

Aus dem Institut für Pathologie  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.  
Direktor: Prof. Dr. Martin Werner

**Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Frage  
der intraerythrozytären Eisenverteilung im Rahmen  
der initialen Hämozoinbildung bei *Malaria tropica***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der  
Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2008  
von Jonathan Aaron Baudhuin  
geboren in Winona, Minnesota, USA

**Dekan: Prof. Dr. Christoph Peter**

**1. Gutachter: Prof. Dr. H.-E. Schaefer**

**2. Gutachter: Prof. Dr. M. Kist**

**Promotionsjahr: 2009**

## Curriculum vitae

Ich, Jonathan Aaron Baudhuin, das siebte und jüngste\* Kind von Joy Anne Thern und Neil Reynolds Baudhuin († 21.12.2003), wurde am 12. Dezember 1969 am Fuße von Sugar Loaf (*Zuckerhut*), dem Hausberg meiner Heimatstadt Winona, Minnesota, geboren. In dieser großen Kleinstadt am Mississippi wuchs ich mit meinen 3 Schwestern sowie meinen 3



Brüdern auf. Nach Abschluss meiner Schulausbildung an der Winona Senior High School 1988 verließ ich meine Heimatstadt, um an der Universität von Wisconsin in Madison meine Studien zu beginnen. Dort begann ich mit dem Hauptfach Physik, beendete 1992 das Studium aber letztendlich mit einem Abschluss in Fremdsprachen (Deutsch, Sanskrit, Französisch, Schwedisch und Nepalesisch). Während des Studiums lernte ich Deutschland und Europa während eines Auslandsjahres (1990-1991) in Freiburg kennen, wohin ich später auch zurückkehren sollte. Herbst 1992 verbrachte ich drei Monate in Nepal, um meine Sprachkenntnisse zu verfestigen. Anfang 1993 begann ich ein Aufbaustudium in Chemie und Biologie, in Vorbereitung auf die amerikanische Medizinerprüfung. November 1994 entschloss ich mich, nach Freiburg zurückzukehren und begann Herbst 1997 mein Medizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg, wo ich 2000 das Physikum bzw. 2001 das 1. Staatsexamen ablegte. Während des vorklinischen Studiums war ich mit einem akademischen Orchester als Timpanist dreimal auf Konzertreise in Italien und verbrachte Sommer 2002 zwei Wochen auf Tournee in Japan als Gastsänger im Domsingknabenchor des Freiburger Münsters. Herbst 2002 zog ich nach Kiel, wo ich ab Wintersemester 2004 an der Christian-Albrechts-Universität von Kiel im 10. Fachsemester immatrikuliert war und 2005 dort mein 2. Staatsexamen ablegte. Mein Praktisches Jahr (2005-2006) absolvierte ich gänzlich im Ausland – Kiruna/Schweden, Namur/Belgien und in Kiel – und in 3 verschiedenen Fremdsprachen. November 2006 legte ich mit Freude und Erfolg mein 3. Staatsexamen ab. Anfang 2007 arbeitete ich als freiberuflicher Übersetzer und als Korrektor eines Nepalesisch-Englischen Wörterbuchs. Seit April 2007 arbeite ich im Norddeutschen Epilepsiezentrum in Raisdorf (bei Kiel) als ärztlich-wissenschaftlicher Mitarbeiter. Im Rahmen dieser Tätigkeit hielt ich Juli 2008 auch 2 Vorträge über die elektronische Epilepsie-Dokumentation in Kliniken in Melbourne, Australien. 2009 möchte ich meine Facharztausbildung beginnen.

---

\*Ein vierter Bruder namens Zachary verstarb kurz nach seiner Geburt im Jahre 1971.

## D a n k s a g u n g

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. em. Dr. H.-E. Schaefer für die Überlassung des Themas und für seine „offene Tür“ für Gespräche und Diskussionen herzlich bedanken. Speziell schätze ich die Geduld, die er in dem ausgedehnten Betreuungszeitraum aufbringen konnte. Außerdem bin ich für die Anregungen von ihm sowie dem Zweitgutachter Prof. Dr. Kist vom Institut für Mikrobiologie sehr dankbar.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Hildebrandt und Frau Kost vom Institut für Pathologie danke ich für die Anfertigung der Schnitte. Frau Hildebrandt hat mich freundlicherweise in Techniken der Schnitthanfertigung sowie deren Montage auf Träger eingewiesen, was zwar lange zurückliegt aber nicht vergessen ist. Und Frau Kost war trotz großer Arbeitsbelastung immer bemüht, meine Arbeit zu unterstützen, soweit sie das neben ihren vielen anderen Tätigkeiten konnte.

Für die freundliche Bereitstellung des Libra 120 bedanke ich mich herzlich bei den Dres. Bueble und Boese der Firma Zeiss in Oberkochen. Besonders schätze ich die Bereitschaft von Dr. Boese, mit mir eine zweite Analyse durchzuführen, die die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit erheblich steigerte.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Freunden Gertrud Heber und Peter Häußler, die mir bei der Korrektur des Erstentwurfs (und auch sonst!) ganz wesentlich geholfen haben.

Mit Stolz und Trauer möchte ich mich bei meiner inzwischen verstorbenen Deutschlehrerin meiner High-School, Frau Susan Fey Hoffe, bedanken. Sie verzieh mir stillschweigend mein „Kasperletum“ und unterstützte mit ihrem Verständnis die Neugier, derer ich mir noch nicht bewusst war. Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Physik-Lehrer Mr. Virgil Riggle bedanken, der auf ähnliche Weise meine Rastlosigkeit akzeptierte und versuchte, meine Wissbegierde zu fördern und liebevoll zu lenken.

Außerordentlich dankbar bin ich der lieben Frau Elisabeth Demuth, der ehemaligen und letzten Bibliothekarin des Pathologischen Instituts, die mich ermutigte diese Doktorarbeit anzunehmen, mir bei der Literatur-Suche half und mir in den letzten 7 Jahren immer wieder Mut machte, mein Studium und die Arbeit abzuschließen.

Als Letztes bedanke ich mich bei meiner Mutter, die mich beim Erreichen meiner Träume immer, vorbehaltlos und liebevoll unterstützte.

# **Inhaltsverzeichnis**

---

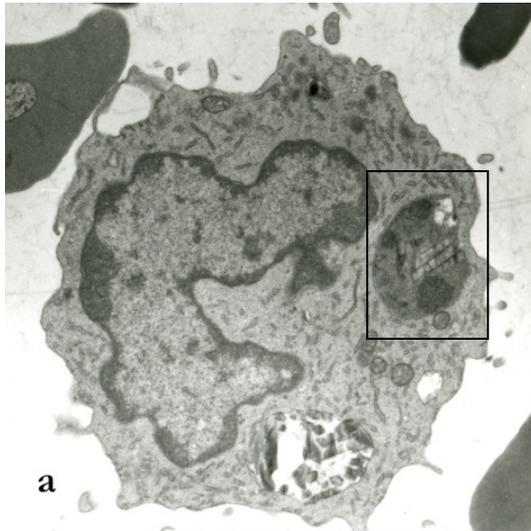
	<i>Seite</i>
Abkürzungsverzeichnis	6
Einleitung	7
Material und Methoden	13
Ergebnisse	15
Diskussion	26
Zusammenfassung	32
<i>Summary</i>	33
Anhang	34
Literaturverzeichnis	36

## Abkürzungsverzeichnis

<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DDT</b>	Dichlordiphenyltrichloräthan
<b>DV</b>	Digestionsvakuole
<b>EELS</b>	Elektronenenergieverlust-Spektroskopie ( <i>electron energy loss spectroscopy</i> )
<b>EFTEM</b>	Energiefilter- Transmissionselektronenmikroskopie ( <i>energy-filter transmission electron microscopy</i> )
<b>Ery</b>	Erythrozyt
<b>FPIX</b>	Ferriprotoporphyrin IX
<b>FV</b>	Fressvakuole
<b>HRP</b>	<i>Histidine-rich protein</i>
<b>Pf</b>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<b>PPM</b>	Parasitäre Plasmamembran
<b>PV</b>	Parasitophore Vakuole
<b>PVM</b>	Parasitophore Vakuolenmembran
<b>RV</b>	Residualvakuole
<b>TEM</b>	Transmissionselektronenmikroskopie
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TV</b>	Transportvesikel

## Einleitung

*Plasmodium falciparum* samt seinen verwandten Arten *P. vivax*, *malariae*, und *ovale* ist heute die Todesursache von jährlich etwa 2-3 Millionen Menschen weltweit, wobei die meisten Todesfälle vom *P. falciparum* (*Malaria tropica*) verursacht werden. Pro Jahr



**Abb. 1a, b**

**a)** Übersicht eines Monozyten mit intralysosomalen Hämzinkristallen. (M233: kontrastiert; Vergr. 7.000X)  
**b)** (aus **a**) Hämzinkristalle (Pfeil) eingebettet in die dichte Matrix eines Phagolysosoms. (M234: kontrastiert, Vergr. 18.000X)

erkranken bis zu 500 Millionen Menschen an einer der verschiedenen Formen von Malaria<sup>25</sup>. Diese überraschenden Tatsachen geben angesichts der einst besseren Therapierbarkeit einiger Stämme (siehe zunehmende Chloroquin-Resistenz) und mancherorts auch gelungener Ausrottungserfolge (u.a. mit DDT) daher jedem neuen Ansatz, diesen heimtückischen Organismen auf den Grund zu kommen, Sinn und Recht.

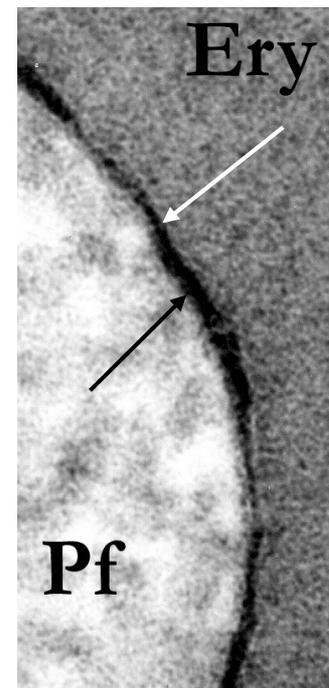
1880 entdeckte der französische Arzt und spätere Nobelpreisträger Laveran, der zu dieser Zeit für die Armee in Algerien tätig war, den für die Malaria-Erkrankung verantwortlichen Parasiten *Plasmodium*. Im Rahmen seiner Untersuchungen fielen ihm u.a. „Pigmentkörnchen“ (Abb. 1) auf, die lichtmikroskopisch in ungefärbten Leukozyten von malariakranken Patienten zu sehen waren<sup>31</sup>. Im Jahre 1886 zeigte Golgi als erster, dass die bei Malariakranken bekannten Fieberparoxysmen mit der Segmentierung der Plasmodien und die Schwere der Symptomatik mit der Anzahl der im Blut befindlichen Parasiten korrelierten<sup>23</sup>. Die späteren Arbeiten von Ross, der 1898 den

gesamten Zyklus des *Vogelplasmodium* aufzeigte, sowie die der Italiener Grassi, Bignami und Bastianelli, die den Zyklus bei der humanen Form, aber auch der parasitenspezifischen Abhängigkeit von der *Anopheles*-Mücke aufzeigten, trugen wesentlich zur Vervollständigung des damaligen Kenntnisstandes dieser parasitären Erkrankung bei<sup>12</sup>.

Es sollte sich später herausstellen, dass Laverans Befund von den Pigmentkörnchen von größerer Bedeutung ist, als zunächst klar war. Denn drei Jahrzehnte nach seinem Fund postulierte Brown, dass just diese Körnchen – seinerzeit bekannt als Melanin oder Hämatin – der wesentliche Faktor in der Pathophysiologie des Malaria-Fiebers<sup>7</sup> sind. Trotz alledem maß man noch bis vor wenigen Jahren den heute als **Hämozoin**<sup>43</sup> oder **Malariapigment** bekannten Pigmentkörnchen wenig pathophysiologische Bedeutung bei<sup>4</sup>. Inzwischen ist aber dem Hämozoin eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Malariafiebers nicht mehr abzustreiten<sup>42</sup>.

Interessant ist auch anzumerken, dass Laveran schon mit seinem intraleukozytären Hämozoinfund jener Quelle des Malariafiebers nicht näher hätte sein können: Die leukozytäre Aufnahme von Hämozoin und die dadurch ausgelöste Ausschüttung von pyrogenen Zytokinen (u.a. TNF) ist letztendlich eine wesentliche Ursache des Fiebers<sup>42</sup>.

*Plasmodium falciparum* gehört (wie auch *Toxoplasma gondii*) zu den obligat intrazellulären Parasiten, den sogenannten Apicomplexa (Sporozoen), welche mit Hilfe von spezialisierten Organellen aktiv in die Wirtszellen eindringen<sup>33</sup>, in denen die asexuelle Vermehrung der Plasmodien stattfindet. Bei der Invasion von plasmodialen **Merozoiten** in menschliche Erythrozyten bildet sich eine Vakuole um die Merozoiten herum, die ursprünglich nur erythrozytäre Membrananteile enthält. Diese Membran bezeichnet man als **parasitophore Vakuolenmembran (PVM)**(weißer Pfeil, Abb. 2), die durch sie gebildete Vakuole



**Abb. 2**

(Ausschnitt aus Abb. 6a) Pfeile zeigen auf die beiden Membrane (schwarz > PPM, weiß > PVM), die ein intraerythrozytäres Plasmodium umgeben. (Pf = *Plasmodium falciparum*., Ery = Erythrozyt)

dementsprechend die parasitophore Vakuole (PV)(schwarzer Bereich, Abb. 2). Später tragen parasitäre Proteine sowie Membrananteile wesentlich zur Vergrößerung der PVM sowie zu deren Funktion bei<sup>38, 11</sup>. Die PVM bietet den Plasmodien also Schutz, da keine direkte Verbindung zwischen dem erythrozytären Cytosol und der parasitären Plasmamembran (PPM) (schwarzer Pfeil, Abb. 2) besteht, und verhindert zudem die Übersäuerung der PV<sup>33</sup>. (Siehe auch Abb. 15 im Anhang für eine schematische Übersicht der Membrananordnung.)

Sobald die Plasmodien in die Zelle gelangt sind, beginnt der intrazelluläre Replikationszyklus, der insgesamt ca. 48 Stunden dauert. Zu Beginn dieses Zyklus befindet sich das Plasmodium im **Ringstadium** (der flachen, diskoiden Form nach), das 20-24 Stunden andauert und auf das das so genannte **Trophozoitenstadium** folgt. Im Verlauf dieser beiden Stadien – insgesamt etwa 36 Stunden – reift das Plasmodium mit Hilfe einer Vielzahl, fast ausschließlich durch das Plasmodium selbst gesteuerter biochemischer Vorgänge<sup>33</sup> zu **Schizonten** heran, die durch Teilung der reifen Trophozoiten entstehen<sup>5</sup>.

Von diesen drei Stadien sind es die Ringformen und v.a. die Trophozoiten, die erythrozytäres Hämoglobin abbauen, und zwar in der Regel etwa 75% eines Erythrozyten<sup>29</sup>, in vollreifen Schizonten sogar bis zu fast 100%. Dieser Abbau findet innerhalb weniger Stunden im Rahmen eines sehr geordneten Prozesses statt<sup>21</sup>.

Die Grundlagen unseres Wissens schufen Aikawa, Huff und Sprinz<sup>2</sup> schon vor mehr als 40 Jahren mit ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen von dem Ablauf und der Lokalisation dieser Abbauprozesse, die dann infolge der Weiterentwicklung der inzwischen eher in den Hintergrund getretenen Elektronenmikroskopie 1990 von Slomianny<sup>44</sup> erweitert werden konnten. Bekannt ist, dass bereits Ringplasmodien und frühe Trophozoiten erythrozytäres Cytosol durch **Mikropinozytose** (Oberflächenphagotrophie) aufnehmen<sup>44, 30, 40</sup> um das darin enthaltene Hämoglobin abbauen zu können. Dabei stülpt sich eine verhältnismäßig kleine Menge erythrozytären Cytosols – umgeben von einer Doppelmembran (außen die PPM, innen die PVM) – in das Plasmodium hinein und bildet so eine so genannte Fressvakuole (FV, auch *food vacuole*). Später verlieren diese Fressvakuolen die innere, ursprüngliche

PVM und erscheinen unimembranös und können auch je nach Alter bereits ein Hämozinkristall enthalten<sup>2, 30, 40, 34, 41</sup>. Dieser Prozess der Oberflächenphagotrophie<sup>34</sup> wird im Laufe der Reifung im Trophozitenstadium zunehmend durch ein so genanntes **Cytostomensystem**<sup>2, 34</sup> ersetzt (siehe Abb. 3).

Die Cytostomen imponieren im Parasitencytosol je nach Schnitt als große, runde oder eiförmige Hämoglobintaschen (eingestülptes Erythrozytencytosol). Ein einzelner Parasit kann bis zu 5-6 solcher Cytostomen enthalten<sup>30</sup>, die in der 3-dimensionalen Darstellung wie Schläuche erscheinen<sup>44</sup>. Diese verschiedenen Cytostomen sind oft tatsächlich miteinander verbunden.

In diesen Cytostomen findet jedoch kein Abbau statt, sondern es stülpen sich bimembranöse Vakuolen von der Oberfläche aus, die dann ins Innere des Plasmodiums hineinwandern. Zurzeit existieren zwei unterschiedliche Theorien über die Funktion dieser Vakuolen. Die eine besagt, dass dies in der Tat Fressvakuolen sind, in denen

bereits Hämoglobinabbau stattfindet und die sich samt Hämozoin später zu einer unimembranösen, sogenannten **Residualvakuole (RV)** vereinen<sup>44, 28</sup>. Die andere Theorie besagt dagegen, dass es sich um **Transportvesikeln (TV)** handelt, die ihren Inhalt inklusive der inneren Membran an eine **Digestionsvakuole (DV)** abgeben, in der der Hämoglobinabbau später stattfinden wird<sup>47</sup>. In beiden Fällen verschmilzt die äußere Membran der FV oder TV mit der der Residual- bzw. Digestionsvakuole.

Welche Theorie auch immer man für die glaubwürdigste hält, fest steht, dass aus dem Hämoglobinabbau Hämozinkristalle resultieren; eine Aussage über die primäre Lokalisation der Kristallbildung kann jedoch nicht getroffen werden. Es lässt sich



**Abb. 3**

Intraerythrozytäres Plasmodium mit Cytostomensystem. (KB82: kontrastiert, + DAB, Vergr. 8.700X)

nämlich zwischen der mikroskopischen Erscheinung von eindeutigen Hämozoinkristallen – ob in Transportvesikeln oder Residualvakuolen – und dem tatsächlichen Ort der Bildung keine Verbindung herstellen. Denn dort, wo die Kristalle auf der molekularen Ebene (ein dem Betrachter verborgener Vorgang) tatsächlich anfangen sich zu bilden, muss nicht auch die Stelle sein, wo sie in voll entwickelter Form und Größe beobachtet werden. Dies nicht zuletzt auch deswegen, weil die parasitäre Doppelmembranhülle an so vielen Zelltransportfunktionen beteiligt ist.

Abgesehen von der wichtigen Rolle, die Hämozoin in der klinischen Manifestation der Malaria spielt, kommt neuen Erkenntnissen zur Entstehung der Hämozoinkristalle eine große Bedeutung zu, da deren Bildung für das Überleben der Plasmodien unentbehrlich ist. Prinzipiell stellt die Fähigkeit bzw. Notwendigkeit von Plasmodien, Hämoglobin abzubauen, einen entscheidenden *modus operandi et vivendi* dar, um unter anderem dessen Aminosäuren verwerten zu können<sup>29</sup>. Beim Abbau des erythrozytären Hämoglobins würde aber bei Öffnung des Porphyrinringes zumindest intermediär ionisiertes Eisen freigesetzt, das zur Bildung von Sauerstoffradikalen neigt, die für die Plasmodien toxisch wären. Der von Metazoen gewählte Ausweg, ionisiertes Eisen an Apoferritin zu binden bzw. in Ferritin zu integrieren, steht den Plasmodien nicht zur Verfügung. Stattdessen bleibt der Porphyrinring des aus dem Abbau von Häm gebildeten Ferriprotoporphyrins IX (FPIX)<sup>\* 35</sup> geschlossen und kristallisiert zu unlöslichem  $\beta$ -Hämatin (siehe Abb. 14 im Anhang). Dort ist das Eisen als Chelat so fest gebunden, dass es auch mit der Berlinerblaufärbung nicht nachweisbar ist. Durch die Bildung von  $\beta$ -Hämatin entgehen die Plasmodien dem möglichen ferrotxischen Insult. Es ist eben diese Bildung von  $\beta$ -Hämatin, die wiederum durch einige der wichtigsten heute verfügbaren Malariamedikamente (u.a. Chloroquin und verwandte Alkaloide) blockiert wird, was die Bedeutung dieses Pigments umso mehr unterstreicht<sup>8</sup>. Der genaue Wirkmechanismus dieser Medikamente, der Mechanismus der Hämozoinbildung, aber auch der genaue Ort der Bildung sind noch nicht im Detail geklärt.

---

\* Grundbaustein von  $\beta$ -Hämatin sowie Hämozoin, beides Polymere, die aus Dimeren des Ferriprotoporphyrins IX (FP IX) bestehen, dessen Zentralatom ein dreiwertiges Eisenatom ist. Siehe Abb.14 Anhang.

Neben der Frage nach dem Ort bzw. Mechanismus der Hämozoinbildung ist in diesem Zusammenhang auch die Frage bedeutsam, ob freies (ionisiertes) Eisen im plasmodialen, intraerythrozytären Stoffwechsel überhaupt vorkommt. In der Tat besteht die Möglichkeit, dass das im Häm gebundene Eisen in Anwesenheit von Peroxyd sowie ausreichend niedrigem pH vom Porphyrinring gelöst werden kann<sup>18, 27, 39, 26</sup>. Dieses freie Eisen könnte seinerseits von Plasmodien zur Synthese eisenhaltiger Proteine genutzt werden, die für deren Überleben lebensnotwendig sind<sup>36</sup>, eine Tatsache, die das Vorkommen von freiem Eisen in angemessen limitiertem Ausmaß wahrscheinlich macht. Stoffwechselforgänge, die freies Eisen entweder erzeugen oder es zur anderweitigen Proteinbildung nutzen, sind wegen minimaler Konzentration elektronenmikroskopisch unsichtbar (siehe auch Egan *et al.* [2002]<sup>14</sup>). Eine elektronenmikroskopisch nachweisbare Eisendichte ist aber im Zusammenhang mit der Hämozoinbildung zu erwarten.

### *Fragestellung*

Da zu erwarten ist, dass der Abbau des Proteinanteiles von Hämoglobin mit einer örtlich zunehmenden Konzentration von FPIX und somit von Eisen verbunden ist, soll in dieser Arbeit elektronenmikroskopisch untersucht werden, an welchen Orten eine Eisenanreicherung als Hinweis auf eine initiale Hämozoinbildung nachweisbar ist.

## Material und Methoden

---

Untersucht wurde Archivmaterial, das von mit *Plasmodium falciparum* infiziertem Blut (Tab. 1) aus dem westafrikanischen Land Ghana stammt. Im Rahmen der Primärdiagnostik wurde ein Teil des antikoagulierten Blutes von 4 unbehandelten Patienten zur elektronenmikroskopischen Untersuchung asserviert. Alle Patienten waren während der Regenzeit mit dem Malaria-Erreger infiziert worden. Die Diagnose einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* wurde lichtmikroskopisch am Dicken Tropfen gestellt. Das Blut wurde als Suspension vor Ort mit 3%-igem Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer fixiert.

Patient	Untersuchungsmaterial
1 (S.A.)	B42-01
2 (D.A.)	B43-01
3 (R.B.)	B51-01
	B76-01 + DAB
	B107-03 ohne Zusatz von $K_3FeCN_6$
4 (N.A.)	B52-01
	B75-01 + DAB
	B108-03 ohne Zusatz von $K_3FeCN_6$

**Tabelle 1**

In der linken Spalte sind die Patienten aufgeführt, von denen das Blut stammt. In der rechten Spalte erscheinen die entsprechenden Nummern der Schnitte, die untersucht wurden. (3,3-Diaminobenzidin = DAB,  $K_3FeCN_6$  = Kaliumhexacyanoferrat)

Die in Glutaraldehyd fixierten, suspendierten Blutzellen wurden in Saccharoselösung gewaschen, osmiert, standardmäßig entwässert, in Epon eingebettet und anschließend ultradünn geschnitten.

Es wurden zusätzlich Blutzellen der Patienten 3 und 4 (B75/76-01) vor Osmierung 3 Minuten in 3,3'-Diaminobenzidin<sup>∇</sup> (DAB) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nach Graham und Karnovsky [1966]<sup>24</sup>) inkubiert. Wahlweise wurde die Osmierung mit und ohne (B107/108-03) Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat durchgeführt. Von allen Schnitten wurden sowohl normal kontrastierte als auch unkontrastierte Schnitte gemacht. Alle Ultradünnschnitte wurden mit konventioneller Technik hergestellt und auf Grids montiert. Zudem wurden vom Block B75/01 Serienschnitte (Dicke von ca. 90 nm) angefertigt, die anschließend auf befilmte Schlitzträger montiert wurden.

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Elektronenmikroskop vom Typ **Phillips TEM CR10** untersucht. Außer der konventionellen transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Untersuchung wurde eine weitere Analyse der kontrastierten und unkontrastierten Schnitte (Schnittdicke = 70 nm) B52-01 und B108-03 mit einem **Zeiss Libra 120\*** durchgeführt. Hierbei wurden die Präparate sowohl unter Energiefiltrierung (**EFTEM**, *energy filter transmission electron microscopy*) als auch mit der Elektronenenergieverlust-Spektroskopie, der sogenannten **EELS** (*electron energy loss spectroscopy*) untersucht. Bei der EFTEM handelt es sich um ein Verfahren der elektronenmikroskopischen Bilderzeugung, bei der kontrast-reduzierende (gestreute) Elektronen herausgefiltert werden, was (durch erhöhten Kontrast) zu einer erheblichen Verbesserung der Bildqualität führt<sup>48</sup>. Mit der EELS lässt sich die elementare Zusammensetzung eines ausgewählten Bereichs im Präparat bestimmen. Hierbei wird ein ausgewählter Bereich monoenergetisch (d.h. schmale Bandbreite der Strahlenenergie) durchstrahlt. Anhand der elementspezifischen Absorptionen, die bei der Durchstrahlung des Präparats stattfinden, kann ein so genanntes Energieverlustspektrum erstellt werden, das eine Aussage über das Vorkommen von einem gesuchten Element im Präparat erlaubt<sup>49</sup>.

---

<sup>∇</sup> 3,3'-Diaminobenzidin ist ein bicyklisches, aromatisches Amin, das zur Darstellung von Hämoglobin verwendet werden kann. Dabei macht man sich die Pseudoperoxidase-Aktivität von Hämoglobin in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Nutze. Oxydiertes Diaminobenzidin gibt mit OsO<sub>4</sub> einen hohen Kontrast, der die Hämoglobinverteilung in Erythrozyten hervorhebt.

\* Mit sehr freundlicher Unterstützung der Dres. Boese und Bueble der Firma Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen.

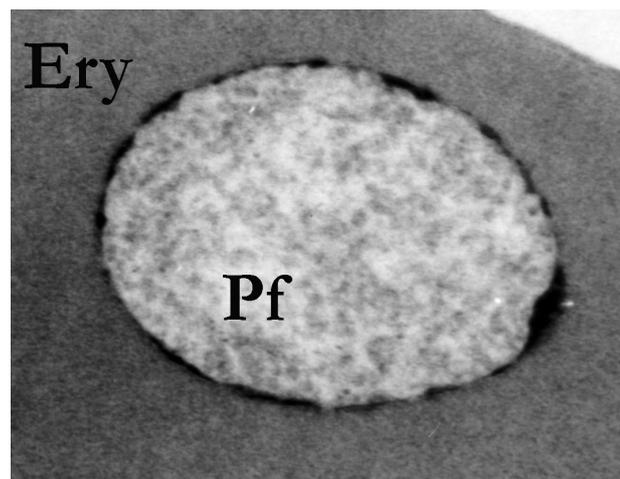
## Ergebnisse

---

Alle Präparate wurden im Hinblick auf den Plasmodienbefall der Erythrozyten aber vor allem auf das Vorkommen von kristallinem Hämozoin bzw. elektronendichten Strukturen und Arealen als möglicher Hinweis auf eine Eisenanreicherung in oder um die Plasmodien herum untersucht.

Bei einer ersten Untersuchung der Präparate zeigte sich, dass der Plasmodienbefall bei Patienten 1, 2 und 3 relativ gering war. Die weiteren Untersuchungen wurden deshalb nur mit den Präparaten von Patient 4 gemacht. Von Plasmodien befallen waren im Durchschnitt ca. 40% der Erythrozyten in den Präparaten dieses Patienten.

Insbesondere war der Bereich zwischen der parasitären Plasmamembran (PPM) und der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) – also der Inhalt der parasitophoren Vakuole (PV) – in weit über der Hälfte der befallenen Zellen auffällig elektronendicht. Vor allem in den in Diaminobenzidin vorbehandelten Präparaten B75-01 war der Inhalt der PV bei der konventionellen TEM- sowie der EFTEM-Untersuchung auffallend elektronendicht. Die fotografisch dokumentierten Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden erörtert.



**Abb. 4**

Intraerythrozytäres Plasmodium mit elektronendichter parasitophorer Vakuole (unregelmäßige, schwarze Umrandung des eiförmigen Plasmodiums). (Pf = *Plasmodium falciparum*, Ery = Erythrozyt) (KB54: kontrastiert, + DAB, Vergr. 24.500X)

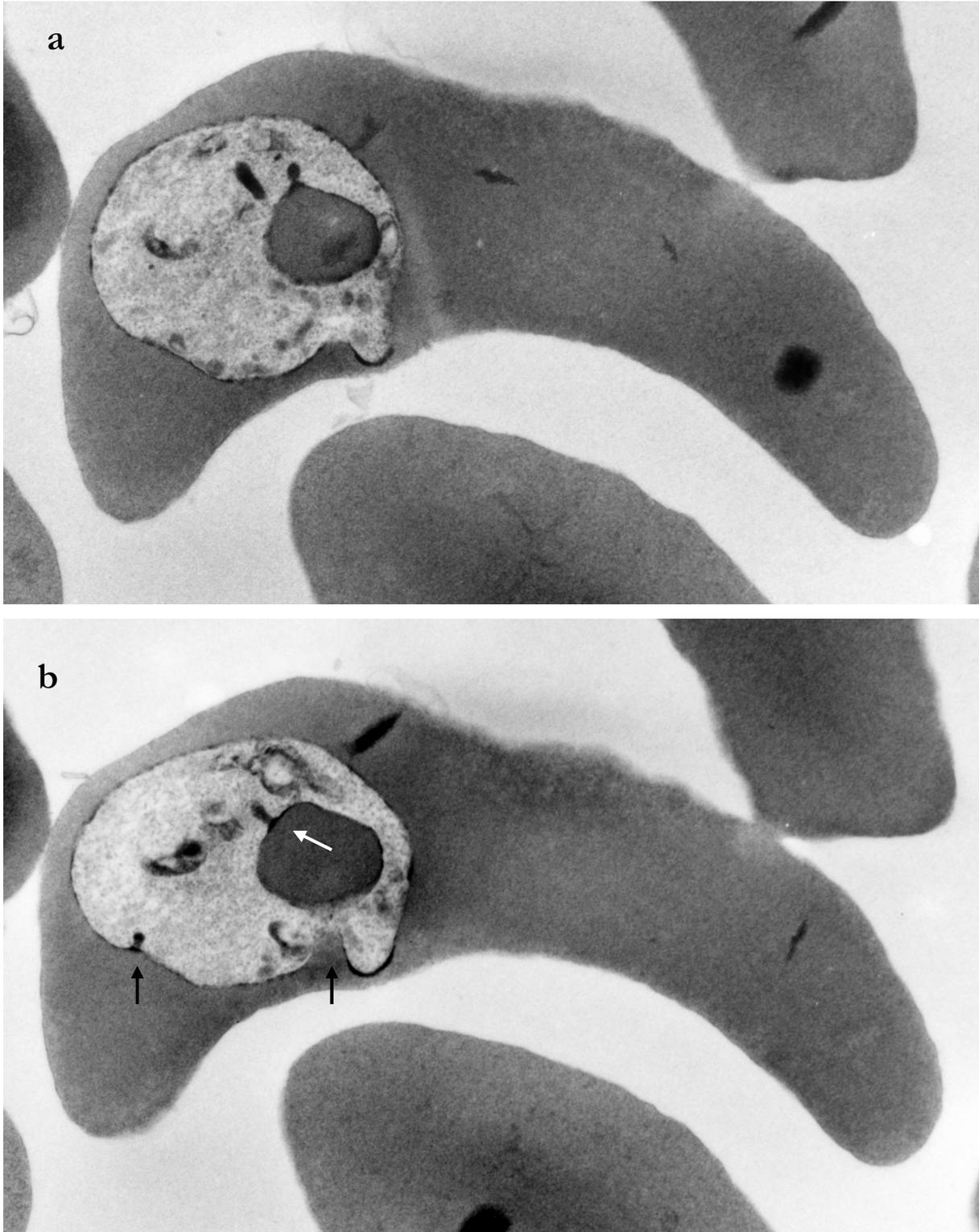
## TEM

In Abbildung 4 ist ein Plasmodium abgebildet, das die erwähnte Zwischenmembrandichte aufweist. In den Serienschritten (Abb. 5a/b, 6a/b) ist zu sehen, dass das darin befindliche Plasmodium bereits über ein ausgebildetes Cytostomensystem verfügt. In allen Schnitten sind endo- oder exozytotische Vakuolen\* zu sehen, die unabhängig von der Richtung ein ausgesprochen elektronendichtes Material transportieren. In allen Schnitten handelt es sich um *unimembranöse* Vesikeln (umgebende Membran bestehend aus PPM); siehe hierzu Abbildung 7.

Da die beobachteten Vesikeln in diesem sowie in anderen Fällen selten in mehr als zwei aufeinander folgenden Serienschritten zu sehen waren, dürfte die dem Cytostom anliegende Vesikel in Abb. 5a und 5b eine Dicke von ca. 100-200 nm haben. Die Vesikeln in Abb. 6 haben in etwa auch die gleiche Höhe und Breite. Man beachte darüber hinaus die leichte, seitliche Verschiebung der Vesikel, die im Verlauf der beiden Schnitte stattgefunden hat. Aufgrund dieser seitlichen Verschiebung ist eine Abschätzung der Länge nicht möglich. Offenbar handelt es sich um eine Vesikelstruktur, die schräg zur Schnittebene orientiert ist.

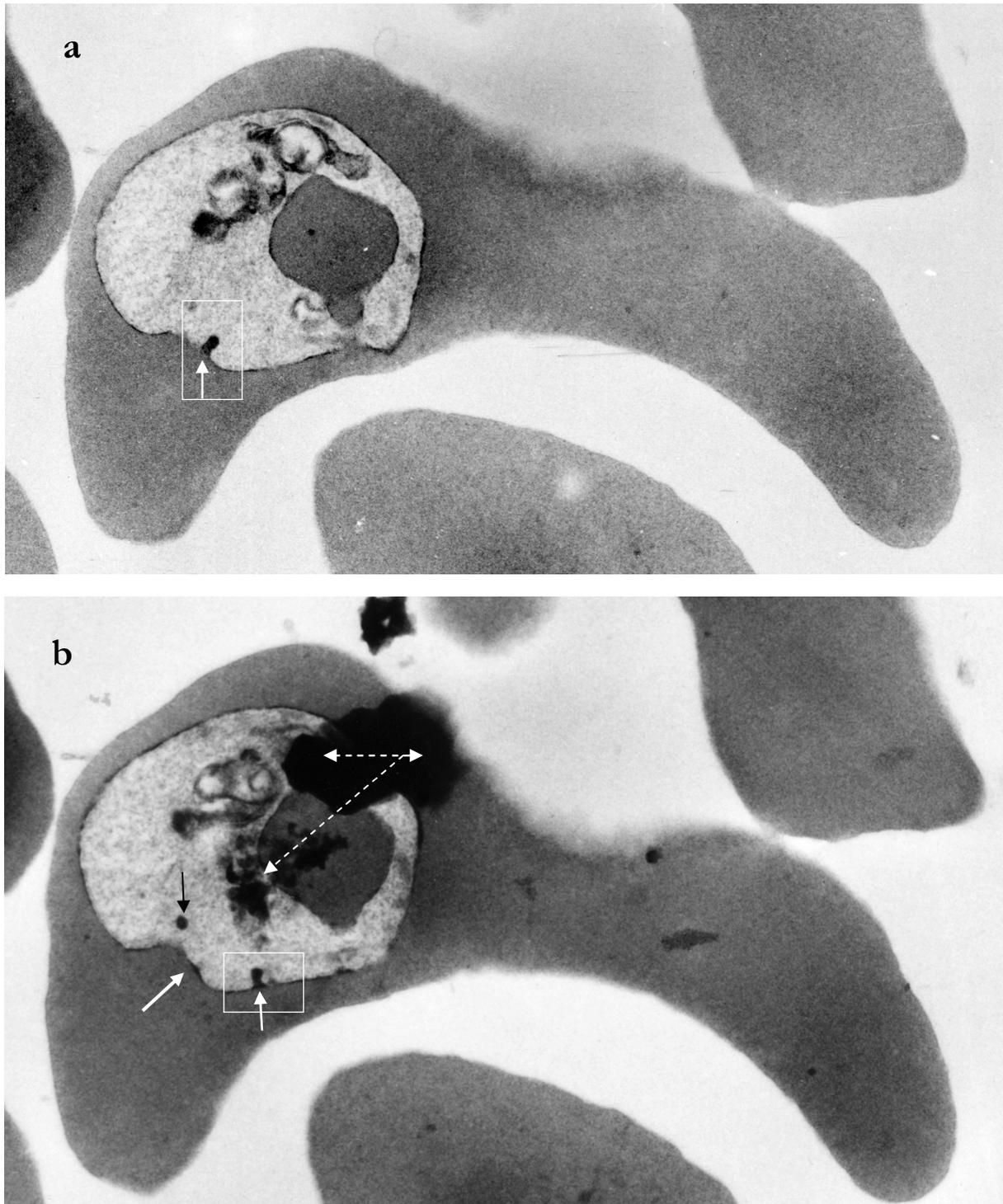
---

\* Eine Aussage über die Richtung dieser Vakuolen – ob endo- oder exozytotischer Natur – kann anhand der Bilder nicht gemacht werden.



**Abb. 5a, b**

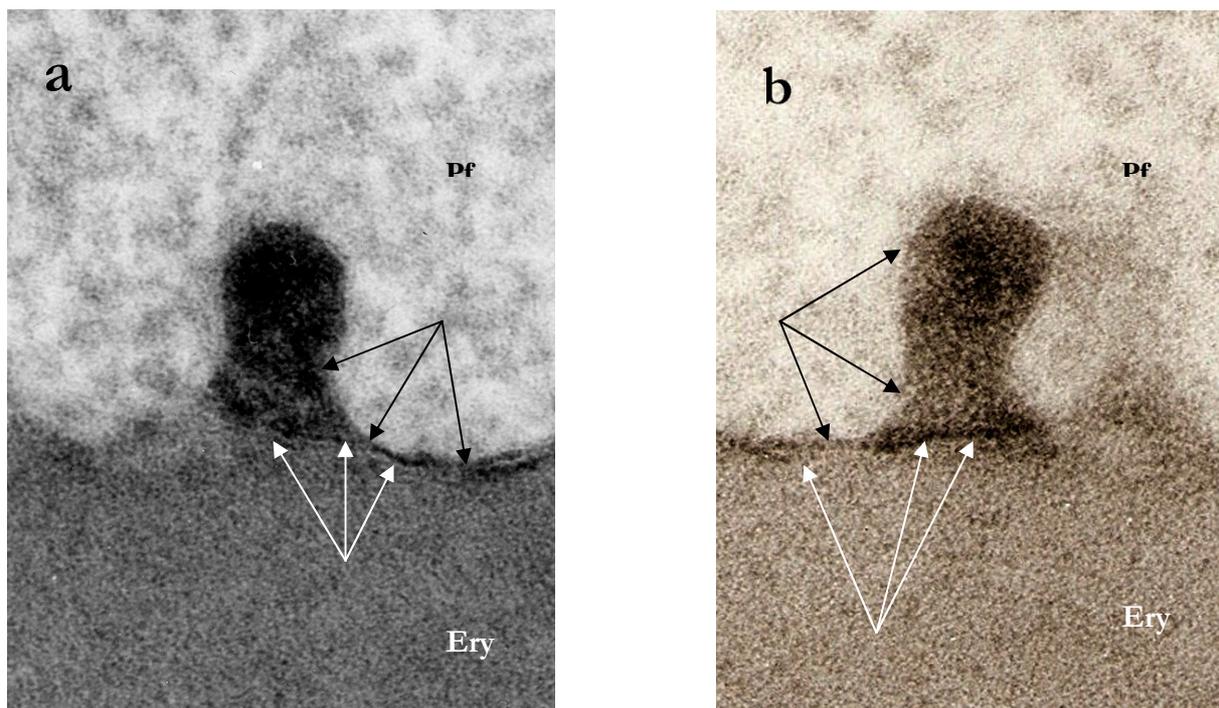
Zwei aufeinander folgende Serienschritte (a, b), in denen ein Cytostom sowie eine elektronendichte PV (auch die cytostomale) zu sehen ist. **a)** Weißer Pfeil zeigt auf eine Aufnahmevakuole (dieselbe wie in **b**) mit parasitophorem Inhalt (höhere Dichte verglichen mit Cytostominhalt). **b)** Schwarze Pfeile zeigen auf Aufnahmevakuolen. Weißer Pfeil weist auf den Eingang des Cytostoms. Alle Aufnahmevakuolen in **a** und **b** sind unimembranös. (a[KB59], b[KB61]; kontrastiert, +DAB, Vergr. 8.700X)



**Abb. 6a, b**

Zwei weitere aufeinander folgende Serienschritte derselben Zelle wie in Abb. 5. In beiden Schnitten weisen die Pfeile in der Umrahmung auf weitere Vesikel hin. Zusätzlicher schwarzer Pfeil in **b** zeigt auf eine unimembranöse Transportvesikel; weißer Pfeil auf einen seitlichen Ausläufer derselben Vesikel in **a**. Siehe Ausschnitte aus **a** und **b** in Abb. 7. (Gestrichelte Pfeile in **b** markieren Artefakte.) (a[KB81], b[KB1]: kontrastiert, +DAB, Vergr. 8.700X)

Abbildung 7 zeigt Ausschnitte der gleichen Zelle wie in Abbildung 6, um das Vorhandensein von unimembranösen Vesikeln zu verdeutlichen. Darüber hinaus ist die deutlich höhere Dichte des Inhalts der parasitophoren Vakuole im Vergleich zum erythrozytären Zytoplasma erkennbar. Der Inhalt der Vesikeln (siehe Übersichten in Abb. 6) entspricht in seiner Dichte weder dem plasmodialen noch dem erythrozytären Cytosol, eindeutig aber dem Inhalt der PV (siehe auch Abb. 4).

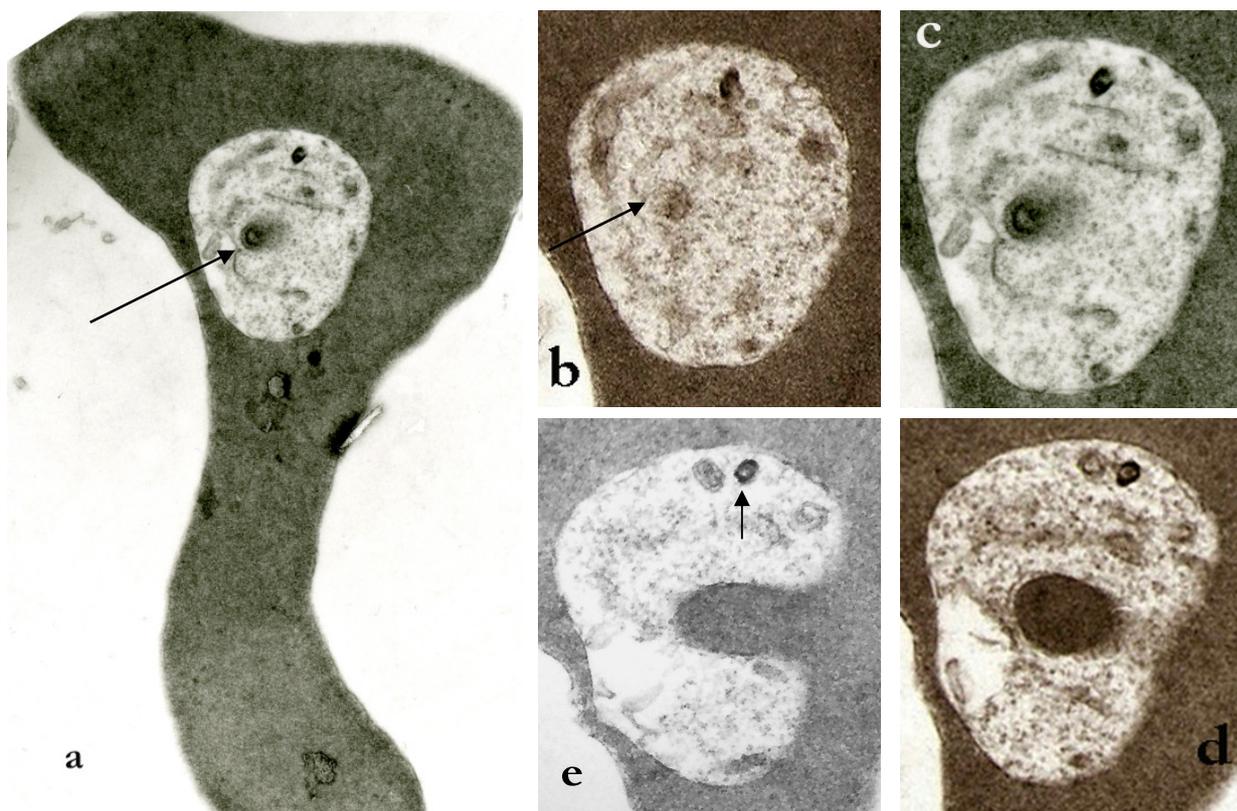


**Abb. 7a, b**

Ausschnitte aus **6a** bzw. **6b**. Die Pfeile markieren den Verlauf der jeweiligen Membran (weiße Pfeile > PVM, schwarze Pfeile > PPM) und verdeutlichen somit, dass es sich hier um unimembranöse Vesikel handelt. Man beachte zudem die deutlichen Dichteunterschiede zwischen dem Vesikelinhalt und dem erythrozytären Cytosol. (a[M404]: kontrastiert, + DAB; Ausschnitt aus 35.000-facher Vergr.; b[M403]: kontrastiert, + DAB, aus 95.000-facher Vergr.)

Ein zusätzlicher Befund von Interesse sind Gebilde, die in Abbildungen 8 und 9 dargestellt sind. Deren charakteristisches Erscheinungsbild, das in verschiedenen Zellen zu beobachten war, lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine Art „Organelle“ handeln könnte und nicht etwa um ein zufälliges Schnittphänomen. In der Tat hatten Garnham *et al.* (1961)<sup>19</sup> und Aikawa *et al.* (1966)<sup>3</sup> ähnliche Beobachtungen mit *Plasmodium falciparum* bzw. *fallax* gemacht.

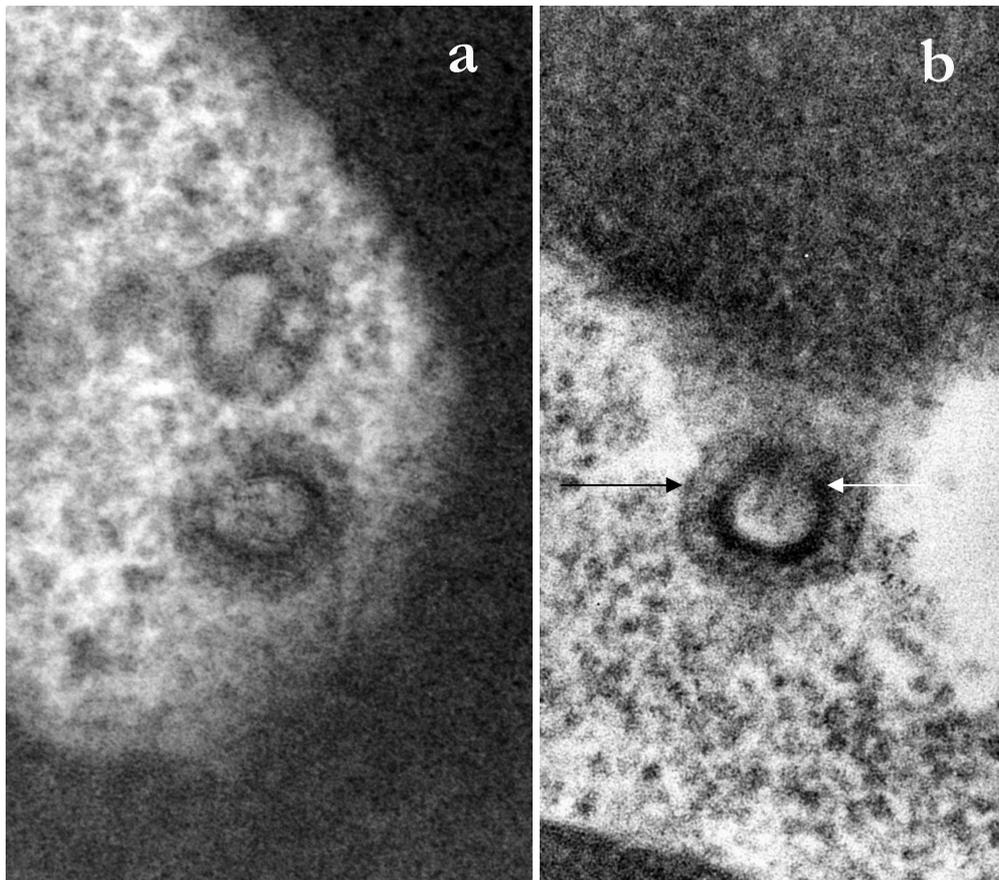
In Abb. 8a und 8c sieht man unverkennbar eine annuläre Struktur, die, wie sich in 8e eindeutig herausstellt, der transversal angeschnittenen Öffnung eines Cytostoms zuzuordnen ist. Zwei weitere Beispiele sind als Ausschnitte in Abbildung 9 dargestellt, bei denen die Ähnlichkeiten in Größe und Erscheinungsbild besonders ausgeprägt sind. Einerseits fällt die Symmetrie dieser Doppelringstruktur besonders auf, die an eine Iris erinnert; andererseits ist bemerkenswert, dass diese Gebilde in den hier dargestellten Abbildungen eine weitgehend identische Größe haben. Der Durchmesser



**Abb. 8a-e**

**a)** Übersicht eines Erythrozyten mit Plasmodium. Pfeil zeigt auf das angeschnittene Cytostom. **b)** Serienschritt vor **a** mit sichtbarem Anschnitt des Cytostoms (Pfeil). **c)** Ausschnitt aus **a** mit Doppelringstruktur der Cytostomöffnung. **d)** Lumen des Cytostoms. **e)** Mündung in das Cytostom. Pfeil weist auf einen Hämozoinkristall hin, der in allen Schnitten zu sehen ist. (a-d [M203-206]: kontrastiert, + DAB; Abbildungen **b-e** Ausschnitte aus Vergr. 9.800X [wie **a**])

dürfte bei ca. 100-200 nm liegen (siehe hierzu auch die Abbildungen in Aikawa *et al.* [1966]<sup>3</sup>). Diese Übereinstimmung lässt vermuten, dass diese Strukturen eine wichtige Rolle bei der Entstehung oder der Steuerung von Cytostomen sein könnten.



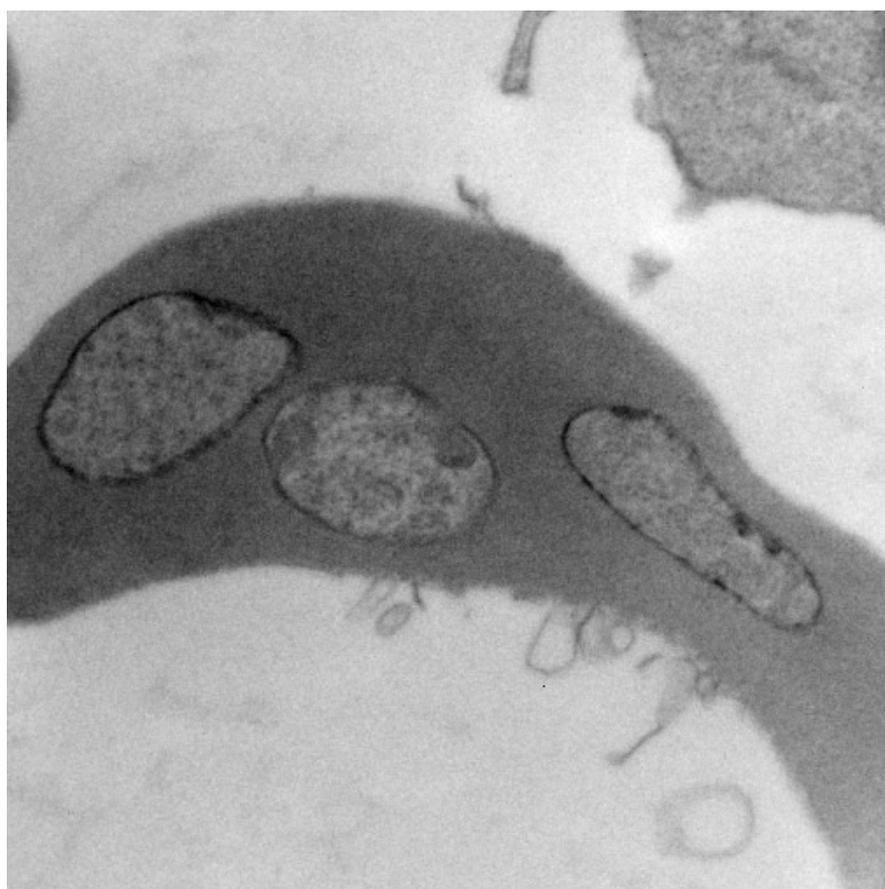
**Abb. 9a, b**

Zwei weitere Beispiele (**a**, **b**) der auffälligen Doppelringstruktur (Mündung des Cytostoms). Bemerkenswert ist die Isometrie dieser Doppelringstrukturen. Pfeile in **b** markieren den inneren und äußeren Ring. Bei genauerer Prüfung des inneren Ringes (v.a. in **a**), lässt sich erahnen, dass dieser eigentlich aus zwei Membranen gebildet wird, und zwar ist innen die PV und außen die PPM auszumachen (siehe hierzu auch Aikawa *et al.* <sup>3</sup>.) (a[KB47], b[KB44]: kontrastiert, + DAB, Vergr. 16.000X)

## EFTEM/EELS

Vom Präparat B52-01 wurde eine zusätzliche Analyse mittels EFTEM und EELS durchgeführt, damit die elementare Zusammensetzung (insbesondere der Eisengehalt) bestimmt werden konnte. Hierbei war der Bereich zwischen der PPM und PVM, d.h. der Inhalt der PV, von Interesse, da die hohe Elektronendichte aus den TEM-Untersuchungen darauf hindeutete, dass sich Eisen – speziell in Form von Hämozoin oder Vorstufen desselben – in diesem Bereich befinden könnte. Mittels dieser Analysen war es möglich, eine zuverlässige Aussage über die elementare Zusammensetzung des Inhalts zu machen.

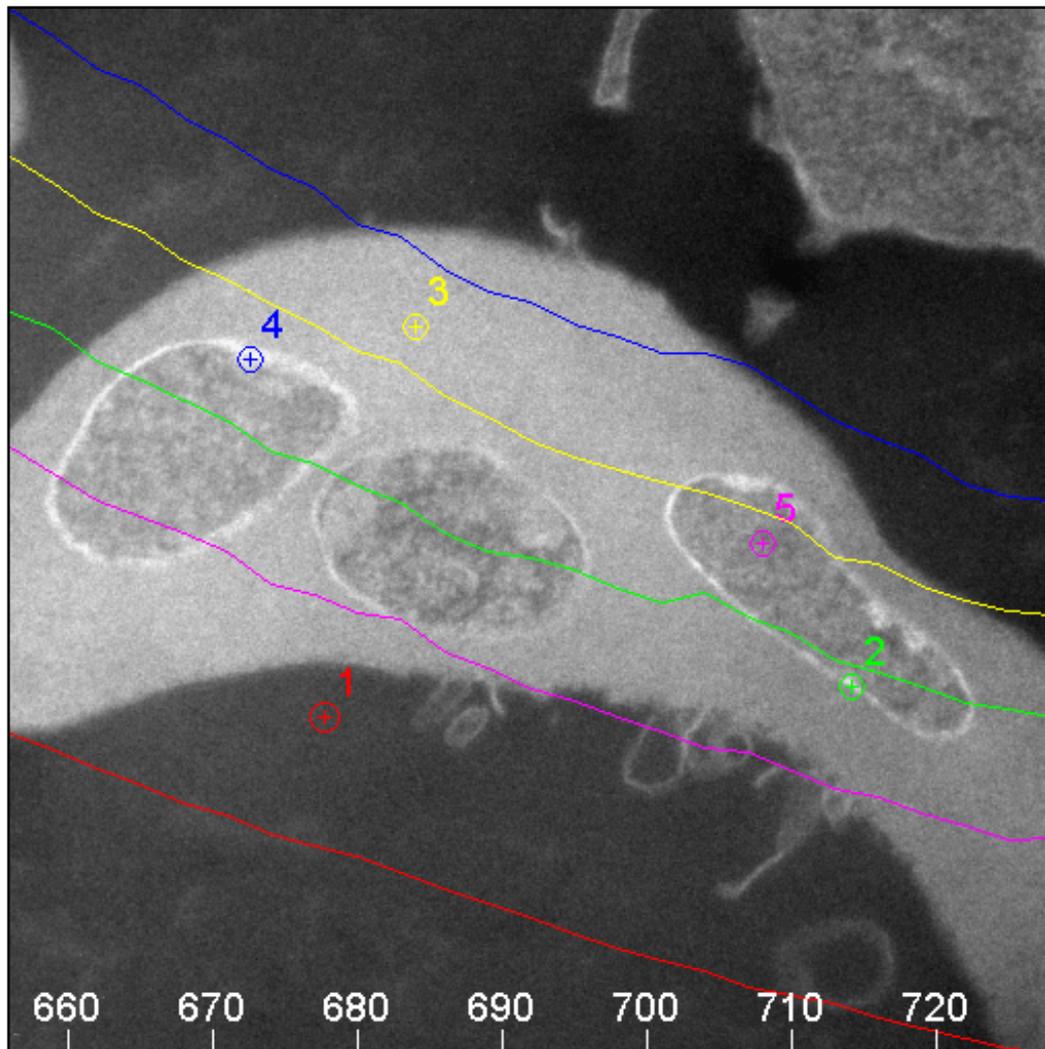
Abbildung 10 zeigt einen Erythrozyten mit Plasmodienbefall in der TEM-Sicht unter Energiefiltrierung (EFTEM) (unkontrastiertes Präparat). Insbesondere fällt der Zwischenmembranraum (PV) auf, der eine hohe Elektronendichte aufweist.



**Abb. 10**

Erythrozyt mit dreifachem Plasmodienbefall. In dieser EFTEM-Übersicht fällt u.a. der dichte Zwischenmembranraum um die Plasmodien auf. (unkontrastiert; Vergr. ca. 9.800X)

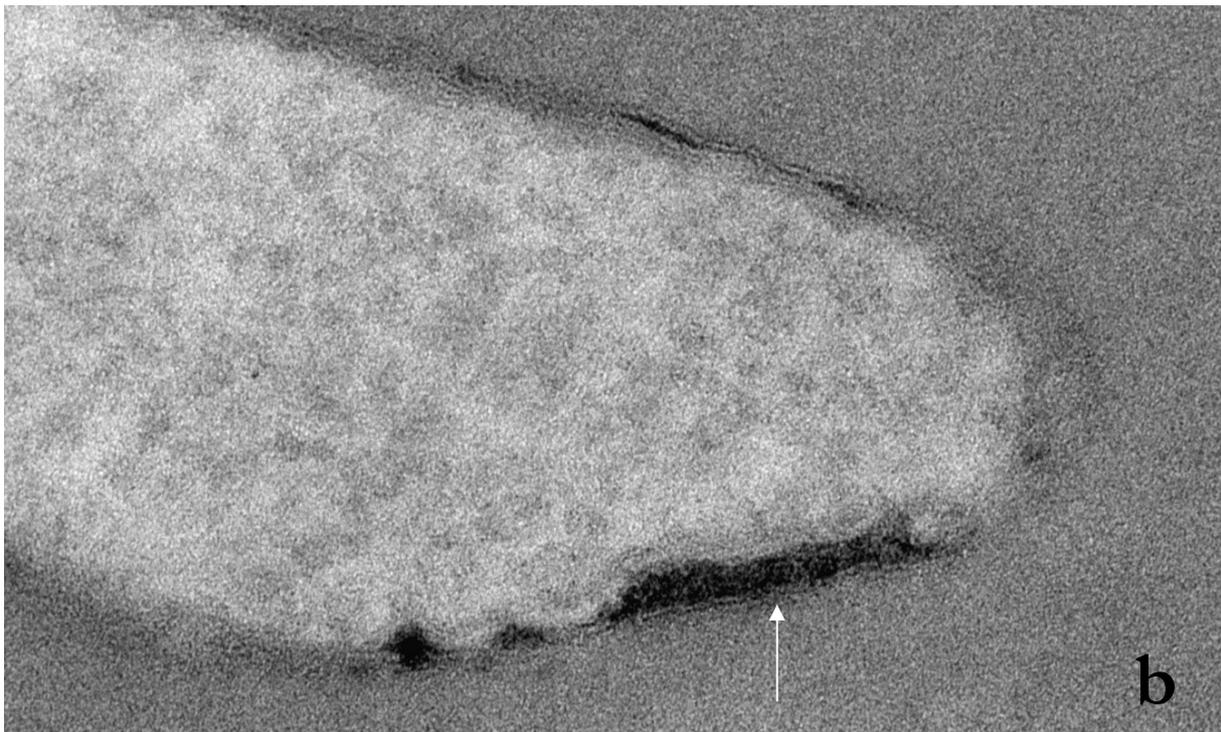
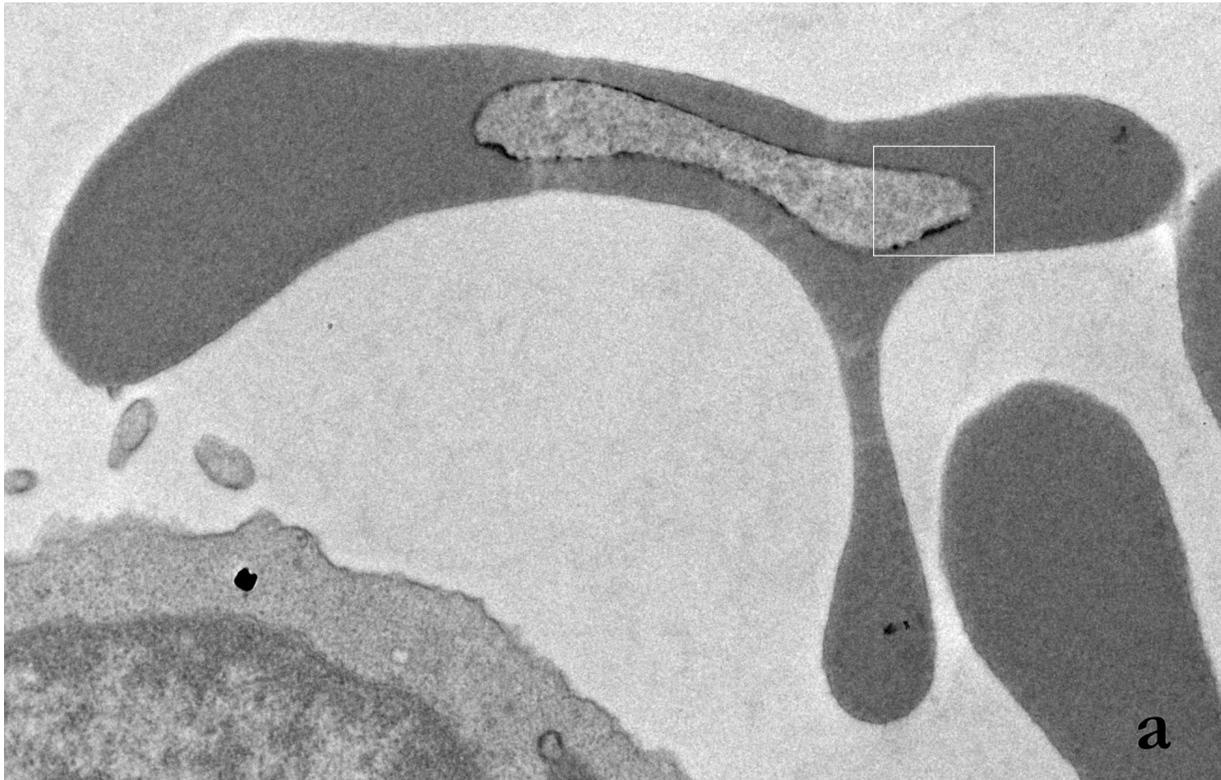
Abbildung 11 zeigt den EELS-Overlay derselben Zelle wie in Abbildung 10. Die Verlustwerte der blauen Kurve (#4) und vor allem der grünen Kurve (#2) bestätigen einen signifikant gesteigerten Eisengehalt\* in den untersuchten Bereichen der parasitophoren Vakuolen.



**Abb. 11**

EELS-Overlay mit Ergebnissen der Eisenbestimmung in unterschiedlichen Messpunkten des Präparats: 1 (rot) – extrazellulär, 2 (grün) – Doppelmembran samt parasitophorer Vakuole (PV), 3 (gelb) – intraerythrozytär, 4 (blau) – Doppelmembran mit PV, 5 (pink) – intraplasmodial. Das Energieverlustspektrum (unterer Rand) umfasst den Bereich zwischen 656-729 eV (Fe-L<sub>3</sub> ca. 710 eV). Die blaue und vor allem die grüne Kurve weisen eine eindeutige Spitze dort auf, wo die Hauptkante\* von Fe zu erwarten ist, nämlich um ca. 710 eV.

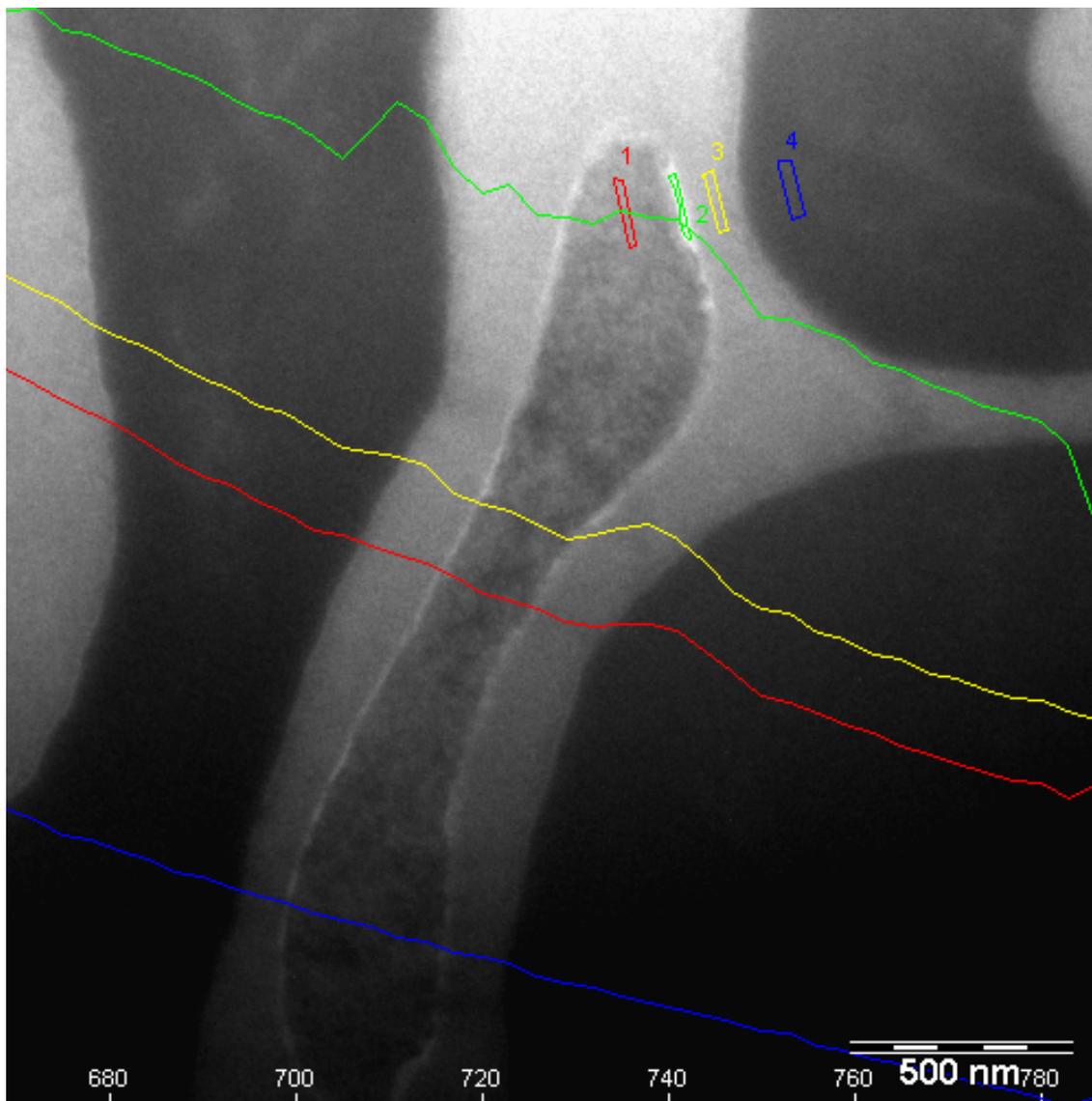
\* Fe-L<sub>3</sub> bezeichnet man als eine so genannte Ionisationskante. Die Ionisationskante entspricht der Energie, die nach Kollision mit Elektronen von Elektronen in bestimmten Orbitalen abgegeben wird. Bei Eisen ist das Signal der L<sub>3</sub>-Kante i.d.R am stärksten<sup>1</sup>.



**Abb. 12a, b**

**a.** EFTEM-Übersicht eines Erythrozyten mit Plasmodium, in dem zwei größere Bereiche (linker und rechter Rand [siehe Ausschnitt]) der PV mit auffällig hoher Elektronendichte zu sehen sind. Beide haben eine Breite von ca. 50 nm und erlauben somit eine noch eindeutigere Aussage hinsichtlich des Inhalts der parasitophoren Vakuole. **b.** Ausschnitt aus **a.** Pfeil zeigt auf den untersuchten Bereich in Abb. 12. (**a** und **b** unkontrastiert + DAB; **a:** Vergr. 7000X; **b:** aus 9.800X-Vergr.)

In Abbildungen 12 und 13 ist eine weitere Zelle dargestellt, die mit EFTEM sowie EELS untersucht wurde. Der Befund von Eisen in der PV lässt sich mit der EELS-Analyse bestätigen; aufgrund des größeren untersuchten Bereichs fällt das Signal für Eisen noch deutlicher aus als in Abbildung 11.



**Abb. 13**

EELS-Overlay mit erweitertem Spektrum (669-785 eV) der ermittelten Verlustwerte von Eisen in den untersuchten Bereichen (mit Ziffern versehen). 1 (rot) – intraplasmoidal, 2 (grün) – parasitophor, 3 (gelb) – intraerythrozytär, 4 (blau) – extrazellulär. Die Kurven entsprechen den Verlustwerten der jeweiligen Bereiche. Die grüne Kurve (Bereich 2) weist eindeutig nach, dass die parasitophore Vakuole Eisen enthält; in diesem Fall mit deutlicher Spitze um 710 eV (entspricht Fe-L<sub>3</sub>, der Hauptkante von Eisen). Als interessanter Nebenbefund sind die zusätzlichen Spitzen um 740 eV (entspricht Fe-L<sub>2</sub>, einer Nebenkante von Eisen) in der roten, gelben und der grünen Kurve. In all diesen Bereichen ist in der Tat Eisen in irgendeiner Form (chemisch gebunden) zu erwarten: intraerythrozytär (3) in Form von Hämoglobin; intraplasmoidal (1) in Form von Hämoglobin oder, je nach Stadium des Abbaus, auch Hämozin, und letztlich parasitophor (2), vermutlich als im Abbau begriffenes Hämoglobin oder präkristallines Hämozin. Solche Unterschiede in den Intensitäten der L<sub>3</sub>- und L<sub>2</sub>-Kanten können auf unterschiedliche Oxidationsstufen (z.B. Bindungszustände) von Eisen hindeuten.

## Diskussion

---

Die Abbildung von voll ausgereiften Hämozoinkristallen stellt nur das Endstadium einer langen, zunächst verborgenen Entwicklung dieser Kristalle dar, der eine örtliche Eisen- bzw. Ferriprotoporphyrin-Anreicherung – nach Verbrauch des Globinanteils – vorausgehen muss.

Das Vorfinden von Eisen in der parasitophoren Vakuole (PV) stellt ein Novum im plasmodialen Stoffwechsel dar, das in der Literatur bisher noch keine Erwähnung gefunden hat. Anhand dieser Befunde lässt sich nicht sagen, um welche eisenhaltige Substanz es sich handelt – ob freies/ionisiertes Eisen, Hämozoïn oder eine Vorstufe davon. Plausibel erscheint, dass Hämoglobin, im proteolytischen Abbau begriffen, die hohe elektronenmikroskopische Dichte verursacht, da eine solche Eisenverdichtung anders kaum möglich wäre. In diesem Fall ließe sich vermuten, dass daraus – je nach Ausmaß des Abbaus – auch Hämozoïn resultiert. Die abgeschlossene Bildung von Hämozoïn ist elektronenmikroskopisch erst nach der Kristallisation von  $\beta$ -Hämatin zweifelsfrei dokumentierbar. Die hier abgebildeten Eisenanreicherungen könnten daher entweder präkristallinem  $\beta$ -Hämatin bzw. einer amorphen kristallinen Matrix davon entsprechen, die beide elektronenmikroskopisch nur als Eisenanreicherungen imponieren würden. Möglicherweise findet eine vollständige Kristallisation erst zu einem späteren Zeitpunkt in der PV oder aber unter anderen biochemischen Bedingungen (z.B. Enzym- oder Substratkonzentration, pH-Wert etc.) statt, die in der PV nicht gegeben sind. Des Weiteren kann die größere Anschnittswahrscheinlichkeit – bedingt durch den starken Plasmodienbefall von Patient 4 – den Befund der Zellen mit der beschriebenen Eisenanreicherung begünstigt haben.

Tatsache ist, dass die genauen biochemischen Bedingungen der Hämozoïnbildung unklar sind. Dorn *et al.* (1995) zeigten etwa, dass reines  $\beta$ -Hämatin (Polymer des Ferriprotoporphyrins) die Polymerisation von Häm selbst auslösen kann<sup>13</sup>. Im selben Jahr wiesen Bendrat *et al.* eine ähnliche Polymerisationsfähigkeit von Phospholipid nach<sup>6</sup>, wie auch Fitch und Mitarbeiter 1999<sup>15</sup>. Sullivan *et al.* zeigten 1996, dass so genannte histidinreiche Proteine (HRP) Häm zu Hämozoïn im sauren Milieu von Digestionsvakuolen polymerisieren konnten<sup>46</sup>. Diese unterschiedlichen Ergebnisse

schließen sich nicht zwangsläufig aus sondern verdeutlichen nur, dass der lebensnotwendige Prozess des Hämoglobinabbaus und der Hämozoinbildung im plasmodialen Stoffwechsel ein sehr vielseitiger ist.

Mit der mit EELS durchgeführten Analyse ist mit hoher Sicherheit angereichertes Eisen nachgewiesen worden. Das für die Fixation der Präparate verwendete Osmium-Tetroxid beeinflusst nicht die Spitzenwerte des Energieverlusts für Eisen<sup>45</sup>: Die nächstgelegene Kante für Osmium, die in Frage käme, wäre eine Nebenkante bei 654 eV. Diese hat jedoch nur sehr schwache Merkmale und dürfte also die Hauptkante von Eisen (Fe-L<sub>3</sub>) um 710 nicht beeinflussen<sup>1</sup>.

Ganz wesentlich stellt sich die Frage, wie das Eisen – in welcher Form auch immer – überhaupt in die PV gelangt. Abbildungen 5, 6 und 7 zeigen eindeutig, dass ein vesikulärer Transport stattfindet, allerdings lässt sich nichts Eindeutiges über die Richtung sagen. Anhand der Abbildungen wären sowohl (1) eine plasmodiale Aufnahme durch *Endozytose aus der parasitophoren Vakuole* als auch (2) eine parasitophore Aufnahme durch *Exozytose aus dem plasmodialen Cytosol* möglich. Diese Aufnahmewege werden im Einzelnen erörtert.

Betrachten wir zunächst Möglichkeit (1), die der Endozytose. Wenn wir davon ausgehen, dass Plasmodien über eine solche Endozytose Hämoglobin (nativ, angedaut oder gar abgebaut) aus der PV aufnehmen könnten, dann wäre der Sinn eines solchen Vorgangs ohne Weiteres erkennbar. In diesem Fall würde die PV als eine Art Hämoglobin-Zwischendeponie fungieren, aus der das Plasmodium bei Bedarf eiweißreiches Hämoglobin aus dem Erythrozyten durch Endozytose holen könnte\*. Es ist möglich, dass bereits in der PV mit dem Hämoglobinabbau begonnen wird, ohne den die hier nachgewiesene Eisenanreicherung nicht möglich wäre. Vermutlich erreicht der Abbau jedoch nur ein bestimmtes Stadium, in dem das entstandene Hämozoin keine mikroskopisch sichtbaren Kristalle bildet sondern nur als amorphe

---

\* Die Mikropinozytose von erythrozytärem Cytosol in frühen Ringplasmodien ist 1965 von Rudzinska *et al.*<sup>40</sup> sowie 1990 von Slomianny<sup>44</sup> beschrieben worden; von allen sind allerdings nur bimembranöse Vakuolen beschrieben worden. Interessant ist an dieser Stelle anzumerken, dass die in dieser Untersuchung beobachteten unimembranösen Vesikeln erstens *zusammen* mit einem voll ausgebildeten Cytostomensystem auftreten (siehe Abbildungen 5 und 6) und zweitens auch diesem direkt entspringen können (siehe Abbildung 5a und b).

Eisenanreicherung verbleibt. Ob Proteolyse in der PV überhaupt möglich ist, bleibt zunächst offen.

Es ist bekannt, dass Proplasmepsine (I und II)\*, die in aktiver Form auf jeden Fall in der Digestionsvakuole für die ersten proteolytischen Schritte des Hämoglobinabbaus verantwortlich sind, in der PV bzw. der PVM vorkommen<sup>16</sup>. Ob die notwendigen, aktivierenden Spaltenzyme für diese Proteasen dort auch vorhanden sind, ist dem Autor nicht bekannt. Die Tatsache, dass im Rahmen des plasmodialen Stoffwechsels sehr viele Protonen in die PV gepumpt werden – einerseits von einem Laktat-H<sup>+</sup>-Symporter (passiv), andererseits von einer V-ATPase und einer V-Ppase (beide aktiv) – und so das pH in diesem Kompartiment auf ca. 6,8 halten<sup>20</sup>, verleiht der Vermutung einer dort stattfindenden Proteolyse Glaubwürdigkeit. Laut Francis *et al.* (1994) liegt die Aktivität der Plasmepsine I und II für die Spaltung von Hämoglobinketten bei einem pH von 6,5 immerhin noch bei ca. 35%<sup>16</sup>.

Betrachten wir als Nächstes Möglichkeit (2), die der Exozytose. Es wird zunächst einmal davon ausgegangen, dass das nachgewiesene eisenhaltige Material dem Plasmodium (Vesikel, Cytosol) entstammen müsste. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand könnten Vesikeln im Plasmodium, die etwa für die Exozytose (d.h. Transport *in* die PV) bestimmt sein könnten, entweder dem Cytostom direkt<sup>47</sup> oder einer Residual- bzw. Digestionsvakuole entstammen. Gegen ersteres spricht unter anderem die Tatsache, dass die beobachteten exozytotischen Vesikeln unimembranös sind. Die Möglichkeit besteht aber, dass Transportvesikeln vom Cytostom schon während des Transports die innere Membran (PVM) durch Hämozoinbildung verlieren, eine These, die von Slomianny<sup>44</sup> und Hempelmann *et al.*<sup>28</sup> vertreten wird. Wenn aber dies der Fall wäre, würde man auf jeden Fall erwarten, dass Hämozoinkristalle in irgendeiner Form dann auch in der PV zu sehen wären, was in den untersuchten Präparaten nicht der Fall war. Entstammten die exozytotischen Vesikeln einer Residual- oder Fressvakuole, würde man noch eher Hämozoinkristalle in der PV erwarten. Pouvelle *et al.* (1991)<sup>37</sup> wollen gezeigt haben, dass sowohl *endozytotische* (von der PV kommend) als auch *exozytotische* (in Richtung PPM bzw. PV)

---

\* Membranständige Proenzyme, die durch Spaltung vom Membrananker aktiviert werden und den Hämoglobinabbau durch Spaltung spezifischer Sequenzbereiche der  $\alpha$ -Ketten initiieren<sup>17</sup>.

Vesikeln plasmodiale Lysosomen erreichen bzw. diesen entspringen können; deren Inhalt aber war nicht bekannt.

Insgesamt kann man sagen: Da die Plasmodien vom erythrozytären Hämoglobin abhängen und für dessen Abbau zwangsläufig Energie aufwenden, ist es unwahrscheinlich, dass die Plasmodien *unvollständig* abgebautes oder gar natives Hämoglobin wieder aus der Zelle transportieren würden, ohne einen Nutzen davon zu haben. Und wenn reifes Hämozoin aus dem Plasmodium entfernt werden würde, dann wären ausgebildete Hämozoinkristalle vermutlich in der PV und anderswo zu erkennen. Somit bleibt die Frage nach dem Ursprung des in der PV beobachteten Eisens ungeklärt. Anhand dieser Erörterung spricht jedoch einiges dafür, dass die beobachteten Vesikeln **endozytotischer** Natur sind, was zwangsläufig auch bedeuten würde, dass der eisenhaltige Inhalt also der PV ursprünglich dem erythrozytären Cytosol entstammt.

Unabhängig von der Zusammensetzung sowie dem Schicksal der eisenhaltigen Substanz in der PV bleibt noch die Frage, auf welchem Weg sie überhaupt in die PV hineinfindet. Eindeutige Beweise für endozytotische Transportvorgänge vom erythrozytären Cytosol in die PV fehlen; über die Transportwege durch die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) weiß man überhaupt sehr wenig<sup>9</sup>. Dennoch kann man die eindeutigen Befunde dieser Arbeit nicht außer Acht lassen, die Eisen in der PV in einer gegenüber dem erythrozytären Cytosol erhöhten Konzentration nachweisen.

Des Weiteren lässt die Dichteverteilung der abgebildeten parasitophoren Vakuolen auf eine „globale“ Aufnahme schließen. Bei ordentlichem Schnitt ist je nach Breite der PV eine erhöhte Dichte entlang des gesamten Umrisses eines Plasmodiums zu sehen, nicht nur an einzelnen Stellen. Deshalb ist eher zu vermuten, dass das eisenhaltige Material im Rahmen eines überall stattfindenden Prozesses dorthin gelangt, was, sollte es sich dabei um Hämoglobin handeln, für das Plasmodium von Vorteil wäre. Über den genauen Transportprozess (Diffusion, transmembranäre Kanäle?) kann im Moment aber nur spekuliert werden. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass die Aufnahme in die PV über einzelne endozytotische Vakuolen stattfindet, weil die dafür notwendige Einstülpung in die PV räumlich stark limitiert ist. Der einzige bisher

nachgewiesene Transportweg vom erythrozytären Cytosol in die PV ist der über die von Desai und Rosenberg (1997) beschriebenen Poren, die die bidirektionale Diffusion kleinerer Moleküle (<1400 Dalton, <23 Å) durch die PVM zulassen<sup>10</sup>. Wenn Anteile des Hämoglobins durch solche Poren hindurch diffundieren sollten, dann aufgrund seiner Größe nur in abgebauter Form.

In der Tat sind viele transmembranäre Proteine in der PVM an der Verarbeitung bzw. Sortierung von Stoffen aus dem erythrozytären Cytosol beteiligt. Cooper et al (2005) beschreiben ein Protein PfCG2 der PVM, das – dem erythrozytären Cytosol zugewandt und vermutlich in kovalenter Bindung mit einem transmembranären Protein – in zeitlichem Zusammenhang mit dem Stadium erhöhten Hämoglobin-Abbaus vermehrt zu finden ist<sup>9</sup>. Zudem ist das Enzym Plasmepsin II, das wie Plasmepsin I an den allerersten Spaltreaktionen des Hämoglobins (vorwiegend der  $\alpha$ -Kette) maßgeblich beteiligt ist<sup>22</sup>, auch bei höherem pH aktiv. Bei pH-Werten um 6,8<sup>\*</sup> ist interessanterweise die *in-vitro* Aktivität gegen erythrozytäres Spektrin, Aktin und Protein 4.1 (erythrozytäre Membrananteile bzw. Bestandteile des Zytoskeletts) besonders hoch<sup>32</sup>. Die Lokalisation dieses Enzyms in unmittelbarer Nähe der PVM aber auch im erythrozytären Cytosol mag sogar auf ein Zusammenspiel dieses Enzyms mit der Membran selber hindeuten, die ja zu einem Großteil erythrozytären Ursprungs ist<sup>9, 32</sup>. Denkbar ist, dass die PVM durch Enzymeinwirkung durchlässig wird, was zu einem Durchtritt von cytosolischen Anteilen in die PV führen könnte. Siehe hierzu auch das Schema in Abb. 15 im Anhang.

Dass der Hämoglobin-Abbau schon früher beginnen könnte als in einer Digestions- bzw. Residualvakuole, die dann eine Art „Endstation“ darstellen würde, erscheint angesichts dieser Erläuterung zwar weiterhin spekulativ, aber nicht abwegig. Hempelmann *et al.* (2003) postulieren, dass Hämozoin bereits in Transportvesikeln gebildet werden könnte<sup>28</sup>, bevor sie mit Digestionsvakuolen verschmelzen. Es gibt eine allgemein akzeptierte Vorstellung, dass Plasmodien sowohl die Vakuolenmembran als auch das erythrozytäre Cytosol mit den unterschiedlichsten Proteinen u.a. bestücken, um in der Folge dieselben mit Hämoglobin in Vesikeln aus dem Cytostom aufnehmen zu können. Auf diese Weise vereinigen sich alle Komponenten in den Vesikeln, die

---

\*Laut Ginsburg (2002)<sup>20</sup> liegt der pH-Wert in der PV um 6,5.

zusammen agieren sollen, nämlich Hämoglobin und dessen Abbauenzyme. Man kann jedoch an dieser Vorstellung Zweifel hegen. Warum, zum Beispiel, muss der proteolytische Apparat erst mit hohem Aufwand durch die plasmodiale und parasitophore Vakuolenmembran ins erythrozytäre Cytosol transportiert werden, um erst wieder intraplasmodial in Fressvakuolen am Abbau des Hämoglobins aktiv zu werden? Denn besagte Enzyme könnten theoretisch genauso gut im Plasmodium verbleiben und direkt in die Fressvakuole transportiert werden; der Transportaufwand wäre im Grunde gleich, da in beiden Fällen zwei Membrane passiert werden müssten. Zugegeben ist die Aktivität der Enzyme im erythrozytären Cytosol pH-bedingt stark eingeschränkt, aber da *doch* ein Teil der abbauenden Enzyme im Vorfeld ins erythrozytäre Cytosol transportiert werden, kann man vermuten, dass dort bereits auch ein Teil des Abbaus stattfindet bzw. dass diese plasmodial exportierten Proteine dort Aufgaben haben, die mit der Vorbereitung oder dem Beginn des Hämoglobinabbaus zu tun haben könnten. Es ist denkbar, dass auf diese Weise Kristallisationsfoci verstreut entstehen, die wiederum die weitere Polymerisation fördern.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich Vorgänge der Natur stets dadurch auszeichnen, dass Zeit und Raum und letztlich auch Energie nicht verschwendet werden. Aus diesem Grund leuchtet der Gedanke durchaus ein, dass Hämoglobinabbau schon früher stattfinden könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die bekannten Stoffwechselforgänge über das Cytostom und Digestionsvakuolen nicht in Frage sondern ergänzen sie. Der Nachweis von Eisen in der PV weist darauf hin, dass Eisen auch auf anderem Wege in die Plasmodien hineinfließen kann, lässt jedoch offen, auf welchem Wege dies geschieht und wie es dort angereichert wird. Die in dieser Untersuchung nachgewiesene Eisenanreicherung muss dennoch als Vorstadium einer später einsetzenden oder sichtbar werdenden Kristallisation von Hämozoin angesehen werden.

## Zusammenfassung

---

In der vorliegenden Arbeit wurde in *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten mit elektronenmikroskopischen Methoden die Topographie von Eisenakkumulationen untersucht, wie sie im Rahmen des plasmodialen Hämoglobinabbaus mit Bildung vom Malariapigment Hämozin ( $\beta$ -Hämatin) zu erwarten sind. Hämozin spielt eine zentrale Rolle für den Stoffwechsel der Plasmodien. Erstens schützt es Plasmodien vor toxischem Eisen, das beim Abbau erythrozytären Hämoglobins anfällt. Zweitens spielt es eine Rolle in der Entstehung des Malariafiebers<sup>23,42</sup>. Drittens wirken die bekanntesten Medikamente gegen Malaria, Chloroquin und verwandte Alkaloide, durch Hemmung der Hämozinbildung<sup>8</sup>. Aus diesem Grund ist das Verständnis des Schicksals von erythrozytärem Eisen, aus dem schließlich Hämozin gebildet wird, von großer Wichtigkeit.

Insgesamt wurde Blut von 4 Patienten aus Ghana untersucht, die akut und unbehandelt an *Malaria tropica* erkrankt waren. Von diesem Blut wurden nach konventioneller Präparation elektronenmikroskopische Ultradünnschnitte angefertigt. Zur Darstellung von Hämoglobin wurden zusätzlich in Diaminobenzidin (DAB) und  $H_2O_2$  inkubierte Erythrozyten untersucht. Ein semiquantitativer Eisennachweis erfolgte mit Energiefilter-Transmissionselektronenmikroskopie (EFTEM) und Elektronenenergieverlust-Spektroskopie (EELS).

Bei der transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Untersuchung fanden sich elektronendichte Bereiche in den sogenannten parasitophoren Vakuolen (PV) in mehr als 50% der befallenen Erythrozyten von einem der Patienten. Die Untersuchung unter Energiefiltrierung (EFTEM) sowie mit EELS von unkontrastierten und in DAB inkubierten Ultradünnschnitten ergaben den eindeutigen Befund einer Eisenanreicherung in der PV.

Unter Berücksichtigung der bisherigen Literatur zum plasmodialen Hämoglobinabbau muss es sich bei der nachgewiesenen Eisenanreicherung in der PV der Trophozoiten um das Resultat einer beginnenden Hämoglobindigestion handeln. Überdies erscheint die Vermutung gerechtfertigt, dass dieses Material der präkristallinen Matrix entspricht, aus der sich später kristallines  $\beta$ -Hämatin bzw. Hämozin abscheidet.

## Summary

---

*Plasmodium-falciparum*-infected erythrocytes were examined by means of electron microscopy with regard to the occurrence and topography of iron accumulation as is observed in the process of hemoglobin breakdown and subsequent formation of the malarial pigment hemozoin ( $\beta$ -hematin). Hemozoin itself plays a central role in the metabolism of malarial parasites. Firstly, it protects the parasites from toxic iron which accumulates in the course of hemoglobin breakdown. Secondly, it is one of the major factors which cause fever in malarial disease<sup>23, 42</sup>. Lastly, it is the target of the most commonly used antimalarial drugs, chloroquine and related alkaloids, which inhibit its formation<sup>8</sup>. Therefore, understanding the fate of erythrocyte iron, from which hemozoin is ultimately formed, is of great significance.

Blood samples were collected from 4 untreated patients from Ghana who had fallen acutely ill with *Malaria tropica*. For electron microscopic examination ultrathin sections of all blood were made using standard methods of preparation. In addition, some blood was incubated in diaminobenzidine (DAB) and  $H_2O_2$  for better depiction of hemoglobin. Semiquantitative proof of the occurrence of iron was obtained using energy filter transmission electron microscopy (EFTEM) and electron energy loss spectroscopy (EELS).

Electron-dense regions within the so-called parasitophorous vacuole (PV) were observed in more than 50% of erythrocytes in samples of one of the patients when examined using TEM. Further examination of unstained and DAB-incubated samples of the same patient using EFTEM and EELS techniques yielded definitive proof of iron accumulation in the PV.

In light of available literature about the breakdown of hemoglobin by malarial parasites, it is proposed that the iron accumulation within the PV of malarial trophozoites observed in the present examination must be a product of hemoglobin breakdown. Furthermore, it seems reasonable to propose that this iron accumulation represents the pre-crystalline matrix, from which crystalline hemozoin ( $\beta$ -hematin) is ultimately derived.

## Anhang

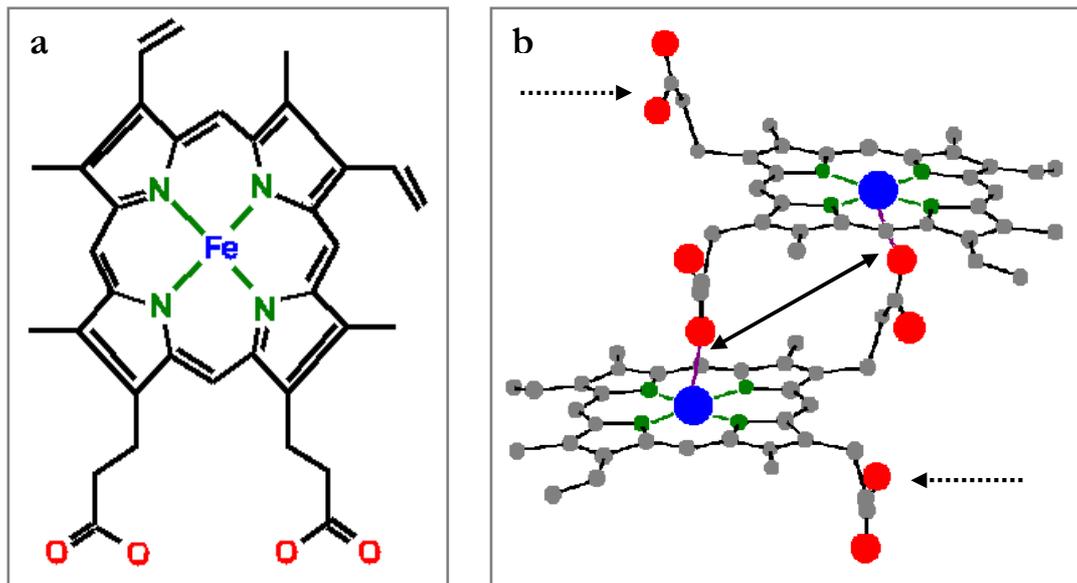
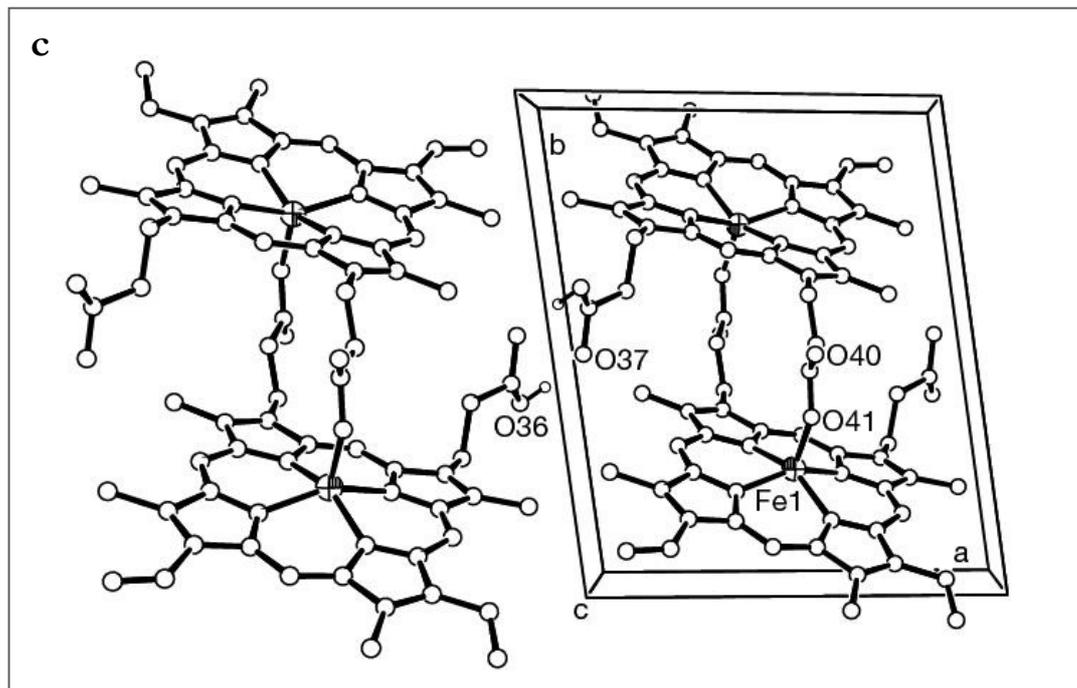
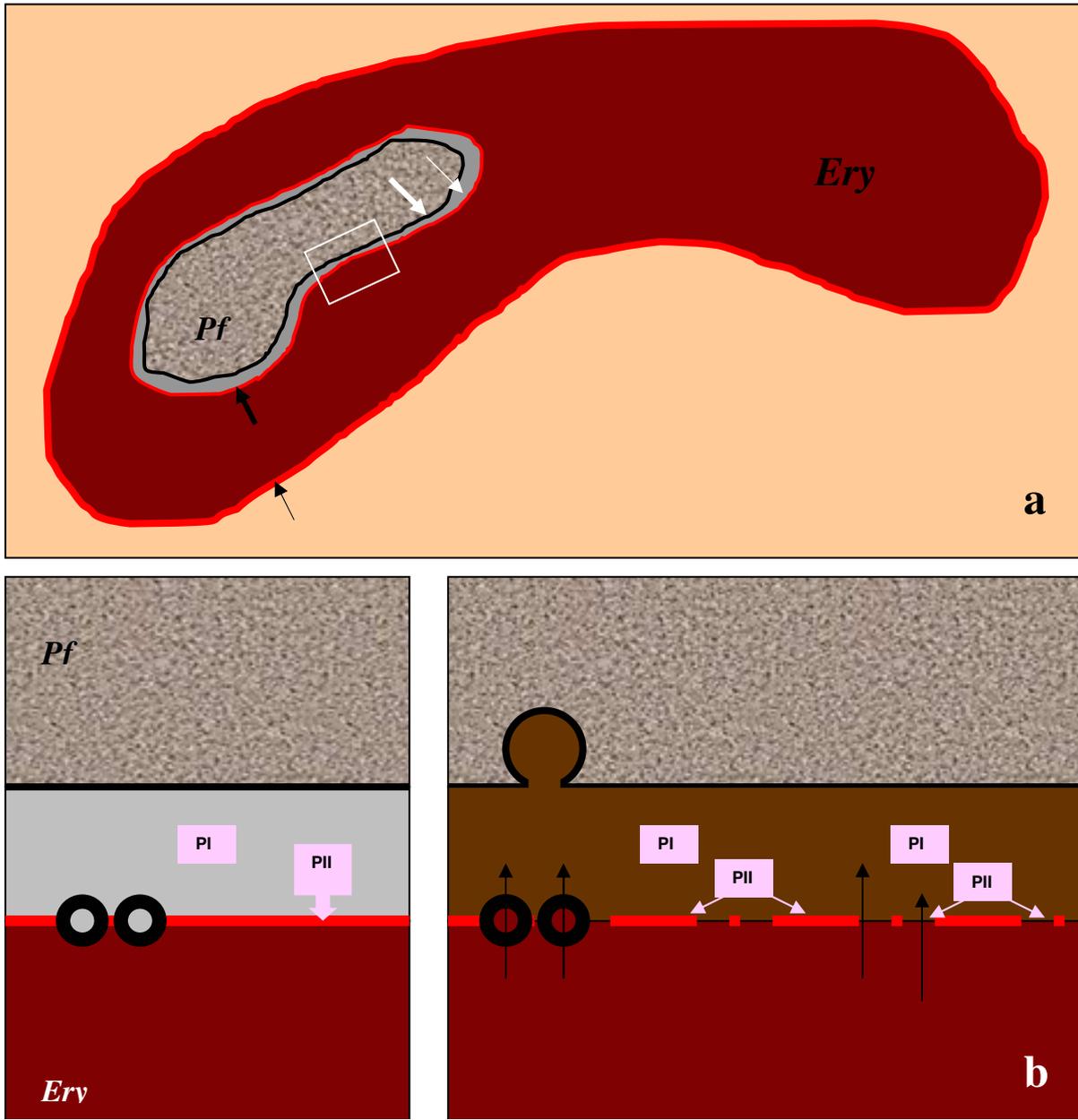


Abb. 14

- a. Häm.** Häm B (aus Hämoglobin), auch als **Ferriprotoporphyrin IX** bezeichnet: Porphyrin-Ring mit zentralem Eisenatom und zwei Propionat-Seitenketten (Sauerstoffatome in rot) sowie vier Methyl- und zwei Vinylgruppen.
- b. Häm-Dimer.** Zwei Häm-Moleküle über zwei Eisen-Carboxyl-Bindungen (Pfeil) miteinander verbunden. Die Dimere sind ihrerseits über Wasserstoffbrücken zwischen den freien Propionat-Ketten (gestrichelte Pfeile) miteinander verbunden und bilden so kristallines  $\beta$ -Hämatin. (Abbildungen **a** und **b** von Wisner<sup>50</sup> in Anlehnung an Pagola *et al.* 2000<sup>35</sup>)
- c.  $\beta$ -Hämatin-Oligomer.** Zwei  $\beta$ -Hämatin-Dimere, die über Wasserstoffbrücken zwischen den freien Propionat-Ketten miteinander verbunden sind. Rahmen durchschneidet die Ebene beider Eisenatome eines der Häm-Dimere zur Verdeutlichung der räumlichen Anordnung der Dimere im Kristall. (Abbildung aus Pagola *et al.* 2000<sup>35</sup>)





**Abb. 15a, b**

**a.** Schema der Membranverhältnisse eines Erythrozyten (Ery) mit Plasmodium (Pf). Dünner schwarzer Pfeile zeigt auf die Erythrozytenmembran; dicker schwarzer Pfeil zeigt auf die parasitophore Vakuolenmembran (PVM), die erythrozytären Ursprungs ist. Dicker weißer Pfeil zeigt auf die parasitäre Plasmamembran (PPM); dünner weißer Pfeil zeigt auf den Raum zwischen der PVM und der PPM, der parasitophoren Vakuole (PV).

**b.** Hypothese der Eisenanreicherung in PV (Ausschnitt aus **a.**).

Links: Anreicherung der PV (grau) mit den plasmodialen Plasmeysinen I (PI) und II (PII) sowie vorhandene wie von Desai und Rosenberg<sup>10</sup> beschriebene bidirektionale Poren in der PVM.

Rechts: Nach Abbau von Anteilen des erythrozytären Zytoskeletts durch das membran-assoziierte PII wird die PVM durchlässig und Hämoglobin tritt durch die PVM hindurch (schwarze Pfeile). Die Enzyme PI und PII könnten dann den Hämoglobinabbau beginnen, der zu einer Anreicherung von Eisen in der PV (durch braune Farbe angedeutet) führen könnte. Möglicherweise spielt der Durchtritt (schwarze Pfeile) von erythrozytären Anteilen oder der Austritt von Anteilen der PV durch membranöse Poren der PVM bei der Anreicherung eine Rolle. Durch Einstülpung der PPM in das Plasmodium hinein könnten mit Eisen angereicherte Substrate aus der PV ins plasmodiale Cytosol transportiert (s. Abb. 5,6 und 7) werden.

## Literaturverzeichnis

---

- 1 Ahn C, Krivanek O, Burgner R, Disko M, Swan P (1983): Electron Energy Loss Spectroscopy Atlas. HREM Facility and Gatan, Inc., Tempe, AZ.
- 2 Aikawa M, Huff CG, Sprinz H (1966): Comparative feeding mechanisms of avian and primate malarial parasites. *Military Medicine Suppl.* 969–983.
- 3 Aikawa M, Hepler PK, Huff CG, Sprinz H (1966): The feeding mechanism of avian malarial parasites. *J Cell Biol* 28:355–373.
- 4 Arese P, Schwarzzer E (1997): Malarial pigment (haemozoin: a very active ‘inert’ substance. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 91:501–516.
- 5 Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH (2000): A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology Today* 16:427–433.
- 6 Bendrat K, Berger BJ, Cerami A (1995): Haem polymerization in malaria. *Nature* 378:138–139.
- 7 Brown WH (1912): Malarial pigment (hematin) as a factor in the production malarial paraoxysm. *J Exp Med* 15:579–597.
- 8 Chou AC, Chevli R, Fitch CD (1980): Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry* 19:1543–9.
- 9 Cooper RA, Papakrivos J, Lane KD, Fujioka H, Lingelbach K, Wellems TE (2005): PfcG2, a *Plasmodium falciparum* protein peripherally associated with the parasitophorous vacuolar membrane, is expressed in the period of maximum hemoglobin uptake and digestion by trophozoites. *Mol Biochem Parasitol* 144:167–176.
- 10 Desai SA, Rosenberg RL (1997): Pore size of the malaria parasite’s nutrient channel. *Proc Natl Acad Sci* 94:2045–2049.
- 11 Dluzewski AR, Mitchell GH, Fryer PR, Griffiths S, Wilson RJM, Gratzer WB (1992): Origins of the parasitophorous vacuole membrane of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, in human red blood cells. *Journal of Cell Science* 102:527–532.
- 12 Dobson MJ (1999): The malarial centenary. *Parassitologia* 41:21–32.
- 13 Dorn A, *et al.* (1995): Malarial haemozoin/ $\beta$ -haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature* 374:269–271.

- 
- 14 Egan TJ, Combrinck JM, Egan J, Hearne G, Marques HM, Ntenti S, Sewell BT, Smith PJ, Taylor D, van Schalkwyk DA, Walden JC (2002): Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 365:343–347.
  - 15 Fitch CD, Cai GZ, Chen YF, Shoemaker JD (1999): Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. *Biochim Biophys Acta–Mol Basis Dis* 1454:31–37.
  - 16 Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Knickerbocker A, Mueller R, Bryant ML, Sherman DR, Russell DG, Goldberg DE (1994): Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase. *EMBO J* 13:306–317.
  - 17 Francis SE, Banerjee R, Goldberg DE (1997): Biosynthesis and maturation of the malaria aspartic hemoglobinases plasmepsins I and II. *J Biol Chem* 272:14961–14968.
  - 18 Gabay T, Ginsburg H (1993): Hemoglobin degradation and iron release in acidified red blood cell lysate – a possible source of iron for intraerythrocytic malaria parasites. *Exp Hematol* 77:261–272.
  - 19 Garnham PCC, Bird RG, Baker JR, Bray RS (1961): Electron microscope studies of motile stages of malarial parasites II. The fine structure of the sporozoite of *Laverania* (= *Plasmodium*) *falcipara*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 55:98–102.
  - 20 Ginsburg H (2002): Abundant proton pumping in *Plasmodium falciparum*, but why? *Trends Parasit* 18:483–486.
  - 21 Goldberg DE, Slater AFG, Cerami A, Henderson GB (1990): Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proc Natl Acad Sci* 87:2931–2935.
  - 22 Goldberg DE, Slater AF, Beavis R, Chait B, Cerami A, Henderson GB (1991): Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. *J Exp Med* 173:961–969.
  - 23 Golgi C (1886): Sull' infezione malarica. *Arch Sci Med* 109–35.
  - 24 Graham RC, Karnovsky MJ (1966): The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 14:291–302.
  - 25 Guinovart C, Navia MM, Tanner M, Alonso PL (2006): Malaria: burden of disease. *Curr Mol Med* 6:137–140.
  - 26 Harel S, Avior Salan M, Kanner J (1988): Iron release from metamyoglobin, methaemoglobin, and cytochrom C by a system generating hydrogen peroxide. *Free Rad Res Comm* 5:11–19.

- 
- 27 Gutteridge JMC (1986): Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 201:291–295.
- 28 Hempelmann E, Motta CM, Hughes RH, Ward SA, Bray PG (2003): *Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals? *Trends Parasit* 19:23–26.
- 29 Krugliak M, Zhang J, Ginsburg H (2002): Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol Bioch Paras* 119:249–256.
- 30 Langreth SG, Jensen JB, Reese RT, Trager W (1978): Fine structure of human malaria *in vitro*. *J Protozool* 25:443–452.
- 31 Laveran A (1880): Un nouveau parasite trouve dans le sang des malade atteints de fièvre palustre. Origine parasitaire des accidents de l'impaludisme. *Bull Acad Med Paris* 9:1235–1236.
- 32 Le Bonniec S, Deregnacourt C, Redeker V, Banerjee R, Grellier P, Goldberg DE, Schrével (1999): Plasmeprin II, an an acidic hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *J Biol Chem* 274:14218–14223.
- 33 Lingelbach K, Joiner KA (1998): The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111:1467–1475.
- 34 Olliaro PL, Goldberg DE (1995): The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. *Parasitology Today* 11:294–297.
- 35 Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK (2000): The structure of malaria pigment  $\beta$ -haematin. *Nature* 404:307–310.
- 36 Peto TEA, Thompson JL (1986): A reappraisal of the effects of iron and desferrioxamine on the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro: The unimportance of serum iron. *Brit J Haemat* 63:273–280.
- 37 Pouvelle B, Spiegel R, Hsiao L, Howard RJ, Morris RL, Thomas AP, Taraschi TF (1991): Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. *Nature* 353:73–75.
- 38 Pouvelle B, Gormley JA, Taraschi TF (1994): Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes. *Molec Biochem Parasit* 66:83–96.
- 39 Puppo A, Halliwell B (1988): Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem J* 249:185–190.

- 
- 40 Rudzinska MA, Trager W, Bray RS (1957): Intracellular phagotrophy by malarial parasites: an electron microscope study of *Plasmodium falciparum*. J Protozool 4:190–199.
- 41 Scheibel LW, Sherman IW (1988): Plasmodial metabolism and related organellar function during various stages of the life-cycle: proteins, lipids, nucleic acids and vitamins. In: Malaria Vol. I, Wernsdorfer and McGregor, Churchill Livingstone, 219–252.
- 42 Sherry BA, Alava G, Tracey KJ, Martiney J, Cerami A, Slater AF (1995): Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo. J Inflamm 45: 85–96.
- 43 Sinton JA, Ghosh BN (1934): Studies of malarial pigment (haemozoin). Part I. Investigation of the action of solvents on haemozoin and the spectroscopical appearances observed in the solutions. Records of the Malaria Survey of India, IV, 15–42.
- 44 Slomianny C (1990): Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. Blood Cells 16:369–78.
- 45 Stearns RC, Katler M, Godleski JJ (1994): Contribution of osmium tetroxide to the image quality and detectability of iron in cells studied by electron spectroscopic imaging and electron energy loss spectroscopy. Microscopy Research and Technique 28:155–163.
- 46 Sullivan DJ, Gluzman IY, Goldberg DE (1996): *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. Science 271:219–222.
- 47 Yayon A, Timberg R, Friedman S, Ginsburg H (1984): Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. J Protozool 31:367–372.
- 48 [http://en.wikipedia.org/wiki/Energy\\_filtered\\_transmission\\_electron\\_microscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Energy_filtered_transmission_electron_microscopy).
- 49 [http://en.wikipedia.org/wiki/Electron\\_energy\\_loss\\_spectroscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Electron_energy_loss_spectroscopy).
- 50 <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/heme.html>