Heparin-Monovetten

Neubauer Zählkammer

CORNING Costar® 24-Well Cell Culture Plates

CORNING Costar® 96-Well Cell Culture Plates

Produzent

SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht

bioanalytic GmbH, Umkirch/Freiburg

BioExpress, Kaysville, USA/3524

BioExpress, Kaysville, USA/3599

SDS-Page

Material

Comb 2 tooth, 1 mm

Gasket, Casting stand

Glass plates Mini Protean® 3system

Gelkammer Mini Protean IITM

TB1 Thermoblock

Produzent

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen

Western Blot

Material

Graphitelektroden Blue Flash-L

Mini Protean® II multiscreen

Trans-Blot® Transfer Medium pure Nitrocellulose membrane (0,45 µm)

CCD-Kamera

Produzent

SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen

2.1.4 Software

Programm	Produzent
Microsoft® Excel 2002	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Tinn-R Version 1.17.2.4	Rgui, GNU General Public License (http://www.sciviews.org/Tinn-R/)
R Version 2.6.2	The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich (http://www.r-project.org)
ImageJ 1.40g	National Institutes of Health, USA (http://rsb.info.nih.gov/ij/)
JMP® 9.0.0	SAS Institute GmbH, Heidelberg

2.2 Herkunft der Proben

Die Proben stammen aus einer klinischen Studie der Phase Ia zur Sicherheit und immunogenen Aktivität des Impfstoffkandidaten *GMZ2*, eines *GLURP-MSP3*-Fusionsproteins, die von Oktober 2006 bis Dezember 2007 am Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen durchgeführt wurde (92) (Erläuterung klinischer Studien s. Kap. A.1 auf S. 80). Von 57 Probanden wurden 30 in die Studie aufgenommen. Aufnahmekriterien waren vollständige Gesundheit, Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie und keine vorhandene Antikörperreaktion im ELISA auf die Komponenten des Impfstoffkandidaten *MSP3* und *GLURP*. Die Probanden wurden zufällig in drei Gruppen eingeteilt. Die Gruppen erhielten drei Impfungen an den Tagen 0, 28 und 56 mit unterschiedlichen Dosen des Antigens *GMZ2* (Gruppe I: je 10 µg, Gruppe II: je 30 µg und Gruppe III: je 100 µg). Am Tag 0, 28, 56, 84 und 365 wurde den Probanden Blut für Untersuchungszwecke abgenommen. An allen fünf Tagen wurde die Immunglobulinkonzentration im Serum mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* und *Western Blot* gemessen. Am Tag 0, 84 und 365 wurden zusätzlich mononukleäre Zellen des peripheren Blutes konserviert, um mit dem *Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT-Assay)* die Zahl der antikörpersezernierenden Zellen zu bestimmen.

Als Positivkontrolle wurde eine Mischprobe aus Seren von semi-immunen Personen aufgetragen. Mischseren von Europäern, die noch nicht mit Malaria in Kontakt gekom-

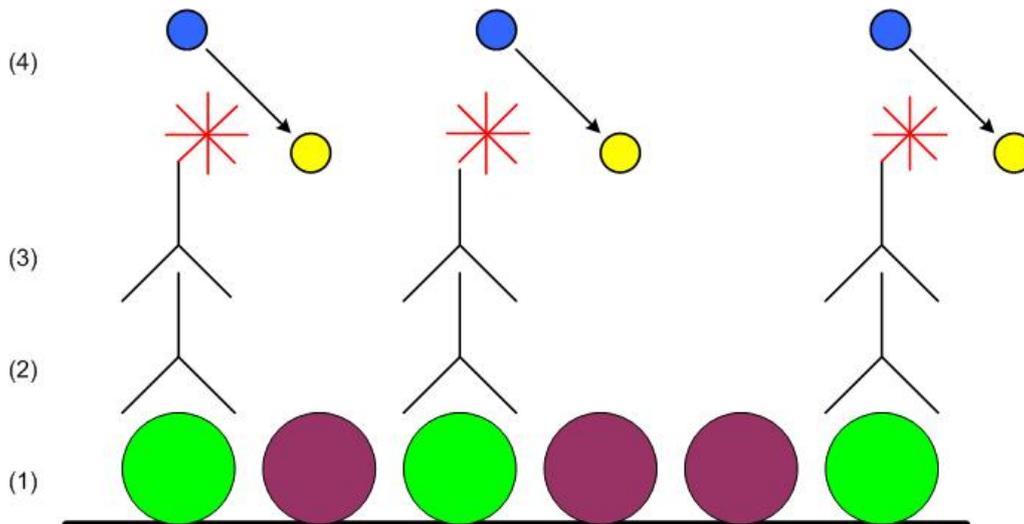


Abbildung 2.1: Prinzip des direkten *ELISA*.

(1) Das Antigen (grün) haftet am Boden des Wells. Freie Plätze werden durch den Blockpuffer (violett) gesperrt. (2) Spezifischer humaner Antikörper bindet an das Antigen. (3) Peroxidase (POD)-markierter antihumaner Antikörper bindet an den humanen Antikörper. (4) POD katalysiert Tetramethylbenzidin, dabei kommt es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb.

men waren und keine Kreuzreaktion gegen das Antigen aufwiesen, wurden als Negativkontrolle verwendet.

2.3 Methoden

2.3.1 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Prinzip des *ELISA*

Der *ELISA* ist ein quantitativer Immunoassay, der in den frühen 1970er-Jahren entwickelt wurde (93, 94). Das Hauptprinzip ist die Bestimmung einer Antigen- oder Antikörperkonzentration anhand des Substratumsatzes eines Markerenzym. Bei der in dieser Arbeit verwendeten direkten Form ist das Antigen an die feste Phase adsorbiert und es wurden antigenspezifische Antikörper bestimmt (s. Abb. 2.1).

Versuchsaufbau

Die Seren wurden 1:200 in Serum-Verdünnungspuffer verdünnt. Nach einem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Protokoll (92) wurde der *ELISA* durchgeführt.

Die Spalten 1 und 2 der Mikrotiterplatte wurden mit einer 1:2-Verdünnungsreihe des gereinigten, polyklonalen IgG als Referenzstandard beladen. Dazu wurden in die Wells je 100 µl des Referenzstandards pipettiert, wobei die Konzentration in der ersten Zeile

1000 ng/ μg in PBS, in der zweiten Zeile 500 ng/ μg etc. betrug. Das Antigen *GMZ2* wurde in PBS verdünnt (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und jedes Well der Spalten 3 bis 12 wurde mit 100 μl gecoatet. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Platten vier Mal mit ca. 200 μl PBST pro Well gewaschen und gut trocken geklopft und anschließend mit 150 μl Blockpuffer pro Well bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Wells wurden vier Mal mit ca. 200 μl PBST gewaschen und trocken geklopft. Anschließend wurden die Platten mit Proben beladen. Dabei wurden je 100 μl gut gemischtes Serum in Serumverdünungspuffer (1:200) aufgetragen und in der nächsten Reihe 1:2 mit Verdünungspuffer verdünnt (100 μl pro Well) (s. Abb. 2.2). Die Spalten mit Standard wurden in diesem Schritt mit je 100 μl Verdünungspuffer gefüllt.

	Je 100 μl Serum VP 1 (1:200)	Je 100 μl Serum VP 2 (1:200)	Etc.			
	Je 100 μl Serum VP 2 (1:400)	Je 100 μl Serum VP 2 (1:400)				
Je 100 μl Verdünungspuffer						

Abbildung 2.2: Pipettier-Schema der Seren für den *ELISA*
VP = Versuchsperson

Die Platten wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Platten vier Mal mit ca. 200 μl PBST pro Well gewaschen und trocken geklopft. An Peroxidase gekoppelter, sekundärer Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:3000 in Verdünungspuffer zugegeben (100 μl pro Well) und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Platten wurden vier Mal mit ca. 200 μl PBST pro Well gewaschen und trocken geklopft. 100 $\mu\text{l}/\text{Well}$ TMB One

wurde zügig auf die Platten pipettiert und diese im Dunkeln inkubiert. Nach genau 20 Minuten wurde die Reaktion mit 100 µl Schwefelsäurelösung pro Well gestoppt und die Absorption der einzelnen Wells im *ELISA*-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Die in der Auswertung verwendeten Daten wurden von der Arbeitsgruppe unter Dr. med. Meral Esen erhoben.

2.3.2 Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT)

Prinzip des ELISPOT

Das Verfahren des *ELISPOT*, das 1983 von Czerkinsky entwickelt wurde (95), ähnelt im Prinzip dem des *ELISA*. Antikörpersezernierende Zellen werden auf Platten gegeben, die mit Antigen gecoatet wurden. Die sezernierten Antikörper können dann nach einer Inkubationsperiode mittels eines enzymmarkierten Antikörpers als Spots auf der Platte detektiert werden. Die Zahl der ermittelten Spots entspricht der Zahl der sezernierenden Zellen.

Versuchsaufbau

Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes: Nach der sterilen Blutentnahme in Lithium-Heparin-Monovetten wurde die Isolation der mononukleären Zellen innerhalb von zwei Stunden vorgenommen.

Zuerst wurde das Blut 1:1 mit auf 37°C erwärmtem HBSS verdünnt. Anschließend wurde die Probe auf 15 ml der auf 4°C gekühlten FICOLL-Lösung geschichtet und für 20 min bei 1250 RPM zentrifugiert. Nachdem ein Teil des Überstands an Plasma verworfen wurde, wurde die Grenzschicht mit den mononukleären Zellen in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit HBSS auf 15 ml aufgefüllt. Nach einer weiteren zehnmütigen Zentrifugation bei 1400 RPM und Raumtemperatur wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen in 10 ml HBSS resuspendiert. Der Anteil an Zellen in 50 µl wurde anschließend in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, die Probe erneut für 10 min bei Raumtemperatur und 1400 RPM zentrifugiert und zuletzt wurden die Zellen bei -150°C in Friermedium aufbewahrt.

Ausdifferenzierung von B-Gedächtniszellen: Zur Weiterverwendung der mononukleären Zellen wurden diese aufgetaut und zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen, bevor sie in einer Konzentration von 10⁶ Zellen pro ml in Zellkulturmedium mit 2,5 µg/ml CpG-Lösung und 10 µg/ml IL-15 resuspendiert wurden. Anschließend wurde eine Zellkulturplatte mit 1 ml/Well der Zellsuspension beladen und für sechs Tage bei 37°C/5% CO₂ inkubiert.

ELISPOT: Das Coating der 96-Well-Platten erfolgte mit drei unterschiedlichen Lösungen (100 µl pro Well):

1. Zum Nachweis der Zellen, die IgG gegen das Antigen *GMZ2* sezernieren, mit dem Antigen in einer Konzentration von 0,5 µg/ml und 5 µg/ml in PBS
2. Als Positivkontrolle mit einer Antikörperlösung des Goat anti-human IgG in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS zum Nachweis aller IgG sezernierenden Zellen
3. Als Negativkontrolle mit PBS

Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag einmal mit 200 µl des Waschpuffers gewaschen und anschließend 30 min bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert. Dann wurden die Platten erneut einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 2×10^5 Zellen beladen und in einer vierfachen 1:2-Verdünnungsreihe mit RPMI verdünnt (je 100 µl pro Well) und drei Stunden bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Wells fünf Mal mit 100 µl des Verdünnungspuffers gewaschen. Der mit Biotin markierte sekundäre Antikörper wurde nun in einer Verdünnung von 1:3000 in Verdünnungspuffer zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden erneut drei Mal mit PBS/0,5% Tween®20 und zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde je Well 100 µl der 1:3000 in PBS verdünnten Streptavidin-alkalischen Phosphatase auf die Platte gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden 100 µl Entwicklungspuffer je Well zugegeben und die Platten 10 min bei 4°C, dann 10 min bei Raumtemperatur und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dann von zwei unabhängigen Personen auf einem stereoskopischen Mikroskop ausgelesen. Die in der Auswertung verwendeten Daten wurden von der Arbeitsgruppe unter Dr. med. Meral Esen erhoben.

2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Das Antigen *GMZ2* und der Dual Color Standard wurden in einem 5%-Sammelgel (g/v) und einem 12%-Trenngel (g/v) aufgetrennt. Die Gele hatten folgendes Volumen:

Sammelgel: 85 mm x 10 mm x 10 mm

Trenngel: 85 mm x 65 mm x 10 mm.

Nach Beginn der Polymerisation durch die Zugabe von 4 µl TEMED wurde das Trenngel sofort zwischen zwei Glasplatten gegossen. Es wurde mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberkante zu erhalten. Das Gel härtete innerhalb von 40 min bei Raumtemperatur aus. Der Alkohol wurde abgegossen, die Glasplatten gut mit Filterpapier getrocknet und das Sammelgel gegossen. 100 µl Antigen wurden mit

33 µl Auftragspuffer versetzt (92,5 µg/ml), 3 min bei 95°C denaturiert und auf das Sammelgel aufgetragen. Bei 50 bis 110 Volt wurde das Protein in 120 min aufgetrennt.

2.3.4 Western Blot

Prinzip des Western Blot

Die durch das SDS-Page-Verfahren nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennten Proteine werden durch den *Western Blot* auf eine Membran übertragen (96, 97). Auf dieser Membran können Antikörper aus Probeseren nichtkovalent an die Antigene binden und mittels eines Peroxidase markierten sekundären Antikörpers sichtbar gemacht werden.

Versuchsaufbau

Der Transfer des Antigens auf die Nitrozellulosemembranen erfolgte mittels des „Semi-dry“-Verfahrens. Zuerst wurden die Graphitelektroden der Blottingapparatur mit dem Transferpuffer befeuchtet. Zwischen die Elektroden wurden zwei Lagen in Transferpuffer getränkten Blotpapiers, darauf ein befeuchtetes Filterpapier, die Nitrozellulosemembran, das Gel, ein befeuchtetes Filterpapier und zwei Lagen getränktes Blotpapier aufgebracht. Bei 1 mA/cm² erfolgte der Transfer innerhalb von 75 min bei Raumtemperatur. Um Gelreste von der Membran zu entfernen, wurde diese anschließend einmal mit PBST gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation der Membran mit dem Blockpuffer bei Raumtemperatur abgesättigt. Der Blot wurde drei Mal mit PBST gewaschen. Anschließend wurde der Blot in den Bio-Rad Multiscreen eingebracht. Die ersten zwei Bahnen wurden mit je 600ml Positivkontrolle (Verdünnung 1:500 und 1:1000) befüllt. Die restlichen Bahnen wurden mit je 600 ml der Seren von Tag 0 bis Tag 365 der Impfstudie (Verdünnung 1:200 und 1:1000) befüllt (s. Abb. 2.3 auf S. 34 und 2.4 auf S. 35) und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Seren mit einer Pipette zur Aufbewahrung entnommen und der Blot einmal im Multiscreen und drei Mal in einer Glasschale mit PBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Verdünnung 1:3000 in PBST, 0,5% BSA (g/v)) wurde eine Stunde mit dem Blot bei Raumtemperatur inkubiert, der Blot drei Mal gewaschen. Je 250 ml der Detektionsreagenzien A und B wurden gemischt und der Blot darin 3 min inkubiert. Mit einer Photokamera wurde in einer Dunkelkammer bei fünfzehnminütiger Belichtungszeit die Reaktion detektiert und als jpeg-Dokument gespeichert.

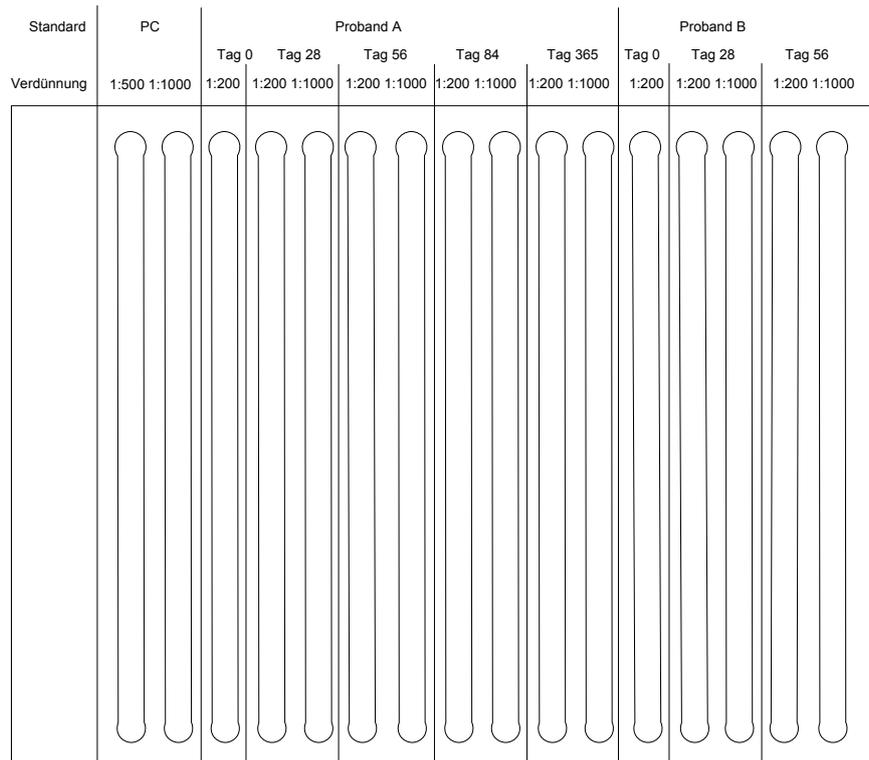


Abbildung 2.3: Schema der Beladung der Membran des *Western Blot* - Blot 1
PC = Positivkontrolle

2.4 Auswertung

2.4.1 ELISA

Die jeweiligen Serum-Antikörperkonzentrationen in der Verdünnung 1:200 wurden mit Hilfe der Standardkurve in $\mu\text{g}/\text{ml}$ berechnet. Zu diesem Zweck wurde mit den Programmen MS Excel, R und Tinn-R gearbeitet. Anschließend wurde zur weiteren Verwendung der Mittelwert aus den doppelten Messungen gebildet.

2.4.2 ELISPOT

Jeder sichtbare Spot entspricht einer antikörpersezernierenden Zelle. Die Spots wurden ausgezählt, der Mittelwert aus dem Doppelansatz gebildet und die Ergebnisse als Spots je 100.000 Zellen präsentiert.

2.4.3 Western Blot

Anhand des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ wurde die Farbtiefe der Proteinbande bei 260 kDa (s. Abb. 3.1 auf S. 38 und Abb. 3.2 auf S. 39) gegen verschiedene Hintergrundinformationen gemessen. Dafür wurde die Bilddatei zuerst invertiert. Anschließend

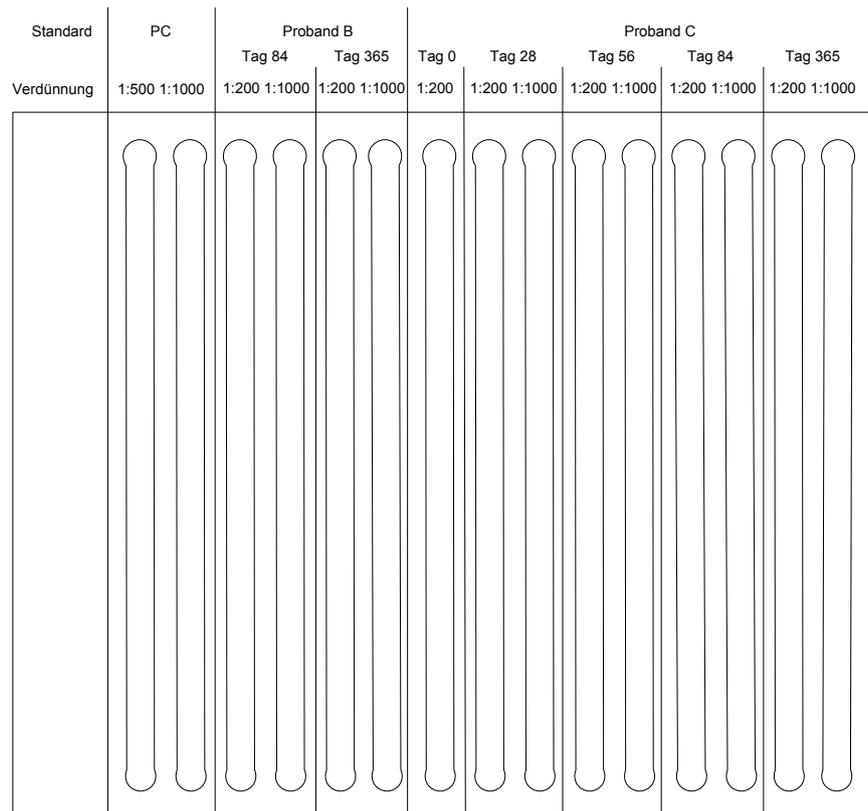


Abbildung 2.4: Schema der Beladung der Membran des *Western Blot* - Blot 2
PC = Positivkontrolle

wurde der homogene Anteil der Bande bei 260 kDa mit einem rechtwinkligen Werkzeug ausgewählt (ca. 3/4 der Bande) und die mittlere Bilddichte bestimmt. Vier unterschiedliche Algorithmen wurden zur Berechnung der mittleren Bilddichte des Hintergrundes gewählt (s. Tab. 2.5 auf S. 36).

Anschließend wurden diese Werte in eine Excel-Datei übertragen und die Differenz der mittleren Bilddichte der Bande (Minuend) und des Hintergrundes (Subtrahend) wurde als Maß für die Immunglobulinkonzentration der Seren berechnet. Falls der Wert der Differenz einen negativen Wert ergab, wurde dieser durch „0“ ersetzt.

2.4.4 Statistische Auswertung aller Verfahren

Die folgenden Berechnungen wurden mit dem Statistik-Programm JMP® durchgeführt. Zunächst wurde für alle drei Methoden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung, das 95%-Konfidenzintervall sowie der Median nach Tagen und Gruppen getrennt bestimmt und das Vorliegen einer Normalverteilung ermittelt. Anschließend wurden die Werte des *Western Blot* mit dem natürlichen Logarithmus logarithmiert, wobei zu allen Werten „1,0“ addiert wurde, um den für diese Rechnung nicht zulässigen Wert „0“ zu eliminieren. Die Auswahl des passenden Berechnungsalgorithmus für die Subtraktion des

Tabelle 2.5: Berechnungsweisen der Algorithmen

Algorithmus 1	Die mittlere Bilddichte des Abschnitts unterhalb der Bande wurde mit einem polygonalen Auswahlwerkzeug bestimmt
Algorithmus 2	Die mittlere Bilddichte des Abschnitts oberhalb der Bande wurde mit einem rechtwinkligen Auswahlwerkzeug bestimmt
Algorithmus 3	Die mittlere Bilddichte des gesamten Blots wurde bestimmt
Algorithmus 4	Die mittlere Bilddichte des gesamten Streifens, auf den das jeweilige Serum einwirkte, wurde bestimmt

Hintergrundes wurde mittels einer Bland-Altman-Analyse der Algorithmen durchgeführt. Anschließend wurde für alle Methoden eine univariate Varianzanalyse nach Gruppen durchgeführt.

Die Werte aller Tage sowie des Tags 84 der verschiedenen Verfahren wurden anhand einer Korrelationsanalyse auf eine statistische Korrelation untersucht. Da davon ausgegangen wurde, dass die Werte des *Western Blot* und des *ELISA* in derselben Maßeinheit gemessen wurden, wurden die Werte des *ELISA* und des *Western Blot* anhand des Bland-Altman-Blots auf Korrelationen überprüft.

Um die Fragestellung zu überprüfen, ob die Verfahren trotz einer möglichen Korrelation der Werte an einzelnen Tagen Unterschiede in der Entwicklung der Immunreaktion über die Zeit anzeigen, wurde eine Korrelation der Veränderung der Werte über die Zeit vorgenommen. Es wurde jeweils ein *r*-Wert sowie das 95%-Konfidenzintervall bestimmt.

Als Signifikanzniveau für alle Untersuchungen wurde $\alpha = 5\%$ gewählt und dieses durch die Anzahl der bestimmten Signifikanzen ($n=60$) geteilt. Somit wurde bei einem Wert $<0,00083$ von einem signifikanten Ergebnis ausgegangen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Stichprobe

Die Stichprobe bestand aus 30 gesunden Probanden, die randomisiert in drei Gruppen à zehn Personen eingeteilt wurden. Das mittlere Alter der 20 Frauen und zehn Männer lag bei 32,1 Jahren (Bereich: 18,6-45,3 Jahre). Je ein Proband der Gruppe II und der Gruppe III standen für die Nachuntersuchung nach einem Jahr nicht mehr zur Verfügung. Ein Proband der Gruppe III bekam aufgrund eines Unfalls nur zwei Impfdosen. Von Gruppe I wurden nur 8 der 10 Seren verwendet.

3.2 Auswertung des Western Blot

3.2.1 Proteinbanden

Alle Probanden zeigten eine deutliche Reaktion der Antikörper gegen das Antigen *GMZ2* bei 260 kDa wie in den Abbildungen 3.1 auf S. 38 und 3.2 auf S. 39 anhand der Probanden 2, 3 und 10 zu sehen ist (schwarzer Pfeil). Zur Bestimmung der Immunglobulinkonzentration wurde deshalb im Folgenden mit der Bilddichte dieser Bande gerechnet.

Manche Probanden zeigten weitere Antikörperbanden gegen Fragmente des Antigens wie beispielhaft in der Abbildung 3.1 auf S. 38 am Beispiel des Probanden 2 (Tag 84 und 365 abgebildet) und des Probanden 3 (alle Tage abgebildet) gezeigt wurde. Es war zu erkennen, dass sowohl Proband 2 als auch Proband 3 am Tag 84 einen Antikörper gegen ein 230 kDa großes Fragment des Antigens *GMZ2* gebildet hatten (weißer Pfeil). Am Tag 84 wurde bei beiden Probanden ebenfalls eine dünnere Bande bei etwa 80 kDa beobachtet (schwarzes Dreieck). Diese Bande war am Tag 84 auch bei Proband 10 in der Abbildung 3.2 auf S. 39 positiv.

Es war insgesamt eine Tendenz zu ersehen, dass an den Tagen, an denen die Probanden eine stärkere Immunreaktion gegen das Antigen *GMZ2* zeigten, auch eher Antikörper gegen Fragmente des Antigens gebildet wurden (s. Abb. 3.1).

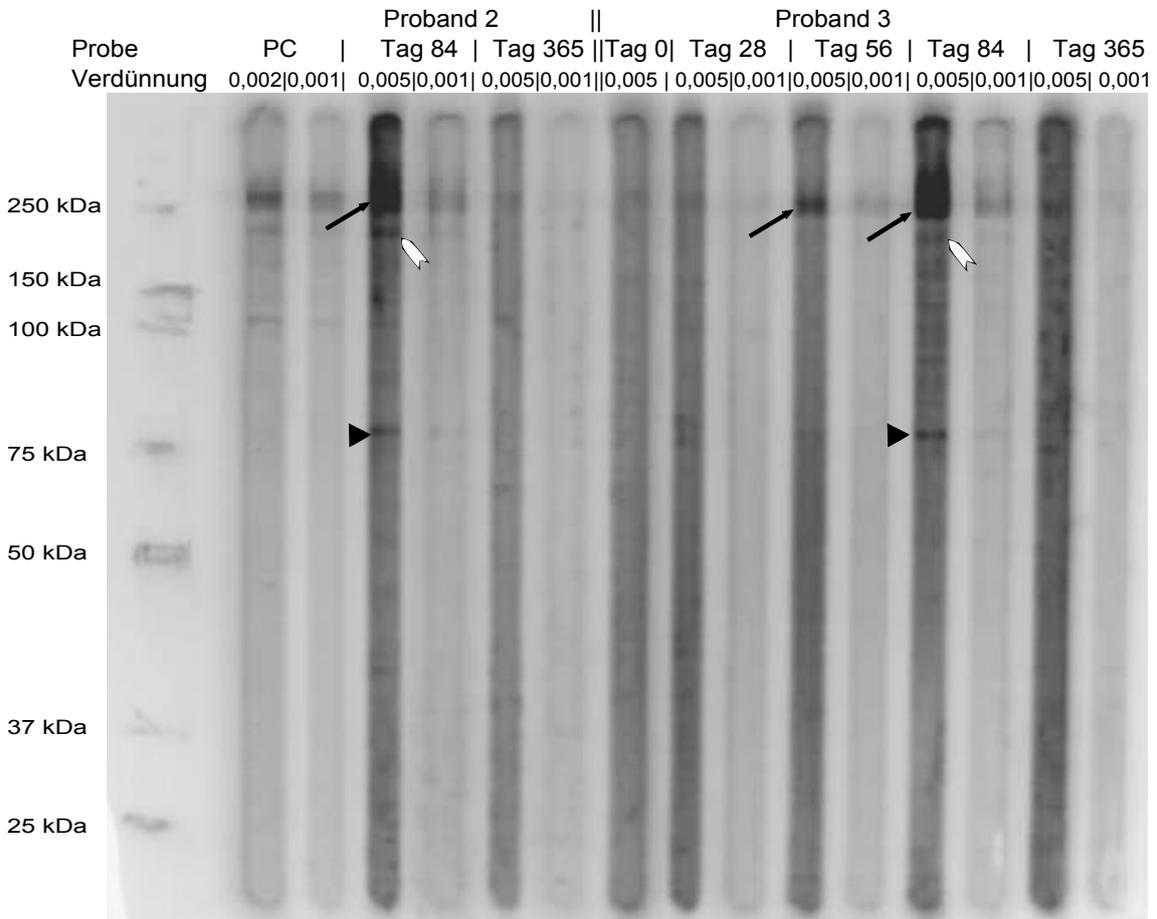


Abbildung 3.1: *Western Blot* der Probanden 2 und 3
PC = Positivkontrolle, kDa = kiloDalton

3.2.2 Positivkontrolle

In drei Messreihen konnte gezeigt werden, dass die gemessene Immunglobulinkonzentration der Positivkontrolle in einer Verdünnungsreihe annähernd linear abfällt (s. Abb. 3.3 auf S. 40).

Deshalb wurde die Positivkontrolle bei den weiteren Messungen innerhalb der Stichprobe in nur zwei Verdünnungen (1:500 und 1:1000) auf jedem Blot mitgeführt.

Da die Proben mancher Patienten auf zwei unterschiedlichen Blots aufgetragen wurden, wurde im Rahmen der Auswertung sowohl der ursprüngliche Wert als auch der Quotient aus dem jeweiligen Wert und der Positivkontrolle in der Verdünnung von 1:500

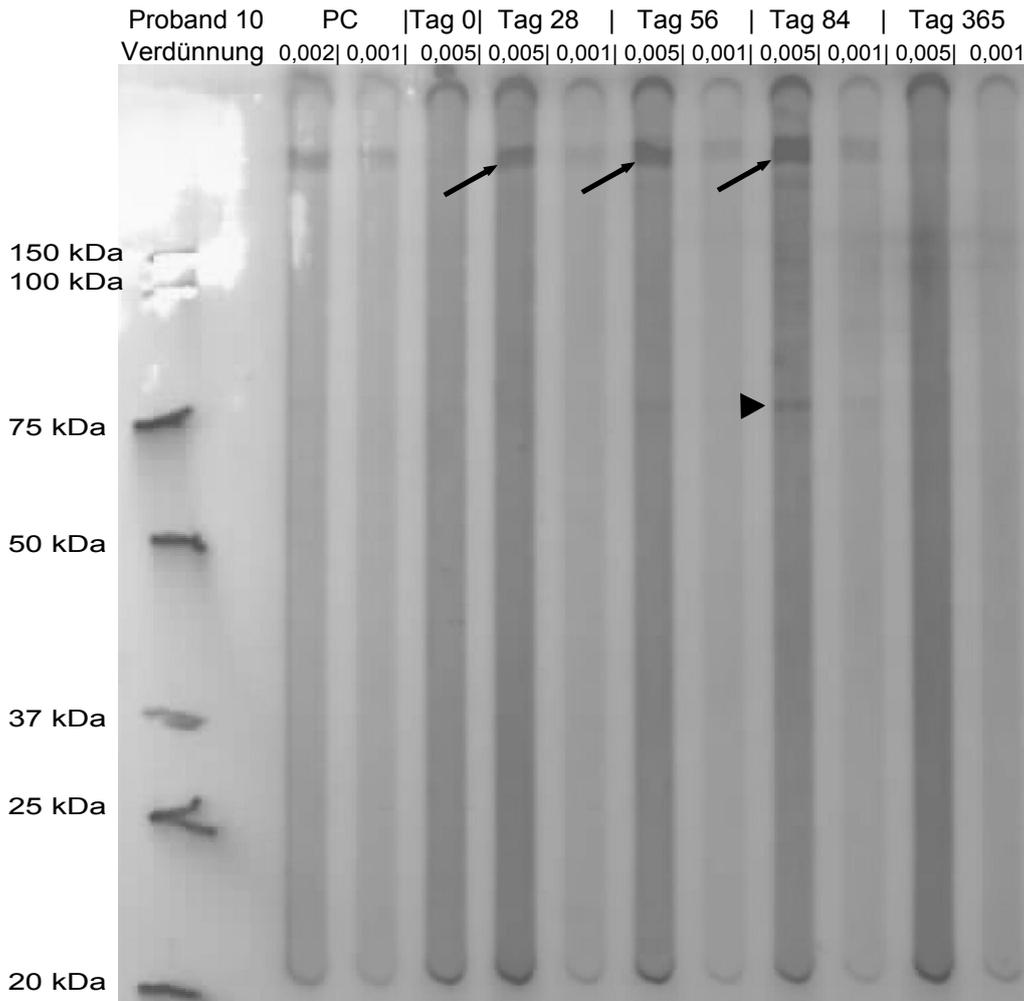


Abbildung 3.2: *Western Blot* des Probanden 10
 PC = Positivkontrolle, kDa = kiloDalton

verwendet. Hierdurch werden mögliche Unterschiede der Intensität zwischen den Blots herausgerechnet.

3.2.3 Auswahl der Verdünnung

Im Rahmen der Entwicklung des *Western Blot* wurden verschiedene Verdünnungen getestet. Eine Verdünnung der Seren von 1:200 ergab für alle Tage gute Ergebnisse. Im weiteren Verlauf wurde mit dieser Verdünnung gearbeitet.

3.2.4 Deskriptive Statistik des *Western Blot*

Für alle vier berechneten Algorithmen (Berechnung der Algorithmen s. Tab. 2.5 auf S. 36) wurden der arithmetische Mittelwert \bar{x} , die Standardabweichung σ , das 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) und der Median \tilde{x} bestimmt (s. Tab. B.1 auf S. 83). Es

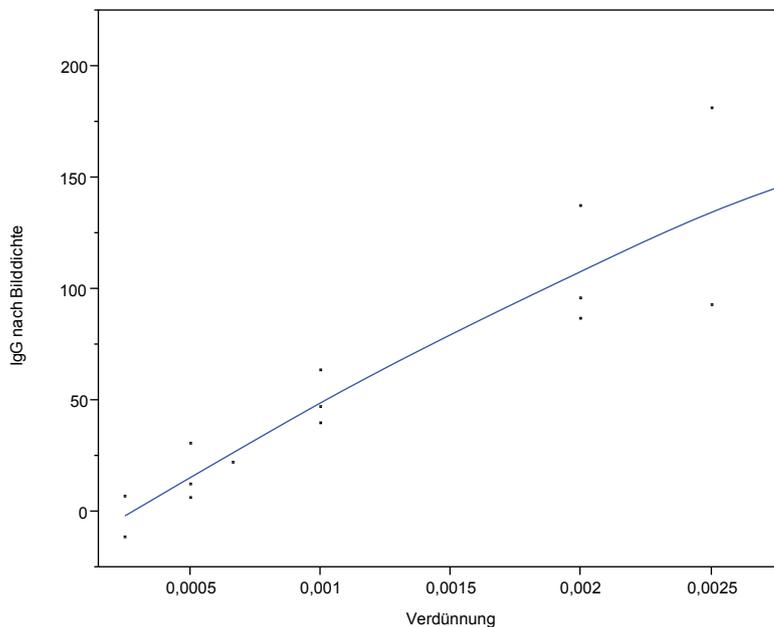


Abbildung 3.3: Verdünnungsserie der Positivkontrolle nach Algorithmus 3
IgG = Immunglobulin

wurde ersichtlich, dass an den Tagen 56 und 84 eine Normalverteilung der Werte für alle Algorithmen angenommen werden konnte wie am Beispiel von Algorithmus 1 und 3 in den Abbildungen 3.4 auf S. 41 und 3.5 auf S. 41 zu erkennen war. Für die Algorithmen 1,2 und 3 konnte auch am Tag 365 eine Normalverteilung angenommen werden (s. Tab. B.1 auf S. 83, Abb. 3.4 auf S. 41 und Abb. 3.5 auf S. 41) und für den Algorithmus 3 auch am Tag 0 (s. Tab. B.1 auf S. 83 und Abb. 3.5 auf S. 41). Durch eine Transformierung der Daten durch Logarithmieren ergab sich hier keine Verbesserung, so dass im folgenden mit den ursprünglichen Daten weitergearbeitet wurde (s. Tab. B.2 auf S. 85).

3.2.5 Auswahl des Algorithmus

Eine Bland-Altman-Analyse wurde verwendet, um das Maß der Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Auswertungsalgorithmen zu bestimmen. An allen Tagen fand sich eine gute Übereinstimmung zwischen Algorithmus 1 und Algorithmus 4 (s. Tab. 3.1 auf S. 43). Aufgrund der Berechnungsweise von Algorithmus 1, der im Gegensatz zum Algorithmus 4 die Bande bei 260 kDa nicht mit einbezieht (s. Tab. 2.5 auf S. 36), wurde für das weitere Vorgehen der Algorithmus 1 herangezogen.

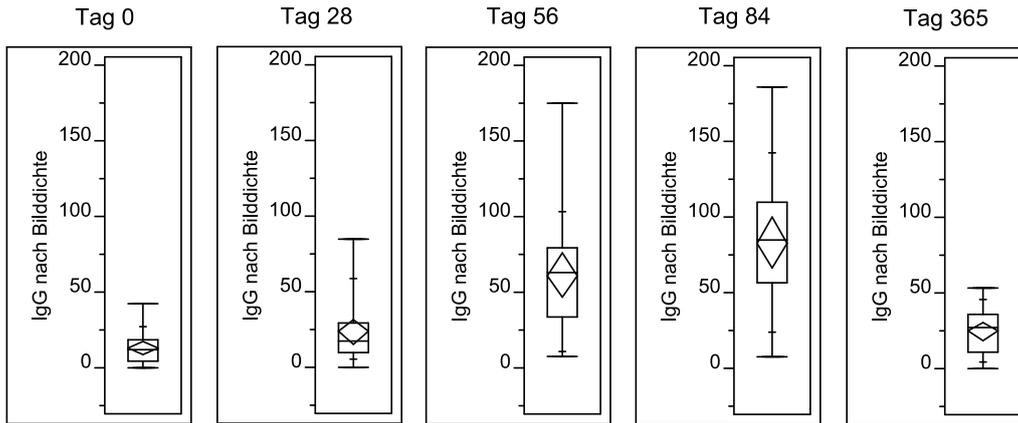


Abbildung 3.4: Box Blots des Algorithmus 1 des *Western Blot*
IgG = Immunglobulin G

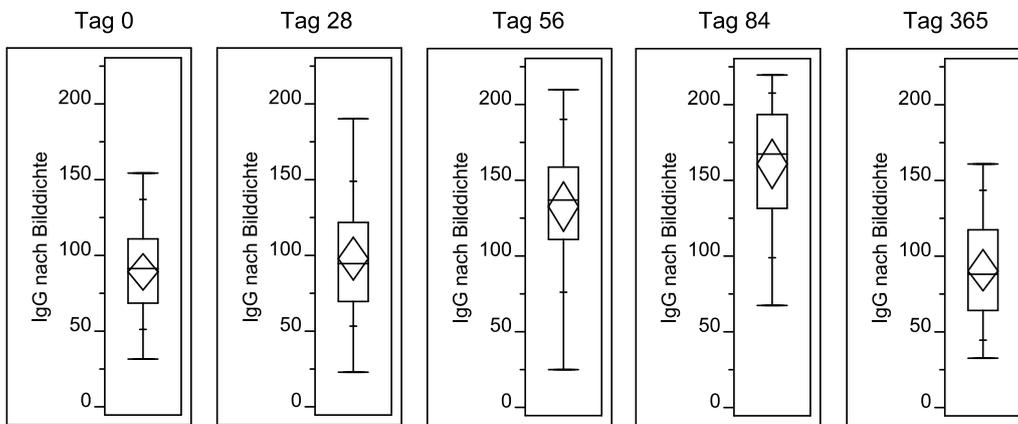


Abbildung 3.5: Box Blots des Algorithmus 3 des *Western Blot*
IgG = Immunglobulin G

Der Auswertungsalgorithmus 2 ergab durch die ähnliche Bildlichte der verwendeten Ausschnitte besonders häufig negative Ergebnisse. Auch ergab der Quotient aus Originalwert und Positivkontrolle häufig extreme Ausreißer (s. Tab. B.1 auf S. 83). Ebenfalls stimmten die Werte an Tag 28, 56 und 84 überwiegend mit Algorithmus 1 und 4 überein (s. Tab. 3.1 auf S. 43). Deshalb wurde Algorithmus 2 nicht weiter verwendet.

Der Auswertungsalgorithmus 3 unterschied sich an allen Tagen am deutlichsten von den anderen Algorithmen und wurde deshalb ebenfalls zur weiteren Analyse verwendet (s. Tab. 3.1 auf S. 43).

Tabelle 3.1: Übereinstimmung der Algorithmen in Bland-Altman-Analyse

verglichene Algorithmen	Tag	Korrelation
1 & 4	0	0,79
	28	0,99
	56	0,99
	84	0,99
	365	0,73
1 & 3	0	0,26
	28	0,64
	56	0,77
	84	0,77
	365	0,16
1 & 2	0	0,44
	28	0,90
	56	0,81
	84	0,89
	365	0,74
2 & 3	0	0,05
	28	0,62
	56	0,64
	84	0,68
	365	0,22

Tabelle 3.1: Übereinstimmung der Algorithmen in Bland-Altman-Analyse

vergichene Algorithmen	Tag	Korrelation
2 & 4	0	0,45
	28	0,89
	56	0,82
	84	0,91
	365	0,51
3 & 4	0	0,26
	28	0,64
	56	0,79
	84	0,76
	365	-0,12

3.2.6 Univariate Varianzanalyse nach Gruppen

In der univariaten Varianzanalyse der Werte des Algorithmus 1 und 3 nach Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied:

Algorithmus 1: $F = 1,351$, Wahrscheinlichkeit $>F = 0,2624$

Algorithmus 3: $F = 1,531$, Wahrscheinlichkeit $>F = 0,22$

3.3 Auswertung des *ELISA*

3.3.1 Deskriptive Statistik des *ELISA*

Es wurden der arithmetische Mittelwert \bar{x} , die Standardabweichung σ , das 95%-Konfidenzintervall und der Median \tilde{x} der Werte des *ELISA* nach Gruppen und Tagen bestimmt (s. Tab. B.3 auf S. 85). Aus den Werten in Tab. B.3 auf S. 85 und den Box-Blots in

Abbildung 3.6 wurde ersichtlich, dass am Tag 84 eine Normalverteilung der Werte für alle Gruppen angenommen werden konnte.

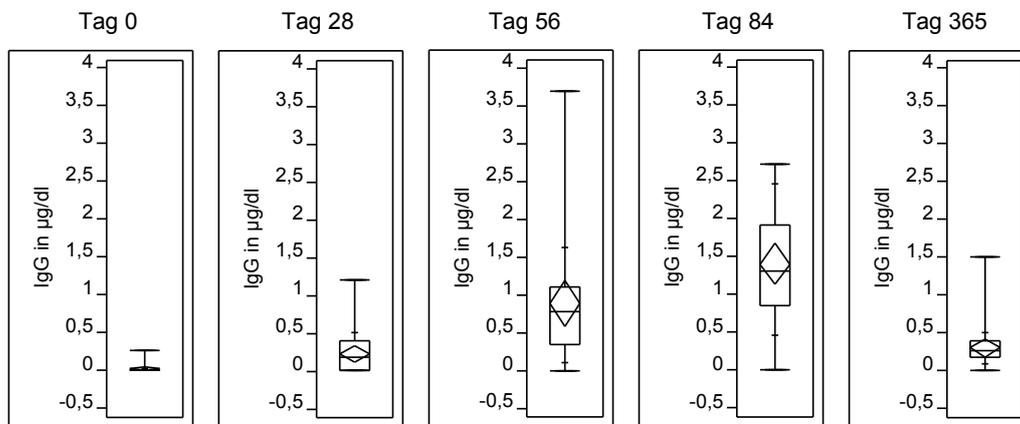


Abbildung 3.6: Box-Blots der Werte des *ELISA*
IgG = Immunglobulin G

3.3.2 Univariate Varianzanalyse nach Gruppen

In der univariaten Varianzanalyse der Werte des *ELISA* nach Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied:

$$F = 0,277, \text{ Wahrscheinlichkeit } > F = 0,7582$$

3.4 Auswertung der Auszählung Ak-sezernierender Zellen mit dem *ELISPOT*

3.4.1 Deskriptive Statistik des *ELISPOT*

Es wurden der arithmetische Mittelwert \bar{x} , die Standardabweichung σ , das 95%-Konfidenzintervall und der Median \tilde{x} der Werte des *ELISPOT* nach Gruppen und Tagen bestimmt (s. Tab. B.4 auf S. 86). Es wurde ersichtlich, dass am Tag 84 eine Normalverteilung der Werte für Gruppe I und Gruppe III und am Tag 365 eine Normalverteilung der Werte für Gruppe II angenommen werden kann (s. Abb. 3.7 auf S. 45).

3.4.2 Univariate Varianzanalyse nach Gruppen

In der univariaten Varianzanalyse der Werte des *ELISPOT* nach Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied:

$$F = 1,668, \text{ Wahrscheinlichkeit } > F = 0,1952$$

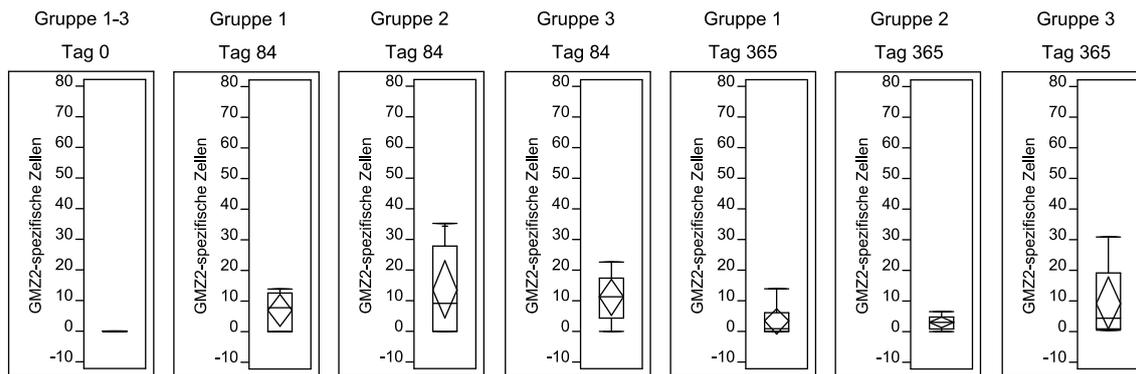


Abbildung 3.7: Box-Blots der Werte des *ELISPOT*
IgG = Immunglobulin G

3.5 Vergleich der Ergebnisse des *Western Blot* mit denen des *ELISA* und des *ELISPOT*

Da die univariate Varianzanalyse der unterschiedlichen Methoden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergab (s. auch Kap. 3.2.6, 3.3.2 und 3.4.2), wurden im Folgenden die Werte aller Gruppen gemeinsam zur weiteren Analyse verwendet.

3.5.1 Vergleich der Daten aller Tage

Mit allen drei Methoden konnte ein deutlicher Anstieg der immunologischen Reaktion der Probanden gezeigt werden (s. Abb. 3.8 auf S. 46 und Abb. 3.9 auf S. 47).

Es wurde nun zuerst überprüft, ob die Ergebnisse der Verfahren miteinander korrelieren. Für diesen Vergleich wurden zunächst die Werte, die an den unterschiedlichen Tagen gemessen wurden, gemeinsam verwendet.

Mittels Bland-Altman-Analyse wurde ein starker signifikanter Zusammenhang des *ELISA* mit dem *Western Blot* bestimmt (s. Tab. 3.2 auf S. 48 und Abb. 3.10a auf S. 47). Die Korrelation des Quotienten aus den *Western-Blot*-Werten und der Positivkontrolle und der Werte des *ELISA* war ähnlich stark und ebenfalls signifikant (s. Tab. 3.3 auf S. 49 und Abb. 3.11 auf S. 50).

Die Korrelation der Werte des *Western Blot* mit denen des *ELISPOT* war geringer aber signifikant (s. Tab. 3.2 auf S. 48 und Abb. 3.10a auf S. 47). Und auch die Korrelation des Quotienten aus den *Western-Blot*-Werten und der Positivkontrolle und der Werte des *ELISPOT* war mittelstark und signifikant (s. Tab. 3.3 auf S. 49 und Abb. 3.11 auf S. 50). Wurde ein Ausreißer – der Wert des Tags 84 des Probanden 30, der im *ELISPOT* einen viel höheren Wert hatte als der Rest – ausgeschlossen, sank die Korrelation von *ELISPOT* und *Western Blot* sowohl für die Originalwerte (s. Tab. 3.2 auf S. 48 und

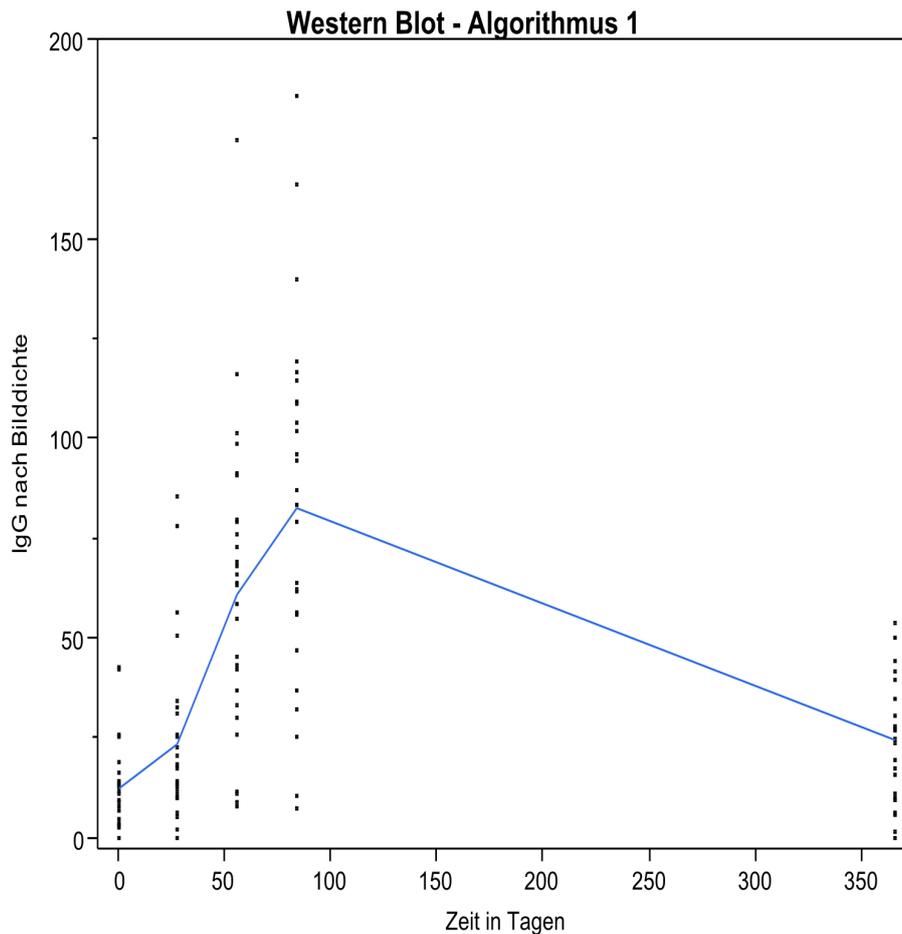


Abbildung 3.8: Immunologische Reaktion über den Zeitraum der Studie gemessen mit dem Algorithmus 1 des *Western Blot*
IgG = Immunglobulin G

Abb. 3.10b auf S. 47) als auch für die Quotienten aus Originalwert und Positivkontrolle (s. Tab. 3.3 auf S. 49). Die Korrelation war jedoch weiterhin signifikant.

Die Korrelation des *ELISA* mit dem *ELISPOT* war ebenfalls mittelstark und signifikant und sank minimal nach dem Ausschluss des Werts von Tag 84 des Probanden 30 aus der Berechnung (s. Tab. 3.2 auf S. 48 und Abb. 3.10 auf S. 47).

Die Korrelation der Algorithmen des *Western Blot* und des *ELISA* sank ebenfalls minimal nach Ausschluss des Werts des Tags 84 des Probanden 30 aus der Berechnung (s. Tab. 3.2 auf S. 48 und Abb. 3.10 auf S. 47).

Tabelle 3.2: Korrelation von Algorithmus 1 und 3 des *Western Blot*, *ELISA* und *ELISPOT*; Berechnung der Korrelation von *Western Blot* und *ELISA* mittels Bland-Altman-Analyse

		Werte aller Probanden			
ohne Ausreißer (Tag 84 des Probanden 30)	Algorithmus 1	-	r = 0,713 95%-KI: -47,21-(-34,33) Wahrscheinlichkeit > t <0,0001*	r = 0,552 95%-KI: 0,38-0,69 p <0,0001*	
	-	Algorithmus 3	r = 0,613 95%-KI: 106,49-121,91 Wahrscheinlichkeit > t <0,0001*	r = 0,426 95%-KI: 0,23-0,59 p <0,0001*	
	r = 0,698 95%-KI: -45,87-(-33,58) Wahrscheinlichkeit > t <0,0001*	r = 0,596 95%-KI: 105,83-121,06 Wahrscheinlichkeit > t <0,0001*	ELISA	r = 0,571 95%-KI: 0,4-0,7 p <0,0001*	
	r = 0,421 95%-KI: 0,22-0,59 p <0,0001*	r = 0,366 95%-KI: 0,16-0,54 p = 0,0008*	r = 0,558 95%-KI: 0,39-0,69 p <0,0001*	ELISPOT	

Tabelle 3.3: Korrelation der Quotienten aus Originalwert und Positivkontrolle des Algorithmus 1 und 3 des *Western Blot*, *ELISA* und *ELISPOT*; Berechnung der Korrelation von *Western Blot* und *ELISA* mittels Bland-Altman-Analyse

		Werte aller Probanden			
ohne Ausreißer (Tag 84 des Probanden 30)	Quotient des Algorithmus 1	-	$r = 0,722$ 95%-KI: -0,51-(-0,29) Wahrscheinlichkeit $> t < 0,0001^*$	$r = 0,526$ 95%-KI: 0,35-0,67 $p < 0,0001^*$	
	-	Quotient Algorithmus 3	$r = 0,607$ 95%-KI: -1,31-(-1,09) Wahrscheinlichkeit $> t < 0,0001^*$	$r = 0,4997$ 95%-KI: 0,32-0,65 $p < 0,0001^*$	
	$r = 0,709$ 95%-KI: -0,5-(-0,29) Wahrscheinlichkeit $> t < 0,0001^*$	$r = 0,593$ 95%-KI: -1,31-(-1,09) Wahrscheinlichkeit $> t < 0,0001^*$	ELISA	$r = 0,571$ 95%-KI: 0,4-0,7 $p < 0,0001^*$	
	$r = 0,465$ 95%-KI: 0,27-0,62 $p < 0,0001^*$	$r = 0,483$ 95%-KI: 0,3-0,63 $p = 0,0008^*$	$r = 0,558$ 95%-KI: 0,39-0,69 $p < 0,0001^*$	ELISPOT	

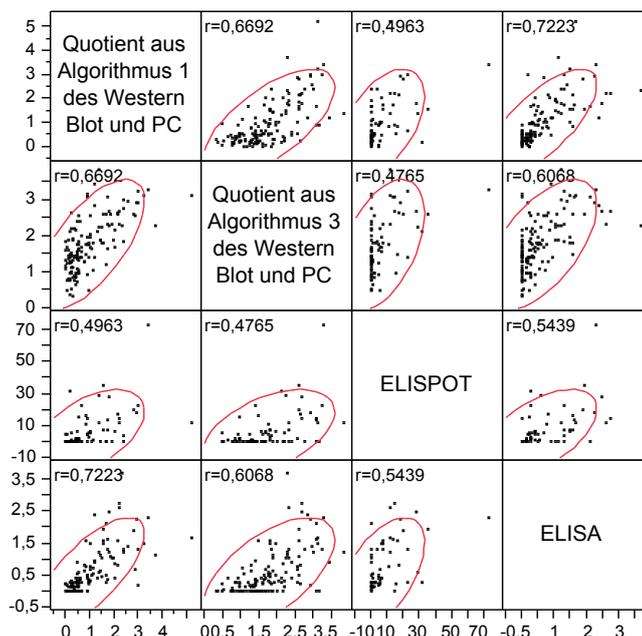


Abbildung 3.11: Korrelation der Methoden nach Bildung eines Quotienten aus den Werten des *Western Blot* und der Positivkontrolle
PC = Positivkontrolle

3.5.2 Vergleich der Daten von Tag 84

Die Werte am Tag 84 wurden für einen weiteren Vergleich herangezogen, da sie für alle drei Methoden (außer Gruppe 2 im *ELISPOT*) normal verteilt waren und die Probanden an diesem Tag nach den erhaltenen drei Impfungen die stärkste Immunreaktion zeigten.

Ein Vergleich der Daten des *Western Blot* mit denen des *ELISPOT* ergab dabei einen mäßigen nicht signifikanten Zusammenhang für den Algorithmus 1 und keinen Zusammenhang für den Algorithmus 3 (s. Tab. 3.4 auf S. 51). Vergleich man die Quotienten der Algorithmen mit dem *ELISPOT*, wurden mäßig starke, nicht signifikante Zusammenhänge beobachtet (s. Tab. 3.5 auf S. 52). Wurde wiederum der Ausreißer, Proband 30, ausgeschlossen, war zwischen *ELISPOT* und beiden Algorithmen kein signifikanter Zusammenhang mehr erkennbar (s. Tab. 3.4 auf S. 51). Wurde dieselbe Berechnung mit den Quotienten aus dem Originalwert und der Positivkontrolle durchgeführt, stieg zwar der Zusammenhang, aber das Ergebnis war weiterhin nicht signifikant (s. Tab. 3.5 auf S. 52).

Die lineare Korrelation des *ELISA* mit dem *ELISPOT* ergab eine mittlere nicht signifikante Korrelation, die ebenfalls nach Ausschluss von Proband 30 aus der Analyse sank (s. Tab. 3.4 auf S. 51).

Tabelle 3.4: Korrelation von Algorithmus 1 und 3 des *Western Blot*, *ELISA* und *ELISPOT* am Tag 84; Berechnung der Korrelation von *Western Blot* und *ELISA* mittels Bland-Altman-Analyse

		Werte aller Probanden			
ohne Ausreißer (Tag 84 des Probanden 30)	Algorithmus 1	-	r = 0,451 95%-KI: 65 - 98,06 Wahrscheinlichkeit > t < 0,0001*	r = 0,411 95%-KI: 0,05-0,68 p = 0,0298	
	-	Algorithmus 3	r = 0,438 95%-KI: 143,29 - 175,53 Wahrscheinlichkeit > t < 0,0001*	r = 0,275 95%-KI: 0,11-0,59 p = 0,1563	
	r = 0,393 95%-KI: 62,55-92,91 Wahrscheinlichkeit > t < 0,0001*	r = 0,397 95%-KI: 141,13-173,37 Wahrscheinlichkeit > t < 0,0001*	ELISA	r = 0,426 95%-KI: 0,06-0,69 p = 0,0249	
	r = 0,086 95%-KI: -0,3-0,45 p = 0,6715	r = 0,101 95%-KI: -0,29-0,46 p = 0,6157	r = 0,385 95%-KI: 0,01-0,67 p = 0,0474	ELISPOT	

In der Bland-Altman-Analyse wurde am Tag 84 ein mittlerer signifikanter Zusammenhang zwischen *ELISA* und Algorithmus 1 des *Western Blot* beobachtet und ein etwas schwächerer signifikanter Zusammenhang zwischen *ELISA* und Algorithmus 3 (s. Tab. 3.4 auf S. 51).

Der Zusammenhang stieg noch, wenn die Quotienten der Algorithmen aus Originalwert und Positivkontrolle betrachtet wurden (s. Tab. 3.5 auf S. 52 und Abb. 3.12 auf S. 53). Jedoch war dann der Zusammenhang zwischen dem *ELISA* und dem Quotient des Algorithmus 1 nicht mehr signifikant.

Nach Ausschluss des Probanden 30 aus der Analyse sank die Korrelation zwischen *Western Blot* und *ELISA* leicht, die Signifikanz blieb gleich (s. Tab. 3.4 auf S. 51 und Tab. 3.5 auf S. 52).

Tabelle 3.5: Korrelation der Quotienten aus Algorithmus 1 und 3 des *Western Blot* und Positivkontrolle, *ELISA* und *ELISPOT* am Tag 84; Berechnung der Korrelation von *Western Blot* und *ELISA* mittels Bland-Altman-Analyse

		Werte aller Probanden			
ohne Ausreißer (Tag 84 des Probanden 30)	Quotient des Algorithmus 1	-	$r = 0,547$ 95%-KI: -0,77 - (-0,07) Wahrscheinlichkeit $> t = 0,02$	$r = 0,387$ 95%-KI: -0,02-0,66 $p = 0,0419$	
	-	Quotient des Algorithmus 3	$r = 0,499$ 95%-KI: -1,26 - (-0,72) Wahrscheinlichkeit $> t < 0,0001^*$	$r = 0,409$ 95%-KI: -0,04-0,68 $p = 0,0305$	
	$r = 0,512$ 95%-KI: -0,75-(-0,04) Wahrscheinlichkeit $> t 0,0324$	$r = 0,466$ 95%-KI: -1,27-(-0,71) Wahrscheinlichkeit $> t < 0,0001^*$	ELISA	$r = 0,426$ 95%-KI: 0,06-0,69 $p = 0,0249$	
	$r = 0,261$ 95%-KI: -0,13-0,58 $p = 0,1894$	$r = 0,344$ 95%-KI: -0,04-0,64 $p = 0,0794$	$r = 0,385$ 95%-KI: 0,01-0,67 $p = 0,0474$	ELISPOT	

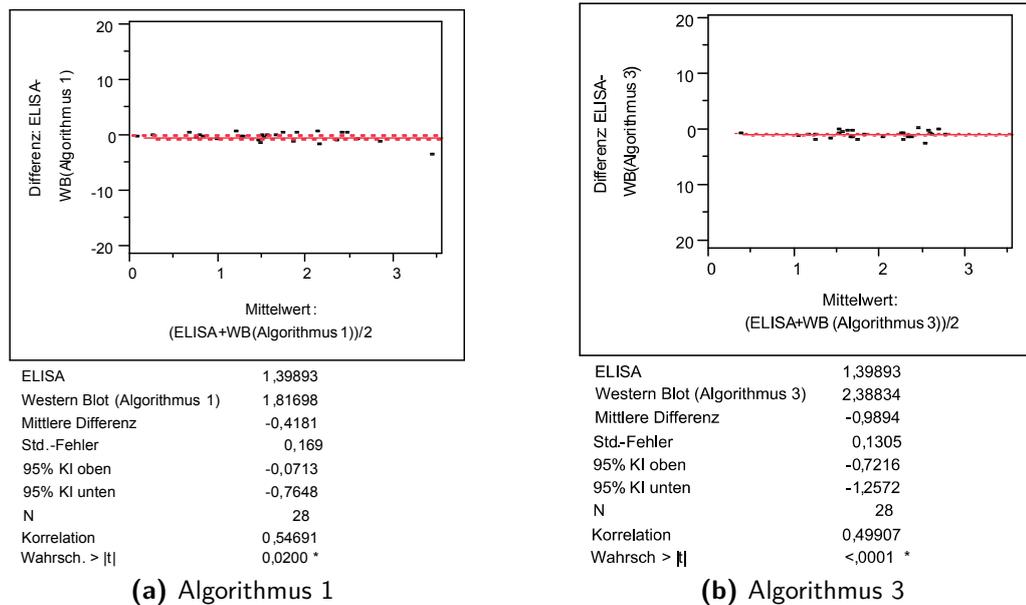


Abbildung 3.12: Bland-Altman-Analyse der Werte des *ELISA* mit denen des *Western Blot* am Tag 84 bestimmt mit dem:

- a) Quotient aus Algorithmus 1 und Positivkontrolle,
- b) Quotient aus Algorithmus 3 und Positivkontrolle

WB = Western Blot, Std. = Standard, Wahrsch. = Wahrscheinlichkeit

3.5.3 Vergleich der Veränderung über die Zeit

Um die Messung der Veränderung der Immunreaktion über die Zeit anhand der unterschiedlichen Methoden zu vergleichen, wurde die Differenz der Werte zwischen den Tagen bestimmt. Weiterhin wurden diese Differenzen jeweils durch den Wert am Tag 84 geteilt und dadurch Prozentangaben der Veränderung errechnet.

Bei der paarweisen Korrelation fiel auf, dass die Veränderung im Algorithmus 1 des *Western Blot* zwei Mal stark bis sehr stark und einmal auch signifikant mit der im *ELISA* korrelierte, zwei Mal mäßig und nicht signifikant und ein Mal nicht korrelierte (s. Tab. 3.6 auf S. 54). Die Berechnung der Korrelation der Veränderung vom Tag 0 auf den Tag 84 und vom Tag 84 auf den Tag 365 wurde erneut ohne den Probanden 25 durchgeführt, da sich dieser in einer Jackknife-Ausreißeranalyse deutlich von den übrigen Werten unterschied. Dadurch sank die Korrelation des *Western Blot* mit dem *ELISA* für diese Daten auf mittelstarke, nicht signifikante Werte (s. Tab. 3.6 auf S. 54).

Ähnliche Korrelationen erhielt man beim Vergleich des *ELISA* mit den Werten des Quotienten aus Algorithmus 1 und Positivkontrolle und eine etwas schwächere Korrelation des *ELISA* mit den Quotienten aus Algorithmus 3 und Positivkontrolle (s. Tab. B.6 auf S. 87 und Tab. B.7 auf S. 87). Die Korrelation des Algorithmus 3 mit dem *ELISA*

Tabelle 3.6: Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit.
Vergleich des Algorithmus 1 des *Western Blot* mit dem *ELISA*

	r	95%-KI	p
Differenz Tag 28 - Tag 0	-0,0521	-0,43-0,34	0,8005
Differenz Tag 56 - Tag 28	0,4242	0,05-0,69	0,0274
Differenz Tag 84 - Tag 56	0,4404	0,07-0,7	0,0215
Differenz Tag 84 - Tag 365	0,571	0,23-0,79	0,0029
Differenz Tag 84 - Tag 365 ohne Proband 25	0,4737	0,09-0,74	0,0194
Differenz Tag 84 - Tag 0	0,857	0,7-0,93	<0,0001*
Differenz Tag 84 - Tag 0 ohne Proband 25	0,4721	0,1-0,73	0,0172

schloss außer bei der Differenz der Tage 84 und 365 im 95%-Konfidenzintervall die '0' mit ein (s. Tab. B.5 auf S. 86).

Die Korrelation des *ELISA* und des *Western Blot* mit dem *ELISPOT* konnte nur für die Differenz zwischen Tag 84 und 365 bestimmt werden, da der *ELISPOT* nur am Tag 0, 84 und 365 durchgeführt wurde und im *ELISPOT* am Tag 0 für alle Probanden der Wert '0' gemessen wurde.

Dabei wurde ersichtlich, dass die Veränderung der Werte von Tag 84 auf Tag 365 im *ELISA* zwar deutlich aber nicht signifikant mit dem *ELISPOT* korrelierte. Bei erneutem Ausschluss des Probanden 25, war keine Korrelation mehr zu erkennen (s. Tab. 3.7 auf S. 55). Im Vergleich des Algorithmus 1 des *Western Blot* mit dem *ELISPOT* war die Korrelation mit und ohne den Probanden 25 mittelstark aber nicht signifikant (s. Tab. 3.7 auf S. 55). Auffällig war hierbei jedoch, dass die Korrelation bei der Berechnung ohne den Probanden 25 stieg. Die Korrelation des Algorithmus 3 des *Western Blot* mit dem *ELISPOT* war etwas geringer und ebenfalls nicht signifikant. In der Berechnung ohne den Probanden 25 sank die Korrelation weiter und schloss im 95%-Konfidenzintervall die '0' mit ein (s. Tab. B.8 auf S. 88).

Es fiel auf, dass die Korrelation der Quotienten aus Originalwert und Positivkontrolle mit dem *ELISA* und dem *ELISPOT* im Vergleich der Veränderung von Tag 84 auf Tag 365 dieselben Werte ergab wie die Analyse der Originaldaten des *Western Blot* (s. Tab. B.8 auf S. 88).

Tabelle 3.7: Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich des *ELISPOT* mit dem Algorithmus 1 des *Western Blot* und dem *ELISA*

Korrelation des <i>ELISPOT</i> mit dem Algorithmus 1 des <i>Western Blot</i>			
	r	95%-KI	p
Differenz Tag 84 - Tag 365	0,532	0,1-0,79	0,019
Differenz Tag 84 - Tag 365 ohne Proband 25	0,5812	0,16-0,82	0,0114
Korrelation des <i>ELISPOT</i> mit dem <i>ELISA</i>			
	r	95%-KI	p
Differenz Tag 84 - Tag 365	0,656	0,29-0,86	0,0023
Differenz Tag 84 - Tag 365 ohne Proband 25	0,1653	-0,33-0,59	0,5122

Kapitel 4

Diskussion

Das *Western-Blot*-Verfahren ist bei vielen Erkrankungen wie der Lyme-Borreliose, AIDS und Syphilis als qualitativer Bestätigungstest des *ELISA* etabliert (98–100).

Auch in der Immundiagnostik der Malariaerkrankung wurden bisher nur qualitative Antikörperbestimmungen mit dem *Western Blot* durchgeführt. So wurde die Anwesenheit von Antikörpern im Serum von semi-immunen oder im Rahmen von in Studien geimpften Personen wiederholt in *Western Blots* gegen Sporozoitenproteine bestimmt (46, 101). Auch wurde das *Western-Blot*-Verfahren in Südost-Asien dazu verwendet, eine Erkrankung mit *Plasmodium vivax* zu erkennen (102).

Es ist aber von anderen Erkrankungen bekannt, dass eine quantitative Auswertung prinzipiell möglich ist. So wurde von der Arbeitsgruppe um Talmi-Frank belegt, dass im Rahmen einer experimentellen Leishmaniasis in Hunden Antikörper gegen bestimmte Banden im *Western Blot* signifikant früher ansteigen als im *ELISA* (103). Auch für den Nachweis von Erythropoetin im Serum wird der *Western Blot* quantitativ verwendet (104).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein *Western-Blot*-Verfahren entwickelt und semi-quantitativ ausgewertet werden, um die Antikörperbildung gegen den Impfstoffkandidaten *GMZ2* im Serum der gesunden Probanden zu bestimmen. Die Fragestellung war hierbei, ob dadurch Informationen zur Immunreaktion gegen Malaria über die Ergebnisse des *ELISA* und *ELISPOT* hinaus gewonnen werden. Es ist bekannt, dass Antikörper eine zentrale Rolle in der spezifischen Immunabwehr der erworbenen Immunität gegen Malaria einnehmen (19), weshalb sie als Surrogatmarker für das Korrelat der Protektion verwendet werden. Die Frage war deshalb, ob der *Western Blot* für den Nachweis der Antikörper gegen *GMZ2* ein geeigneteres Verfahren ist.

In einer Übersichtspublikation von Grassman et al. wurde gefordert, einige Standards bei der semiquantitativen Auswertung zu beachten (104). Diesen Forderungen wurde so gut wie möglich Rechnung getragen.

So wurden die Aufnahmen mit einer CCD-Kamera durchgeführt, die nicht über eine automatische Verstärkungsregelung verfügt. Das Beispiel eines Blots findet sich in der Abbildung 3.1 auf S. 38. Die Hintergrundkorrektur wurde im Algorithmus 1 für jede Bahn einzeln ausgerechnet und die Ergebnisse, dass die Werte des Algorithmus 1 eher mit denen des *ELISA* korrelieren als die des Algorithmus 3, für den der ganze Blot als Hintergrund abgezogen wurde, entsprechen der Erkenntnis von Grassman et al. (104). Als Wert für die optische Dichte wurde der arithmetische Mittelwert verwendet und nicht wie von Grassman et al. gefordert das Integral, da der Mittelwert vom Bildprogramm ImageJ ausgegeben wurde. Der Messbereich war zentriert und umfasste mehr als ein Drittel der Bandenbreite.

Des Weiteren wurde in einer Veröffentlichung von Charette et al. aufgrund der Nicht-linearität des Signals empfohlen, eine Standardverdünnungsreihe anzufertigen, anhand derer die Menge der nachgewiesenen Antikörper bestimmt wird (105). Dieser Forderung wurde insofern Rechnung getragen, als nach einer wiederholten Messung der Positivkontrolle, mit der gezeigt werden konnte, dass diese zwischen den Verdünnungen von 1:500 und 1:1000 linear verläuft (s. Abb. 3.3 auf S. 40), die Positivkontrolle auf jedem Blot in diesen Verdünnungen aufgetragen wurde. Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit meist eine geringfügige Abweichung der Werte, wenn der Quotient aus Originalwert und der Positivkontrolle mit dem Originalwert verglichen wurde (s. Kap. 3.5.1 auf S. 45 und Kap. 3.5.3 auf S. 53). Beim Vergleich der Daten vom Tag 84 fiel jedoch auf, dass die Korrelation des Quotienten aus Algorithmus 3 und Positivkontrolle mit dem *ELISPOT* eine deutlich höhere Korrelation ergab. Und auch die Korrelation ohne Proband 30 des *ELISPOT* mit den Quotienten der Algorithmen ergab stärkere Zusammenhänge (s. Kap. 3.5.2 auf S. 50). Es überwiegen jedoch die Daten, die auf einen geringen Unterschied zwischen den Originaldaten und den Quotienten aus Originaldaten und der Positivkontrolle hinweisen.

Im *Western Blot* zeigten sich Antikörper gegen verschiedene Bruchteile des Antigens *GMZ2* im Serum der Probanden. Der größte Anteil der Antikörper wurde jedoch gegen ein Protein einer Größe von 260 kDa gebildet. Olesen et al. fanden heraus, dass die zytophilen Antikörperklassen IgG1 und IgG3 vor allem gegen Schizontenproteine mit einem geringeren Molekulargewicht von weniger als 70 kDa gebildet wurden (106). Der neu entwickelte *Western Blot* gegen *GMZ2* wies nur wenige Antikörper gegen Antigenbruch-

teile mit einem Molekulargewicht zwischen 80 und 150 kDa nach. Es war jedoch eine Tendenz zu ersehen, dass an den Tagen, an denen die Probanden eine stärkere Immunreaktion gegen das Antigen *GMZ2* zeigten, auch eher Antikörper gegen Bruchteile des Antigens mit geringerem Molekulargewicht gebildet wurden (s. Abb. 3.1 auf S. 38).

Die semiquantitativ bestimmten Werte des *Western Blot* zeigten eine starke und signifikante Korrelation der Werte mit denen des *ELISA*, wenn die Daten aller Tage verglichen wurden (s. Tab. 3.2 und 3.3 auf S. 48 und 49 und Abb. 3.10 und 3.11 auf S. 47 und 50) und eine mittlere ebenfalls signifikante Korrelation, wenn nur die Daten des Tags 84 verglichen wurden (s. Tab. 3.4 und 3.5 auf S. 51 und 52 und Abb. 3.12 auf S. 53), so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie dieselbe Immunreaktion anzeigen.

Im Vergleich der Werte des *Western Blot* mit denen des *ELISPOT* bestand für die Werte aller Tage eine signifikante Korrelation, die vergleichbar war mit der signifikanten Korrelation zwischen *ELISA* und *ELISPOT*, jedoch etwas geringer, als die Korrelation zwischen *ELISA* und *Western Blot* (s. Tab. 3.2 und 3.3 auf S. 48 und 49). Für den Tag 84 bestand zwischen *Western Blot* und *ELISPOT* eine mittlere, nicht signifikante lineare Korrelation, die noch geringer war als die ebenfalls nicht signifikante lineare Korrelation des *ELISPOT* mit dem *ELISA* (s. Tab. 3.4 auf S. 51). Die Korrelation zwischen dem Quotienten aus Algorithmus 3 und Positivkontrolle und dem *ELISPOT* war beim Vergleich der Werte des Tags 84 höher als die des Algorithmus 1, jedoch ebenfalls nicht signifikant (s. Tab. 3.5 auf S. 52).

Die Korrelation zwischen *ELISPOT* und *Western Blot* beziehungsweise *ELISA* fiel erwartungsgemäß niedriger aus. Dies lässt sich damit erklären, dass das *ELISPOT*-Verfahren eine andere Immunreaktion nachweist als *Western Blot* und *ELISA* (95). Hinzu kommt, dass die Werte des *ELISPOT* nur für zwei der drei Gruppen normalverteilt waren.

Beim Vergleich der Daten im Verlauf über die Zeit konnte gezeigt werden, dass die Veränderung vom Tag 84 zum Tag 365 im *Western Blot* sowohl mit dem *ELISA* als auch mit dem *ELISPOT* korrelierte (s. Tab. 3.6 und 3.7 auf S. 54). Wurde ein Ausreißer (Proband 25) ausgeschlossen, korrelierte der *Western Blot* weiterhin mit dem *ELISA* und dem *ELISPOT*, während der *ELISA* nicht mehr mit dem *ELISPOT* korrelierte. Dies ist insofern interessant, als von Druilhe et al. in einem *Western Blot* gegen Schizontenproteine im Rahmen einer Vakzinierungsstudie mit *MSP3*-LSP gezeigt werden konnte, dass eine positive Reaktion im *Western Blot* nach 12 Monaten signifikant mit einer effektiven Reaktion der antikörperabhängigen zellulären Inhibition (antibodydependent cellular inhibition (ADCI)) korrelierte (46). Es besteht also die Möglichkeit, dass der *Western Blot* eher eine bleibende Immunreaktion auf das Antigen anzeigt.

4.1 Vorteile der verschiedenen Methoden

Vorteile des *Western Blot* Das *Western-Blot*-Verfahren besitzt eine hohe Sensitivität und die Möglichkeit, Antikörper gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene gleichzeitig sichtbar zu machen (97, 107). Auch kann durch das Mitführen eines Proteinstandards das Molekulargewicht der Antigene bestimmt werden.

Ein weiterer Vorteil des *Western Blot* gegen das Antigen *GM22* gegenüber dem *ELISA* ist der mögliche Nachweis verschiedener Antikörper gegen unterschiedliche Bruchstücke des Antigens durch die Auftrennung der Proteine im *SDS-Page*-Verfahren.

Ein zusätzlicher Vorteil des *Western Blot* besteht in einer möglichen Wiederverwendung der Membranen (108).

Vorteile des *ELISA* Vorteile des *ELISA* sind eine gute Sensitivität (109) und die Möglichkeit, mehrere Messungen gleichzeitig durchführen zu können. Das *ELISA*-Verfahren ist einfach, schnell und kostengünstig durchzuführen und durch die Entwicklung unterstützender Gerätschaften ist die Verbraucherfreundlichkeit entsprechend hoch. Außerdem ist eine quantitative Messung der Immunglobulinkonzentration möglich (94).

Vorteile des *ELISPOT* Auch bei dieser Methode ist durch die Entwicklung von Platten mit 96 Wells die Untersuchung vieler Proben gleichzeitig möglich. Des Weiteren ist die Sensitivität des *ELISPOT* 10–200 Mal höher als die des *ELISA* (110) und die entwickelten Platten können für einige Wochen asserviert werden.

Dank einer neuen Entwicklung ist es heutzutage auch möglich, zwei unterschiedliche sezernierte Proteine gleichzeitig nachzuweisen (111, 112).

Die wichtigsten Vorteile der Methoden sind in der Tabelle 4.1 auf S. 60 aufgeführt.

4.2 Nachteile der verschiedenen Methoden

Nachteile des *Western Blot* Das *Western-Blot*-Verfahren hat einige entscheidende Nachteile. So können pro Blot maximal sieben Seren in zwei Verdünnungen in einem einfachen Ansatz untersucht werden, während mit dem *ELISA* auf einer Platte 20 Seren in zwei Verdünnungen und in doppelten Ansätzen gemessen werden können. Dabei wurde im *Western Blot* bereits statt einer Standardverdünnungsreihe, wie sie im *ELISA* üblich ist und von Charette et al. auch für das *Western-Blot*-Verfahren gefordert wurde (105), die Positivkontrolle in nur zwei Verdünnungen mitgeführt. Ein weiterer Nachteil des *Western Blot* ist die längere Dauer sowohl der Arbeitszeit im Labor als auch der Auswertung im Vergleich zum *ELISA*. Dazu kommt, dass die semiquantitative Auswertung des *Western*

Tabelle 4.1: Vorteile der drei Methoden

<i>Western Blot</i>	<i>ELISA</i>	<i>ELISPOT</i>
Antikörper gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene und Antigenbruchstücke können gleichzeitig sichtbar gemacht werden	Einfachheit Möglichkeit vieler zeitgleicher Messungen Verbraucherfreundlichkeit	höhere Sensitivität als <i>ELISA</i> Untersuchung vieler Proben gleichzeitig möglich
hohe Sensitivität der Nachweisreaktion (97)	kostengünstig	Es können zwei unterschiedliche sezernierte Proteine gleichzeitig nachgewiesen werden (111, 112)
Molekulargewicht des Antigens bestimmbar	hohe Sensitivität (109)	
Wiederverwendung des Blots möglich (108)	Quantitative Messungen möglich	Haltbarkeit der Platten für einige Wochen

Blot von Hand erfolgte und dadurch möglicherweise weniger objektiv war. Auch mit einer maschinellen Auswertung sind Fehler jedoch nicht ausgeschlossen.

Ebenfalls besteht bei der semiquantitativen Auswertung des *Western Blot* das Problem der Hintergrundfärbung, die durch eine passende Berechnung von der Farbtiefe der zu messenden Bande abgezogen werden muss (104). Ein weiterer Nachteil ist die kurze Dauer der Nachweisreaktion von etwa einer Stunde (113).

Des Weiteren wird diskutiert, ob durch die Denaturierung und Reduktion der Proteine durch den *Western Blot* möglicherweise Antikörper nicht mehr gegen das Antigen binden können und dadurch eine Immunreaktion nicht abgebildet wird (106). Dabei wird davon ausgegangen, dass das betreffende Epitop ursprünglich in einer dreidimensionalen Form vorliegt, die durch Faltungsvorgänge aus verschiedenen Teilen der Aminosäureketten gebildet wird (49).

Nachteile des *ELISA* Auch beim *ELISA* wird eine Alteration der an Plastik adsorbier-ten Antigene diskutiert (114). Ebenfalls ist die Detektion von Antikörpern mit niedriger Affinität schwierig (115). Ein weiterer Nachteil des hier verwendeten indirekten *ELISA* ist eine mögliche Kreuzreaktion mit dem sekundären Antikörper, was zur Bildung eines unspezifischen Signals führen kann. Auch können unter anderem durch unzureichendes Blockieren der freien Bindungsstellen unspezifische Bindungen auftreten (116, 117).

Nachteile des *ELISPOT* Das *ELISPOT*-Verfahren selbst ist zeitlich sehr aufwändig, wie auch die Aufbereitung der Proben und die mikroskopische Auswertung durch zwei Laboranten.

Außerdem kann keine Aussage über die Häufigkeit der antikörpersezernierenden Zellen *in vivo* getroffen werden, da der *ELISPOT* erst nach Kultivierung der Zellen über einen bestimmten Zeitraum erfolgt (118).

Die bedeutendsten Nachteile der Methoden sind in der Tabelle 4.2 auf S. 61 aufgeführt.

Tabelle 4.2: Nachteile der drei Methoden

<i>Western Blot</i>	<i>ELISA</i>	<i>ELISPOT</i>
wenige Messungen gleichzeitig möglich	Alteration an Plastik adsorbierter Antigene (114)	aufwändige Aufbereitung der Proben
kurze Nachweisreaktion von etwa einer Stunde (113)	schlechte Detektion von Antikörpern mit niedriger Affinität (115)	aufwändiges Verfahren
nur semiquantitative Messung	unerwünschte unspezifische Bindungen (116, 117)	keine Aussage über die Häufigkeit der antikörpersezernierenden Zellen <i>in vivo</i> (118)
Hintergrundfärbung (119)		
mögliche Denaturierung der Proteine durch Auftrennungsvorgang (106)		
Temperaturabhängigkeit (119, 120)		

4.2.1 Mögliche Verbesserungen des *Western-Blot*-Verfahrens

Die Anzahl der untersuchten Probanden pro Blot kann dadurch erhöht werden, dass die Proben nur in einer Verdünnung verwendet werden. Außerdem könnte auf die Messung der Antikörperkonzentration an den Tagen 28 und 56 verzichtet werden, da sich ein ähnlicher Anstieg wie im *ELISA* zeigte (s. Abb. 3.8 auf S. 46 und Abb. 3.9 auf S. 47).

Das Problem der Hintergrundfärbung kann durch die Subtraktion einer passend berechneten Hintergrundfärbung von der zu messenden Bande behoben werden. Es zeigt sich, dass die Anwendung des Algorithmus 1 hierzu durchaus geeignet ist.

Die kurze Dauer der Nachweisreaktion bei Verwendung eines chemilumineszenten Reagens von etwa einer Stunde (113) könnte durch die Verwendung eines fluoreszenzdierenden Reagens verbessert werden. So konnten Weldon et al. zeigen, dass die Sensitivität unter Verwendung eines fluoreszenzdierenden Reagens, das Lichtwellen nahe dem Infraroten ausstrahlt, nicht schlechter ist als die chemilumineszenter Reagenzien und die quantitative Analyse verbessert (121).

Die Denaturierung des Proteins im *SDS-Page*-Verfahren scheint keine negativen Auswirkungen zu haben, da eine Antikörperbindung nachgewiesen werden konnte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die denaturierte Form eines Proteins sehr instabil ist und dieses deshalb unter physiologischen Bedingungen seine ursprüngliche Form wieder annimmt, da diese dem Zustand der niedrigsten freien Enthalpie entspricht (122, 123).

4.3 Ausblick

Um die Reliabilität des Verfahrens zu bestimmen, wäre es notwendig, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Des weiteren wäre es interessant, die Seren aus der Impfstudie mit einem *Western Blot* gegen Parasitenproteine zu untersuchen mit der Fragestellung, ob die Immunreaktion langsamer abfällt als dies im *ELISA* und *Western Blot* gegen *GMZ2* der Fall ist. Dies hätte ebenfalls den Vorteil, dass dadurch alle linearen Epitope über die ganze Länge des Proteins eingeschlossen wären (106).

Für die weitere Untersuchung der immunogenen Aktivität des Antigens *GMZ2* wäre es interessant, den *Western Blot* gegen die unterschiedlichen IgG-Subklassen auszuführen, um zu untersuchen, ob es unterschiedliche Reaktionsmuster geben könnte, wie dies von Oleson et al. nachgewiesen wurde (106).

4.4 Schlussfolgerung

Es wurde gezeigt, dass das *Western-Blot*-Verfahren semiquantitativ zum Nachweis von Antikörpern gegen das Antigen *GMZ2* verwendet werden kann. Über eine deutliche Korrelation mit den Werten des *ELISA* und einer teilweisen Korrelation mit den Werten des *ELISPOT* hinaus, bietet das Verfahren neue Informationen, da unter anderem Antikörper gegen Bruchstücke des Antigens gezeigt werden können. Auch besteht die Möglichkeit, dass anhand des *Western Blot* Aussagen über eine dauerhafte Immunität getroffen

werden können, da der Abfall vom Tag 84 auf den Tag 365 auch nach Ausschluss eines Ausreißers mit dem *ELISPOT* mäßig stark, jedoch nicht signifikant korrelierte. Die Nullhypothese, dass die Ergebnisse des *Western Blot* denen des *ELISA* oder *ELISPOT* entsprechen, trifft deshalb zumindest teilweise zu. Jedoch kann die Alternativhypothese aufgrund des Nachweises von Antikörpern gegen Bruchstücke des Antigens *GMZ2* nicht vollständig verworfen werden.

Das hier entwickelte Verfahren ist in der Lage neue Informationen über die Immunreaktion bei der Erkrankung durch *Plasmodium falciparum* zu liefern. Da davon ausgegangen werden muss, dass bei einem solch komplexen Erreger nicht mit einem einzelnen Messwert eine ausreichende Aussage getroffen werden kann (18), können die Daten, die durch die Messung der Immunreaktion mit dem *Western Blot* gewonnen werden, gerade in immunologischen Studien weitere Erkenntnisse liefern. Da das Verfahren andererseits deutlich aufwändiger und kostspieliger als der *ELISA* ist, wird es in der Diagnostik der Erkrankung weiterhin eine untergeordnete Rolle spielen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Malaria ist eine der wichtigsten parasitären Erkrankungen in den Tropen und Subtropen, die etwa 50% der Weltbevölkerung betrifft. *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, stellt die gefährlichste Variante dar.

In dieser Arbeit wurde eine semiquantitative Bestimmung der IgG-Konzentration gegen GMZ2, ein Fusionsprodukt aus zwei Antigenen des *P. falciparum*, durch eine Messung mit dem *Western Blot*-Verfahren entwickelt. Als Referenzmethoden wurden die etablierten Messverfahren *ELISA* und *ELISPOT* verwendet. Mittels linearer Korrelation und einer Bland-Altman-Analyse wurden die erhobenen Werte sowie die Veränderungen der Werte über die Zeit verglichen, um zu ermitteln, ob das *Western-Blot*-Verfahren neue Informationen über die Immunreaktion im Rahmen einer Impfung gegen Malaria liefern kann.

Im *Western Blot* zeigten sich Antikörper gegen Bruchteile des Antigens GMZ2 im Serum der Probanden. Der größte Anteil der Antikörper wurde gegen ein Protein einer Größe von 260 kDa gebildet. An Tagen einer stärkeren Immunreaktion gegen das Antigen GMZ2 wurden Antikörper gegen kleinere Fragmente des Antigens nachgewiesen.

Bei der Bland-Altman-Analyse fiel ein starker signifikanter Zusammenhang des *ELISA* mit dem *Western Blot* auf (Algorithmus 1: $r = 0,713$, Wahrscheinlichkeit $> |t| < 0,0001^*$, Algorithmus 3: $r = 0,613$, Wahrscheinlichkeit $> |t| < 0,0001^*$). Die lineare Korrelation der Werte des *Western Blot* mit denen des *ELISPOT* war geringer aber ebenfalls signifikant (Algorithmus 1: $r = 0,552$, $p < 0,0001^*$, Algorithmus 3: $r = 0,426$, $p < 0,0001^*$). Und auch die Korrelation des *ELISA* mit dem *ELISPOT* war mittelstark und signifikant ($r = 0,571$, 95%-KI: 0,4-0,7, $p < 0,0001^*$).

Bei der paarweisen Korrelation der Differenz vom Tag 0 zum Tag 84 fiel ein signifikanter Zusammenhang zwischen *ELISA* und dem Algorithmus 1 des *Western Blot* auf ($r = 0,857$, $p < 0,0001^*$). Beim Vergleich der Veränderung von Tag 84 auf Tag 365 im Algorithmus 1 des *Western Blot* beziehungsweise *ELISA* mit dem *ELISPOT* war eine

mittelstarke Korrelation nachweisbar, die jedoch nicht signifikant war (Algorithmus 1 des *Western Blot*: $r = 0,532$, $p = 0,019$, *ELISA*: $r = 0,656$, $p = 0,0023$).

Es wurde gezeigt, dass das *Western-Blot*-Verfahren semiquantitativ zum Nachweis von Antikörpern gegen das Antigen *GMZ2* verwendet werden kann. Über eine deutliche Korrelation mit den Werten des *ELISA* und einer teilweisen Korrelation mit den Werten des *ELISPOT* hinaus, bietet das Verfahren neue Informationen, da unter anderem Antikörper gegen Bruchstücke des Antigens gezeigt werden können. Auch besteht die Möglichkeit, dass anhand des *Western Blot* Aussagen über eine dauerhafte Immunität getroffen werden können.

Literaturverzeichnis

- [1] *World malaria report 2008*. World Health Organization, Geneva, 2008.
- [2] *World malaria report 2010*. World Health Organization, Geneva, 2010.
- [3] Hay SI, Guerra CA, Gethin PW, Patil AP, Tatem AJ, Noor AM, Kabaria CW, Manh BH, Elyazar IRF, Brooker S, Smith DL, Moyeed RA, and Snow RW. A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *PLoS Medicine*, 6(3):286–302, 2009.
- [4] Lang W, editor. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis : 164 Tabellen*. Thieme, Stuttgart [u.a.], 2000.
- [5] Prudêncio M, Rodriguez A, and Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*, 4:849–856, 2006.
- [6] Chin W, Contacos PG, Coatney GR, and Kimball HR. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science*, 149:865, 1965.
- [7] Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, and Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 363(9414):1017–1024, 2004.
- [8] Garcia JE, Alvaro P, and Patarroyo ME. Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: Implications for vaccine design. *Clin Microbiol Rev*, 19(4):686–707, 2006.
- [9] Bannister L and Mitchell G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol*, 19(5):209–213, 2003.
- [10] R Tuteja. Malaria - an overview. *FEBS J*, 274(18):4670–4679, 2007.
- [11] Mackintosh CL, Beeson JG, and Marsh K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol*, 20(12):597–603, 2004.
- [12] World Health Organization. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94:supplement 1, 2000.
- [13] Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, Marsh V, Newton C, Winstanley P, Warn P, Peshu NG, Pasvol G, and Snow R. Indicators of life-threatening malaria in african children. *New Eng J Med*, 332(21):1399–1404, 1995.
- [14] Clark IA, Budd AC, Alleva LM, and Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J*, 5(85), 2006.
- [15] Miller LH, Baruch DI, Marsh K, and Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415:673–679, 2002.
- [16] Pain A, Ferguson DJ, Kai O, Urban BC, Lowe B, Marsh K, and Roberts DJ. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a

- common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4):1805–1810, 2001.
- [17] J Knobloch, editor. *Tropen- und Reisemedizin : mit ... 83 Tabellen*. G. Fischer, Jena, 1996.
- [18] Doolan DL, Dobaño C, and Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*, 22(1):13–36, 2009.
- [19] Cohen S, McGregor IA, and Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, 192:733–737, 1961.
- [20] Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, and 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*, 172:1633–1641, 1990.
- [21] Marsh K and Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*, 28:51–60, 2006.
- [22] *WHO Guidelines for the treatment of malaria*. World Health Organization, Geneva, 2006.
- [23] White NJ. The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. *Malar J*, 7(Suppl 1):S8, 2008.
- [24] Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, Bojang K, Olaosebikan R, Anunobi N, Maitland K, Kivaya E, Agbenyega T, Nguah SB, Evans J, Gesase S, Kahabuka C, Mtove G, Nadjm B, Deen J, Mwanga-Amumpaire J, Nansumba M, Karema C, Umulisa N, Uwimana A, Mokuolu OA, Adedoyin OT, Johnson WB, Tshefu AK, Onyamboko MA, Sakulthaew T, Ngum WP, Silamut K, Stepniewska K, Woodrow CJ, Bethell D, Wills B, Oneko M, Peto TE, von Seidlein L, Day NP, and White NJ. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in african children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*, 376(9753):1647–1657, 2010.
- [25] *Malaria vector control and personal protection*. World Health Organization, Geneva, 2006.
- [26] Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, and Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*, 118(4):1266–1276, 2008.
- [27] Greenwood B. Review: Intermittent preventive treatment - a new approach to the prevention of malaria in children in areas with seasonal malaria transmission. *Trop Med Int Health*, 11(7):983–991, 2006.
- [28] Meremikwu MM, Donegan S, and Esu E. Chemoprophylaxis and intermittent treatment for preventing malaria in children (review). *Cochrane Database Syst Rev*, 2, 2008.
- [29] Aponte JJ, Schellenberg D, Egan A, Breckenridge A, Carneiro I, Critchley J, Danquah I, Doodoo A, Kobbe R, Lell B, May J, Premji Z, Sanz S, Sevene E, Soulaymani-Becheikh R, Winstanley P, Adjei S, Anemana S, Chandramohan D, Issifou S, Mockenhaupt F, Owusu-Agyei S, Greenwood B, Grobusch MP, Kremsner PG, Macete E, Mshinda H, Newman RD, Slutsker L, Tanner M, Alonso P, and Menendez C. Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with

- sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in african infants: a pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials. *Lancet*, 374:1533–42, 2009.
- [30] Uneke CJ. Impact of placental *Plasmodium falciparum* malaria on pregnancy and perinatal outcome in sub-Saharan Africa. *Yale J Biol Med*, 80:39–50, 2007.
- [31] World Health Organization. A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the african region. 2004.
- [32] Schlagenhauf P and Petersen E. Malaria chemoprophylaxis: Strategies for risk groups. *Clin Microbiol Rev*, 21(3):466–472, 2008.
- [33] Good MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol*, 21(1):29–34, 2005.
- [34] Nardin EH and Nussenzweig RS. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: Role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. *Annu Rev Immunol*, 11:687–727, 1993.
- [35] Matuschewski K and Mueller AK. Vaccines against malaria - an update. *FEBS J*, 274:4680–4687, 2007.
- [36] Aponte JJ, Aide P, Renom M, Mandomando I, Bassat Q, Sacarlal J, Manaca MN, Lafuente S, Barbosa A, Leach A, Lievens M, Vekemans J, Sigauque B, Dubois MC, Demoitié MA, Sillman M, Savarese B, McNeil JG, Macete E, Ballou WR, Cohen J, and Alonso PL. Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. *Lancet*, 370(3):1543–1551, 2007.
- [37] Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, and Saul A. Malaria transmission-blocking vaccines - how can their development be supported? *Nature Med*, 6(3): 241–244, 2000.
- [38] Russel PF and Mohan BN. The immunization of fowls against mosquito-borne *Plasmodium gallinaceum* by injections of serum and of inactivated homologous sporozoites. *J Exp Med*, 76(5):477–495, 1942.
- [39] Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, and Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, 216(5111):160–162, 1967.
- [40] Hoffman SL, Billingsley PF, James E, Richman A, Loyevsky M, Li T, Chakravarty S, Gunasekera A, Chattopadhyay R, Li M, Stafford R, Ahumada A, Epstein JE, Sedegah M, Reyes S, Richie TL, Lyke KE, Edelman R, Laurens MB, Plowe CV, and Sim BK. Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum Vaccin*, 6(1):97–106, 2010.
- [41] Vaughan AM, Wang R, and Kappe SHI. Genetically engineered, attenuated whole-cell vaccine approaches for malaria. *Hum Vaccin*, 6(1):107–113, 2010.
- [42] Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Perteua M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DMA, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C,

- Davis RW, Fraser CM, and Barrell B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906):498–511, 2002.
- [43] Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P, Wellde BT, Garçon N, Krzych U, and Marchand M. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against plasmodium falciparum malaria. RTS,S malaria vaccine evaluation group. *N Eng J Med*, 336(5):477–495, 1997.
- [44] Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Aide P, Sigauque B, Milman J, Mandomando I, Bassat Q, Guinovart C, Espasa M, Corachan S, Lievens M, Navia MM, Dubois MC, Menendez C, Dubovsky F, Cohen J, Thompson R, and Ballou WR. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*, 366:2012–2018, 2005.
- [45] Olotu A, Lusingu J, Leach A, Lievens M, Vekemans J, Msham S, Lang T, Gould J, Dubois MC, Jongert E, Vansadia P, Carter T, Njuguna P, Awuondo KO, Malabeja A, Abdul O, Gesase S, Mturi N, Drakeley CJ, Savarese B, Villafana T, Lapierre D, Ballou WR, Cohen J, Lemnge MM, Peshu N, Marsh K, Riley EM, von Seidlein L, and Bejon P. Efficacy of RTS,S/AS02E malaria vaccine and exploratory analysis on anti-circumsporozoite antibody titres and protection in children aged 5–17 months in kenya and tanzania: a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*, 11:102–109, 2011.
- [46] Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, Audran R, Bouzidi A, Oeuvray C, and Roussilhon C. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med*, 2(11):1135–1144, 2005.
- [47] Murhandarwati EEH, Wang L, Black CG, Nhan DH, Richie TL, and Coppel RL. Inhibitory antibodies specific for the 19-kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 do not correlate with delayed appearance of infection with *Plasmodium falciparum* in semi-immune individuals in vietnam. *Infect Immun*, pages 4510–4517, 2009.
- [48] Murhandarwati EEH, Wang L, De Silva HD, Ma C, Plebanski M, Black CG, and Coppel RL. Growth-inhibitory antibodies are not necessary for protective immunity to malaria infection. *Infect Immun*, pages 680–687, 2010.
- [49] Murphy KP, Travers P, and Walport MJ. *Janeways immunobiology*. Garland Science, New York [u.a.], 7. edition, 2008.
- [50] Fleischman JB, Porter RR, and Press EM. The arrangement of the peptide chains in γ -Globulin. *Biochem J*, 88:220–228, 1963.
- [51] Edelman GM. Antibody structure and molecular immunology. *Scand J Immunol*, 34:4–22, 1991.
- [52] Porter RR. Structural studies of immunoglobulins. *Science*, 180(87):713–716, 1973.
- [53] Gerstein M, Lesk AM, and Chothia C. Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry*, 33(22):6739–6749, 1994.
- [54] Porter RR. The hydrolysis of rabbit γ -Globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J*, 73:119–126, 1959.

- [55] Wu TT and Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med*, 132(2):211–250, 1970.
- [56] Johnsons G and Wu TT. Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res*, 28(1):212–218, 2000.
- [57] Brack C, Hiram M, Lenhard-Schuller R, and Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*, 15:1–14, 1978.
- [58] Papadea C and Check IJ. Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: Biochemical, genetic, and clinical aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 27(1): 27–58, 1989.
- [59] Ghetie V and Ward ES. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol*, 18:739–766, 2000.
- [60] Perlman P and Troye-Blomberg M. Malaria and the immune system in humans. *Chem Immunol*, 80:229–242, 2002.
- [61] Boyden SV and Sorkin E. The adsorption of antigen by spleen cells previously treated with antiserum *in vitro*. *Immunology*, 3:272–283, 1960.
- [62] Tebo AE, Kremsner PG, and Luty AJ. *Plasmodium falciparum*: A major role for IgG3 in antibody-dependent monocyte-mediated cellular inhibition of parasite growth *in Vitro*. *Exp Parasitol*, 98(1):20–28, 2001.
- [63] Jafarshad A, Dziegiel M, Lundquist R, Nielsen LK, Singh S, and Druilhe PL. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγRII and FcγRIII. *J Immunol*, 178: 3099–3106, 2007.
- [64] Sim RB and Reid KB. C1: molecular interactions with activating systems. *Immunol Today*, 12:307–311, 1991.
- [65] Viscidi R, Laughon BE, Yolken R, Bo-Linn P, Moench T, Ryder RW, and Bartlett JG. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis*, 148(1):93–100, 1983.
- [66] Sulica A, Morel P, Metes D, and Herberman RB. Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *Intern Rev Immunol*, 20: 371–414, 2001.
- [67] Kwiatkowska K and Sobota A. Signaling pathways in phagocytosis. *BioEssays*, 21:422–431, 1999.
- [68] Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T, and Ravetch JV. SHIP recruitment attenuates FcγRIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity*, 10: 753–760, 1999.
- [69] Borre MB, Dziegiel M, Høgh B, Petersen E, Rieneck K, Riley E, Meis JF, Aikawa M, Nakamura K, Harada M, Wind A, Jakobsen PH, Cowland J, Jepsen S, Axelsen NH, and Vuust J. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol*, 49:119–131, 1991.
- [70] Theisen M, Vuust J, Gottschau A, Jepsen S, and Høgh B. Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum*

- expressed in *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2(1):30–34, 1994.
- [71] Hermesen CC, Verhage DF, Telgt DS, Teelen K, Bousema JT, Roestenberg M, Bolad A, Berzins K, Corradin G, Leroy O, Theisen M, and Sauerwein RW. Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* in a phase 1 malaria vaccine trial. *Vaccine*, 25(15):2930–2940, 2006.
- [72] Theisen M, Soe S, Oeuvray C, Thomas AW, Vuust J, Danielsen S, Jepsen S, and Druilhe P. The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth *in vitro*. *Infect Immun*, 66(1):11–17, 1997.
- [73] Dodoo D, Theisen M, Kurtzhals JAL, Akanmori BD, Koram KA, Jepsen S, Nkrumah FK, Theander TG, and Hviid L. Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, 181:1202–1205, 2000.
- [74] Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, and Druilhe P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* GLURP are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect Immun*, 68(5):2617–2620, 2000.
- [75] Theisen M, Dodoo D, Toure-Balde A, Soe S, Corradin G, Koram KK, Kurtzhals JAL, Hviid L, Theander T, Akanmori B, Ndiaye M, and Druilhe P. Selection of glutamate-rich protein long synthetic peptides for vaccine development: Antigenicity and relationship with clinical protection and immunogenicity. *Infect Immun*, 69(9):5223–5229, 2001.
- [76] Rodríguez LE, Curtidor H, Ocampo M, Garcia J, Puentes A, Valbuena J, Vera R, López R, and Patarroyo ME. Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 3 (MSP3) protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit merozoite invasion. *Protein Sci*, 14:1778–1786, 2005.
- [77] Mills KE, Pearce JA, Crabb BS, and Cowman AF. Truncation of merozoite surface protein 3 disrupts its trafficking and that of acidic-basic repeat protein to the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Microbiol*, 43(6):1401–1411, 2002.
- [78] Huber W, Felger I, Matile H, Lipps HJ, Steiger S, and Beck HP. Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. *Mol Biochem Parasitol*, 87:231–234, 1997.
- [79] Singh S, Soe S, Mejia JP, Roussilhon C, Theisen M, Corradin G, and Druilhe P. Identification of a conserved region of *Plasmodium falciparum* MSP3 targeted by biologically active antibodies to improve vaccine design. *J Infect Dis*, 190:1010–1018, 2004.
- [80] Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, Filgueira MC, Tartar A, and Druilhe P. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood*, 84:1594–1602, 1994.
- [81] Polley SC, Tetteh KKA, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojan KA, and Conway DJ. *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. *J Infect*

- Dis*, 195:279–287, 2007.
- [82] Roussillon C, Oeuvray C, Müller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape JF, Theisen M, Balde A, Pérignon JL, and Druilhe P. Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS Med*, 4(11):1791–1802, 2007.
- [83] Theisen M, Soe S, Brunstedt K, Follman F, Bredmose L, Israelsen H, Madsen SM, and Druilhe P. A *Plasmodium falciparum* GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine*, 2(9-10):1188–1198, 2004.
- [84] Carvalho LJM, Alves FA, Bianco, Jr. C, Oliveira SG, Zanini G, Soe S, Druilhe P, Theisen M, Muniz JAPC, and Daniel-Ribeiro CT. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(2):242–248, 2005.
- [85] Varmus H and Henney JE. Abstracts of the NIH-FDA conference „biomarkers and surrogate endpoints: Advancing clinical research and applications“. *Dis Markers*, (14):187–334, 1998.
- [86] *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Biomarkers Definition Working Group, 2001.
- [87] Mangiapane S and Garrido MV. Surrogatendpunkte als Parameter der Nutzenbewertung. Technical Report 91, Deutsche Agentur für Health Technology Assessment des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information, 2009.
- [88] Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, and Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care*, 25(2):275–278, 2002.
- [89] RL Prentice. Surrogate endpoints in clinical trials: Definition and operational criteria. *Stat Med*, 8:431–440, 1989.
- [90] Jackisch-Riemann A and Wille H. *Wenig Hilfe durch Surrogatparameter*, page 14. Ärztekammer Bremen und Kassenärztliche Vereinigung Bremen, 2008.
- [91] Langhorn J, Ndungu FM, Sponaas AM, and Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol*, 9(7):725–732, 2008.
- [92] Esen M, Kremsner PG, Schleucher R, Gässler M, Imoukhuede EB, Imbault N, Leroy O, Jepsen S, Knudsen BW, Schumm M, Knobloch J, Theisen M, and Mordmüller B. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3–GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine*, 27:6862–6868, 2009.
- [93] Avrameas S and Guilbert B. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol*, 2:394–396, 1971.
- [94] Engvall E and Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8:871–874, 1971.
- [95] Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony Ö, and Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific

- antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*, 65(1-2):109 – 121, 1983.
- [96] Renart J, Reiser J, and Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(7):3116–3120, 1979.
- [97] Towbin H, Staehelin T, and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9):4350–4354, 1979.
- [98] Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, and Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of lyme disease. *J Infect Dis*, 167(2):392–400, 1993.
- [99] Mylonakis E, Paliou M, Lally M, Flanigan TP, and Rich JD. Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: established and novel approaches. *Am J Med*, 109(7):568–576, 2002.
- [100] Wang LN and Li JM. Evaluation of immunoglobulin M and G western blot and elisa for screening antibodies to treponema pallidum in blood donors. *Sex Transm Dis*, 36(7):413–416, 2009.
- [101] Thelu J, Sheick-Zakiuddin I, Boudin C, Peyron F, Picot S, and Ambroise-Thomas P. Development of natural immunity in *Plasmodium falciparum* malaria: Study of antibody response by western immunoblotting. *J Clin Microbiol*, 29(3):510–518, 1991.
- [102] Son ES, Kim TS, and Nam HW. Western blot diagnosis of vivax malaria with multiple stage-specific antigens of the parasite. *Korean J Parasitol*, 39(2):171–176, 2001.
- [103] Talmi-Frank D, Strauss-Ayali D, Jaffe CL, and Baneth G. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*, 13(2):271–276, 2007.
- [104] Grassman M, Grenacher B, Rohde B, and Vogel J. Quantifying western blots: Pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*, 30:1845–1855, 2009.
- [105] Charette SJ, Lambert H, Nadeau PJ, and Landry J. Protein quantification by chemiluminescent western blotting: Elimination of the antibody factor by dilution series and calibration curve. *J Immunol Methods*, 353(1-2):148–150, 2010.
- [106] Olesen CH, Brahimi K, Vandahl B, Lousada-Dietrich S, Jogdand PS, Vestergaard LS, Doodoo D, Højrup P, Christiansen M, Larsen SO, Singh S, and Theisen M. Distinct patterns of blood-stage parasite antigens detected by plasma IgG subclasses from individuals with different level of exposure to *Plasmodium falciparum* infections. *Malar J*, 9:296, 2010.
- [107] Hattori S and Fujisaki H. Double immunodetection of proteins transferred onto a membrane using two different chemiluminescent reagents. *Anal Biochem*, 243: 277–279, 1996.
- [108] Kaufmann SH. Reutilization of western blots after chemiluminescent or autoradiographic detection. In Walker JM, editor, *The Protein Protocols Handbook*, chapter 78, pages 789–806. Humana Press, 3 edition, 2009.

- [109] Roberts IM, Jones SL, Premier RR, and Cox JC. A comparison of the sensitivity and specificity of enzyme immunoassays and time-resolved fluoroimmunoassay. *J Immunol Methods*, 143:49–56, 1991.
- [110] Tanguay S and Killion JJ. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res*, 13: 259–263, 1994.
- [111] Boulet S, Ndongala ML, Peretz Y, Boisvert MP, Boulassel MR, Tremblay C, Routy JP, Sekaly RP, and Bernard NF. A dual color ELISPOT method for the simultaneous detection of IL-2 and IFN- γ hiv-specific immune responses. *J Immunol Methods*, 320(1-2):18–29, 2006.
- [112] Czerkinsky, Moldoveanu Z, Mestecky J, Nilsson LA, and Ouchterlony O. A novel two colour ELISPOT assay. I. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*, 115(1):31–37, 1988.
- [113] Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB, and Whitehead TP. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem*, 31(8): 1335–1341, 1985.
- [114] Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B, Chang J, Brown WR, and Cantarero LA. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods*, 150:77–90, 1992.
- [115] Liang M, Klakamp SL, Funelas C, Lu H, Lam B, Herl C, Umble A, Drake AW, Pak M, Ageyeva N, Pasumarthi R, and Roskos LK. Detection of high- and low-affinity antibodies against a human monoclonal antibody using various technology platforms. *Assay Drug Dev Technol*, 5(5):655–662, 2007.
- [116] Dietzgen RG and Francki RIB. Nonspecific binding of immunoglobulins to coat proteins of certain plant viruses in immunoblots and indirect ELISA. *J Virol Methods*, 15:159–164, 1987.
- [117] Kenna JG, Major GN, and Williams RS. Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods*, 85: 409–419, 1985.
- [118] Riemekasten G. Die Rolle eines SmD1Peptids bei der Entstehung von pathogenetisch bedeutsamen Autoantikörpern beim systemischen Lupus erythematoses. 2002. Habilitation thesis.
- [119] Thean ET and Toh BH. Western immunoblotting: Temperature-dependent reduction in background staining. *Anal Biochem*, 177:256–258, 1989.
- [120] Lockshin M, Qamar T, Levy RA, and Best MP. IgG but not IgM anti-phospholipid antibody binding is temperature dependent. *J Clin Immunol*, 8(3):188–192, 1988.
- [121] Weldon S, Ambroz K, Schutz-Geschwender A, and Olive DM. Near-infrared fluorescence detection permits accurate imaging of loading controls for western blot analysis. *Anal Biochem*, 375:156–158, 2008.
- [122] Anfinsen CB, Haber E, Sela M, and White FH Jr. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47:1309–1314, 1961.

- [123] Shortle D. The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J*, 10(1):27–34, 1996.
- [124] *Title 5 Investigational New Drug Application*. Food and Drug Administration, Department of health and human services, 2008.
- [125] *Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln*. Bundesministerium für Gesundheit, 2008.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die räumliche Verteilung von <i>P. falciparum</i> Malaria anhand der durchschnittlichen jährlichen Parasitenrate von <i>P. falciparum</i> in 2-10jährigen Kindern (PfPR ₂₋₁₀) für das Jahr 2007 in Gebieten mit stabiler Malariaübertragung (3). Dargestellt als eine kontinuierliche Skala von Gelb nach Rot von 0% bis 100%. Dunkelgraue Gebiete: Instabiles Risiko einer Malariaübertragung (Inzidenz für das Auftreten einer Parasitämie beträgt 0,1/1000 pro Jahr). Hellgraue Gebiete: Kein Risiko einer Übertragung (Inzidenz für das Auftreten einer Parasitämie beträgt 0/1000 pro Jahr)	4
1.2	Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> nach Center of Disease Control (CDC)/ Alexander J. da Silva, PhD/Melanie Moser	6
1.3	Aufbau von Immunglobulin G	12
1.4	<i>GLURP</i> nach M. Theisen (70)	15
1.5	<i>MSP3</i> nach S. Singh (79)	15
1.6	<i>GMZ2</i> nach M. Theisen (83)	16
2.1	Prinzip des direkten <i>ELISA</i> . (1) Das Antigen (grün) haftet am Boden des Wells. Freie Plätze werden durch den Blockpuffer (violett) gesperrt. (2) Spezifischer humaner Antikörper bindet an das Antigen. (3) Peroxidase (POD)-markierter antihumaner Antikörper bindet an den humanen Antikörper. (4) POD katalysiert Tetramethylbenzidin, dabei kommt es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb.	29
2.2	Pipettier-Schema der Seren für den <i>ELISA</i> VP = Versuchsperson	30
2.3	Schema der Beladung der Membran des <i>Western Blot</i> - Blot 1 PC = Positivkontrolle	34
2.4	Schema der Beladung der Membran des <i>Western Blot</i> - Blot 2 PC = Positivkontrolle	35

3.1	<i>Western Blot</i> der Probanden 2 und 3 PC = Positivkontrolle, kDa = kiloDalton	38
3.2	<i>Western Blot</i> des Probanden 10 PC = Positivkontrolle, kDa = kiloDalton	39
3.3	Verdünnungsserie der Positivkontrolle nach Algorithmus 3 IgG = Immunglobulin	40
3.4	Box Blots des Algorithmus 1 des <i>Western Blot</i> IgG = Immunglobulin G	41
3.5	Box Blots des Algorithmus 3 des <i>Western Blot</i> IgG = Immunglobulin G	41
3.6	Box-Blots der Werte des <i>ELISA</i> IgG = Immunglobulin G	44
3.7	Box-Blots der Werte des <i>ELISPOT</i> IgG = Immunglobulin G	45
3.8	Immunologische Reaktion über den Zeitraum der Studie gemessen mit dem Algorithmus 1 des <i>Western Blot</i> IgG = Immunglobulin G	46
3.9	Immunologische Reaktion über den Zeitraum der Studie: a) gemessen im <i>ELISA</i> , b) gemessen im <i>ELISPOT</i> IgG = Immunglobulin G	47
3.10	Korrelation der Methoden a) ohne Veränderungen, b) nach Ausschluss des Ausreißers im <i>ELISPOT</i>	47
3.11	Korrelation der Methoden nach Bildung eines Quotienten aus den Werten des <i>Western Blot</i> und der Positivkontrolle PC = Positivkontrolle	50
3.12	Bland-Altman-Analyse der Werte des <i>ELISA</i> mit denen des <i>Western Blot</i> am Tag 84 bestimmt mit dem: a) Quotient aus Algorithmus 1 und Posi- tivkontrolle, b) Quotient aus Algorithmus 3 und Positivkontrolle WB = Western Blot, Std. = Standard, Wahrsch. = Wahrscheinlichkeit	53

Tabellenverzeichnis

1.1	Komplikationen der <i>Malaria tropica</i> nach (12, 13)	7
1.2	Immunglobulinklassen (49)	13
2.1	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für <i>ELISA</i>	19
2.1	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für <i>ELISA</i>	20
2.2	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für <i>ELISPOT</i>	20
2.2	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für <i>ELISPOT</i>	21
2.2	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für <i>ELISPOT</i>	22
2.3	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für <i>SDS-Page</i>	22
2.3	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für <i>SDS-Page</i>	23
2.4	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für <i>Western Blot</i>	23
2.4	Chemikalien und biologisches Ausgangsmaterial für <i>Western Blot</i>	24
2.5	Berechnungsweisen der Algorithmen	36
3.1	Übereinstimmung der Algorithmen in Bland-Altman-Analyse	42
3.1	Übereinstimmung der Algorithmen in Bland-Altman-Analyse	43
3.2	Korrelation von Algorithmus 1 und 3 des <i>Western Blot</i> , <i>ELISA</i> und <i>ELISPOT</i> ; Berechnung der Korrelation von <i>Western Blot</i> und <i>ELISA</i> mittels Bland-Altman-Analyse	48
3.3	Korrelation der Quotienten aus Originalwert und Positivkontrolle des Algorithmus 1 und 3 des <i>Western Blot</i> , <i>ELISA</i> und <i>ELISPOT</i> ; Berechnung der Korrelation von <i>Western Blot</i> und <i>ELISA</i> mittels Bland-Altman-Analyse	49
3.4	Korrelation von Algorithmus 1 und 3 des <i>Western Blot</i> , <i>ELISA</i> und <i>ELISPOT</i> am Tag 84; Berechnung der Korrelation von <i>Western Blot</i> und <i>ELISA</i> mittels Bland-Altman-Analyse	51
3.5	Korrelation der Quotienten aus Algorithmus 1 und 3 des <i>Western Blot</i> und Positivkontrolle, <i>ELISA</i> und <i>ELISPOT</i> am Tag 84; Berechnung der Korrelation von <i>Western Blot</i> und <i>ELISA</i> mittels Bland-Altman-Analyse	52
3.6	Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich des Algorithmus 1 des <i>Western Blot</i> mit dem <i>ELISA</i>	54

3.7	Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich des <i>ELIS-POT</i> mit dem Algorithmus 1 des <i>Western Blot</i> und dem <i>ELISA</i>	55
4.1	Vorteile der drei Methoden	60
4.2	Nachteile der drei Methoden	61
A.1	Phasen einer Studie nach (124)	81
B.1	Beschreibende Statistik des <i>Western Blot</i> PC = Positivkontrolle	82
B.1	Beschreibende Statistik des <i>Western Blot</i> PC = Positivkontrolle	83
B.2	Beschreibende Statistik der logarithmierten Daten des <i>Western Blot</i> PC = Positivkontrolle	84
B.3	Beschreibende Statistik des <i>ELISA</i>	85
B.2	Beschreibende Statistik der logarithmierten Daten des <i>Western Blot</i> PC = Positivkontrolle	85
B.4	Beschreibende Statistik des <i>ELIS-POT</i>	86
B.5	Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich des Algorithmus 3 des <i>Western Blot</i> mit dem <i>ELISA</i>	86
B.6	Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich der Quotienten aus Algorithmus 1 und Positivkontrolle des <i>Western Blot</i> mit dem <i>ELISA</i>	87
B.7	Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich der Quotienten aus Algorithmus 3 und Positivkontrolle des <i>Western Blot</i> mit dem <i>ELISA</i>	87
B.8	Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich des <i>ELIS-POT</i> mit dem Algorithmus 3 des <i>Western Blot</i> sowie der Quotienten aus Algorithmus 1 und Positivkontrolle und aus Algorithmus 3 und Positivkontrolle	88

Anhang A

Einleitung

A.1 Klinische Studie

Laut dem Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln ist

eine klinische Prüfung bei Menschen jede am Menschen durchgeführte Untersuchung, die dazu bestimmt ist, klinische oder pharmakologische Wirkungen von Arzneimitteln zu erforschen oder nachzuweisen oder Nebenwirkungen festzustellen oder die Resorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Ausscheidung zu untersuchen, mit dem Ziel, sich von der Unbedenklichkeit oder Wirksamkeit der Arzneimittel zu überzeugen (125).

Sie wird in mehrere Phasen eingeteilt (s. Tab. A.1 auf S. 81). Bevor die Forschung in Phase I eintritt, wurde schon eine je nach Wirkstoff fünf- bis fünfzehnjährige präklinische Vorarbeit geleistet.

Tabelle A.1: Phasen einer Studie nach (124)

Phase	Personen	Hauptziel
0	circa 10	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik anhand kleinster Dosen
I	20 - 80	Sicherheit, Ermittlung eines sicheren Dosierungsbereichs und erster Nebenwirkungen
II	einige 100	Effektivität und weitere Evaluation der Sicherheit; befristete Nebenwirkungen
III	mehrere 100 - 1000; mit Kontrollgruppe	zusätzliche Informationen zur Effektivität und Sicherheit, um die allgemeine Nutzen-Risiken-Relation zu evaluieren;
IV	unbegrenzt	führt zur Zulassung des Medikaments/Impfstoffs nach Markteinführung; zusätzliche Informationen zu Nebenwirkungen und optimaler Anwendung

Anhang B

Ergebnisse

B.0.1 Deskriptive Statistik des *Western Blot*

Tabelle B.1: Beschreibende Statistik des *Western Blot*
PC = Positivkontrolle

Algorithmus	Tag	\bar{x}	σ	95%-KI	\tilde{x}
Algorithmus 1	0	12,82	10,92	8,58-17,05	11,95
	28	23,46	21,02	15,31-31,61	17,6
	56	61,41	37,01	47,06-75,76	63,55
	84	82,91	42,97	66,25-99,58	85,1
	365	24,9	14,9	18,88-30,92	26,85
Algorithmus 2	0	11,43	15,93	5,25-17,61	5,95
	28	20,81	22,22	12,19-29,43	13,6
	56	52,31	38,73	37,29-67,33	47,8
	84	70,16	34,66	56,72-83,61	62,75
	365	19,49	11,94	14,66-24,31	20,25
Algorithmus 3	0	89,56	30,9	77,58-101,54	91,3
	28	98,31	36,39	84,2-112,42	94,6
	56	132,78	42,04	116,48-149,08	136,95
	84	160,81	41,88	144,57-177,05	167,75
	365	90,67	32,99	77,34-104,0	87,55

Tabelle B.1: Beschreibende Statistik des *Western Blot*
 PC = Positivkontrolle

Algorithmus	Tag	\bar{x}	σ	95%-KI	\tilde{x}
Algorithmus 4	0	12,48	11,28	8,1-16,85	10,55
	28	22,07	21,38	13,78-30,36	18,1
	56	58,3	35,1	44,69-71,91	60,9
	84	75,68	38,18	60,88-90,49	79,8
	365	27,7	30,29	15,48-39,95	23,15
Algorithmus 1 : PC	0	0,33	0,34	0,2-0,46	0,26
	28	0,58	0,54	0,37-0,79	0,45
	56	1,52	0,95	1,15-1,89	1,3
	84	1,82	1,06	1,41-2,23	1,69
	365	0,58	0,44	0,4-0,75	0,49
Algorithmus 2 : PC	0	8,91	45,94	-8,9-26,73	0,17
	28	0,7	0,93	0,34-1,06	0,38
	56	2,57	5,97	0,25-4,88	1,29
	84	8,12	34,09	-5,1-21,34	1,66
	365	4,64	21,22	-3,93-13,21	0,45
Algorithmus 3 : PC	0	1,39	0,54	1,18-1,6	1,34
	28	0,56	0,6	0,33-0,8	0,43
	56	2,08	0,71	1,8-2,35	2,11
	84	2,39	0,67	2,13-2,65	2,37
	365	1,4	0,61	1,15-1,64	1,34
Algorithmus 4 : PC	0	0,33	0,35	0,19-0,47	0,24
	28	22,07	21,38	13,78-30,36	18,1
	56	1,51	0,93	1,15-1,87	1,3
	84	1,75	0,97	1,37-2,12	1,56
	365	0,67	0,71	0,38-0,95	0,47

Tabelle B.2: Beschreibende Statistik der logarithmierten Daten des *Western Blot*
 PC = Positivkontrolle

Algorithmus	Tag	\bar{x}	σ	95%-KI	\tilde{x}
Algorithmus 1	0	2,25	1,02	1,85-2,64	2,56
	28	2,85	0,94	2,48-3,21	2,92
	56	3,91	0,76	3,62-4,21	4,17
	84	4,24	0,72	3,96-4,52	4,46
	365	2,96	0,94	2,59-3,36	3,33
Algorithmus 2	0	1,78	1,31	1,27-2,28	1,93
	28	2,48	1,29	1,98-2,98	2,68
	56	3,47	1,37	2,94-4	3,89
	84	4,13	0,57	3,91-4,35	4,15
	365	2,76	0,87	2,41-3,11	3,06
Algorithmus 3	0	4,44	0,37	4,3-4,59	4,52
	28	4,52	0,42	4,36-4,67	4,56
	56	4,83	0,42	4,67-4,99	4,93
	84	5,05	0,3	4,93-5,16	5,13
	365	4,45	0,39	4,39-4,61	4,48
Algorithmus 4	0	2,23	0,98	1,85-2,61	2,45
	28	2,67	1,13	2,23-3,11	2,95
	56	3,85	0,79	3,54-4,16	4,13
	84	4,18	0,65	3,92-4,43	4,39
	365	2,91	1,13	2,45-3,36	3,18
Algorithmus 1 : PC	0	0,26	0,22	0,17-0,34	0,23
	28	0,41	0,29	0,3-0,52	0,37
	56	0,85	0,39	0,7-1,0	0,83
	84	0,97	0,38	0,82-1,12	0,99
	365	0,42	0,25	0,32-0,53	0,4
Algorithmus 2 : PC	0	0,38	1,02	-0,02-0,77	0,15
	28	0,44	0,4	0,28-0,59	0,32
	56	0,92	0,65	0,67-1,17	0,83
	84	1,09	0,87	0,75-1,42	0,98
	365	0,53	0,88	0,18-0,89	0,37

Tabelle B.3: Beschreibende Statistik des *ELISA*

Gruppe	Tag	\bar{x}	σ	95%-KI	\tilde{x}
I	0	0	0	-	0
	28	0,13	0,19	-0,03-0,29	0
	56	0,79	0,46	0,41-1,18	0,74
	84	1,39	0,72	0,78-1,99	1,17
	365	0,2	0,12	0,1-0,3	0,19
II	0	0	0	-	0
	28	0,15	0,21	0,01-0,3	0
	56	1,08	1,13	0,27-1,89	0,83
	84	1,41	0,86	0,8-2,03	1,45
	365	0,4	0,44	0,06-0,74	0,27
III	0	0,04	0,09	-0,02-0,11	0
	28	0,36	0,34	0,12-0,61	0,31
	56	0,79	0,49	0,43-1,14	0,82
	84	1,4	0,6	0,96-1,83	1,39
	365	0,27	0,11	0,19-0,35	0,26

Tabelle B.2: Beschreibende Statistik der logarithmierten Daten des *Western Blot*
PC = Positivkontrolle

Algorithmus	Tag	\bar{x}	σ	95%-KI	\tilde{x}
Algorithmus 3 : PC	0	0,85	0,21	0,77-0,93	0,85
	28	0,91	0,25	0,81-1,0	0,92
	56	1,1	0,26	1,0-1,19	1,13
	84	1,2	0,21	1,12-1,28	1,22
	365	0,85	0,25	0,75-0,95	0,85
Algorithmus 4 : PC	0	0,26	0,22	0,17-0,34	0,22
	28	0,39	0,32	0,27-0,52	0,36
	56	0,85	0,38	0,7-1,0	0,83
	84	0,95	0,35	0,82-1,09	0,94
	365	0,45	0,34	0,31-0,58	0,39

Tabelle B.4: Beschreibende Statistik des *ELISPOT*

Gruppe	Tag	\bar{x}	σ	95%-KI	\tilde{x}
I	0	0	0	-	0
	84	6,81	6,17	1,65-11,97	8
	365	3,31	4,97	-0,84-7,47	0,75
II	0	0	0	-	0
	84	13,6	13,14	4,2-23,0	9,25
	365	2,89	2,26	1,15-4,63	3
III	0	0	0	-	0
	84	17,25	20,7	2,44-32,06	13,75
	365	9,33	11,11	0,8-17,87	4,5

Tabelle B.5: Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich des Algorithmus 3 des *Western Blot* mit dem *ELISA*

	r	95%-KI	p
Differenz Tag 28 - Tag 0	0,297	-0,1-0,61	0,1406
Differenz Tag 56 - Tag 28	0,3618	-0,02-0,65	0,0637
Differenz Tag 84 - Tag 56	0,1398	-0,25-0,49	0,4869
Differenz Tag 84 - Tag 365	0,5539	0,2-0,78	0,0041
Differenz Tag 84 - Tag 365 ohne Proband 25	0,466	0,08-0,73	0,0217
Differenz Tag 84 - Tag 0	0,3791	-0,01-0,67	0,0561
Differenz Tag 84 - Tag 0 ohne Proband 25	0,1038	-0,3-0,48	0,6216

B.0.2 Deskriptive Statistik des *ELISA*

B.0.3 Deskriptive Statistik des *ELISPOT*

B.1 Vergleich der Ergebnisse des *Western Blot* mit denen des *ELISA* und des *ELISPOT*

B.1.1 Vergleich der Veränderung über die Zeit

Tabelle B.6: Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich der Quotienten aus Algorithmus 1 und Positivkontrolle des *Western Blot* mit dem *ELISA*

	r	95%-KI	p
Differenz Tag 28 - Tag 0	-0,0393	-0,42-0,35	0,8487
Differenz Tag 56 - Tag 28	0,433	0,06-0,7	0,241
Differenz Tag 84 - Tag 56	0,4037	0,03-0,68	0,0368
Differenz Tag 84 - Tag 365	0,571	0,23-0,79	0,0029
Differenz Tag 84 - Tag 365 ohne Proband 25	0,4737	0,09-0,74	0,0194
Differenz Tag 84 - Tag 0	0,8519	0,69-0,93	<0,0001*
Differenz Tag 84 - Tag 0 ohne Proband 25	0,4593	0,08-0,72	0,0209

Tabelle B.7: Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich der Quotienten aus Algorithmus 3 und Positivkontrolle des *Western Blot* mit dem *ELISA*

	r	95%-KI	p
Differenz Tag 28 - Tag 0	0,282	-0,12-0,6	0,1628
Differenz Tag 56 - Tag 28	0,3755	-0,01-0,66	0,0536
Differenz Tag 84 - Tag 56	0,0231	-0,16-0,56	0,2464
Differenz Tag 84 - Tag 365	0,5539	0,2-0,78	0,0041
Differenz Tag 84 - Tag 365 ohne Proband 25	0,466	0,08-0,73	0,0217
Differenz Tag 84 - Tag 0	0,3434	-0,05-0,65	0,0859
Differenz Tag 84 - Tag 0 ohne Proband 25	0,0767	-0,33-0,46	0,7154

Tabelle B.8: Paarweise Korrelation der Veränderung über die Zeit. Vergleich des *ELISPOT* mit dem Algorithmus 3 des *Western Blot* sowie der Quotienten aus Algorithmus 1 und Positivkontrolle und aus Algorithmus 3 und Positivkontrolle

Korrelation des <i>ELISPOT</i> mit dem Algorithmus 3 des <i>Western Blot</i>			
	r	95%-KI	p
Differenz Tag 84 - Tag 365	0,4939	0,05-0,77	0,0316
Differenz Tag 84 - Tag 365 ohne Proband 25	0,4335	-0,04-0,75	0,0723
Korrelation des <i>ELISPOT</i> mit dem Quotient des Algorithmus 1 des <i>Western Blot</i>			
	r	95%-KI	p
Differenz Tag 84 - Tag 365	0,532	0,1-0,79	0,019
Differenz Tag 84 - Tag 365 ohne Proband 25	0,5812	0,16-0,82	0,0114
Korrelation des <i>ELISPOT</i> mit dem Quotient des Algorithmus 3 des <i>Western Blot</i>			
	r	95%-KI	p
Differenz Tag 84 - Tag 365	0,4939	0,05-0,77	0,0316
Differenz Tag 84 - Tag 365 ohne Proband 25	0,4335	-0,04-0,75	0,0723