

Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. J. Knobloch

Sektion Humanparasitologie

Leiter : Professor Dr. P. G. Kremsner

**Funktionelle Analysen der *Plasmodium falciparum* erythrocyte
membrane protein- 1 (PfEMP1)- Domäne DBL3 γ**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhardt Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Christina Kimberly Reinhardt
aus Karlsruhe

2006

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. P.G. Kremsner
2. Berichterstatter: Professor Dr. F.W. Schmahl

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines zu Malaria	1
1.2 Lebenszyklus von Plasmodien	2
1.3. Pathogenese von <i>P. falciparum</i>	4
1.4 Malaria in der Schwangerschaft	5
1.4.1 Sequestration in der Plazenta	6
1.4.2 Plazentaassoziierte Rezeptoren	7
1.4.3 Hyaluronsäure (HA)	8
1.4.4 Weitere Zytoadhärenzrezeptoren	9
1.5. <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein- 1 (PfEMP1)	10
1.5.1. Die <i>var</i> -Gen-Familie	10
1.5.2 Rifin Proteine	12
1.6. Immunität gegen PfEMP-1	12
1.7. Entwicklung eines Malariaimpfstoffes	14
1.8. Zielsetzung	16
2. Patienten und Methoden	17
2.1 Studienaufbau	17
2.2 Studienort	17
2.3 Patienten	19
2.4 Probenentnahmen	19
2.5 Malariadiagnostik	20
2.5.1 Zusätzliche hämatologische Diagnostik	21
2.6. Parasitenisolate	21
2.7 In- vitro- Adaptation von Parasitenisolaten	
2.8. Statische Bindungsstudien	22
2.9. Reagenzien für die Inhibition der Bindung	25
2.10 Aufbereitung infizierter Erythrozyten für die Analyse im Durchflusszytometer	25
2.11 Analyse im Durchflusszytometer	26
2.12 Statistische Auswertung	28

3. Ergebnisse	29
3.1 Patientenkollektiv	
3.2 Auswertung der Erkennung von Plazentaisolaten durch spezifische Antikörper schwangerer Frauen in der zytometrischen Durchflussanalyse (FACS)	30
3.2.1 Analyse der MFI in Abhängigkeit vom Graviditätsstatus	31
3.2.2 Vergleich der Erkennung von Plazentaisolaten zwischen Paucigraviden und Multigraviden	32
3.2.3. Vergleich der Erkennung von Plazentaisolaten innerhalb von Multigraviden bzw. Paucigraviden	34
3.3 Korrelation von MFI-Werten zwischen Plazentaisolaten	39
3.4 Auswertung der Bindungsstudien	41
3.4.1 Analyse der Bindungsstudie nach Inhibition mit anti DBL3 γ -Antikörpern	42
3.4.2 Analyse der Bindungsstudie nach Erweiterung des Antikörperrepertoires	43
4.Diskussion	46
4.1. Antikörpervermittelte Erkennung von Plazentaisolaten bei Schwangeren	46
4.2. Bindungsstudien	51
5.Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis	55
Danksagung	61
Lebenslauf	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
C2	Constant 2
CIDR	cystein-rich interdomain region
CSA	Chondroitin Sulfat A
CSP	Circum Sporozoit Protein
DBL	Duffy binding like
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA	Hyaluronic Acid
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule- 1
KAHRP	Knob Associated Histidine Rich Proteine
MACS	Magnetic activated cell sorter
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MSP	Merozoite Surface Proteine
NO	Nitric Oxid
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein -1
QBC	Quantified Buffy Coat
Rif	repetitive interspersed family
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
WHO	World Health Organisation
VSA	variant surface antigen

1. Einleitung

1.1 Allgemeines zu Malaria

Malaria ist die in der Welt am weitesten verbreitete Tropenkrankheit und steht bezogen auf die Mortalität an dritter Stelle nach Tuberkulose und HIV.

Sie ist eine durch Plasmodien verursachte Protozoeninfektion, wobei von den über 100 Plasmodienarten nur vier humanpathogen sind: *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*, die die Malaria tertiana hervorrufen, *Plasmodium malariae*, welches für die Malaria quartana verantwortlich ist, sowie *Plasmodium falciparum*, welches die am häufigsten vorkommende Infektion, die Malaria tropica verursacht und nahezu allein verantwortlich ist für die Mortalität.

Die Infektion tritt in über 100 Ländern auf, und 40 % der Weltbevölkerung lebt in Risikogebieten. Doch 90 % der Malariafälle treten in Afrika südlich der Sahara auf. Die WHO schätzt, dass jährlich 300 bis 500 Millionen Menschen an Malaria erkranken und über 2 Millionen Menschen an den Folgen einer Infektion sterben. Der größte Teil der Opfer sind Kinder unter 5 Jahren, die meist von der öffentlichen Gesundheitsversorgung abgeschnitten sind. Doch auch schwangere Frauen (besonders Erst- und Zweitgebärende) sowie Flüchtlinge und nicht-immune Reisende gehören zur Risikogruppe. Jugendliche erwachsene in hyperendemischen Gebieten dagegen erlangen durch wiederholte Infektionen eine klinische Immunität und sind dadurch teilweise geschützt.

Während die Infektion mit *P.ovale*, *P.malariae* und *P. vivax* eine beträchtliche Morbidität verursachen kann mit grippeähnlicher Symptomatik sowie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe, ist nur die Malaria tropica, also die Infektion mit *P. falciparum* potentiell tödlich.

Wird die Malaria tropica nicht sofort behandelt, kann sie durch eine schwere Anämie und Organversagen, besonders von Niere, Lunge und Gehirn zum Tode führen.

1.2 Lebenszyklus von Plasmodien

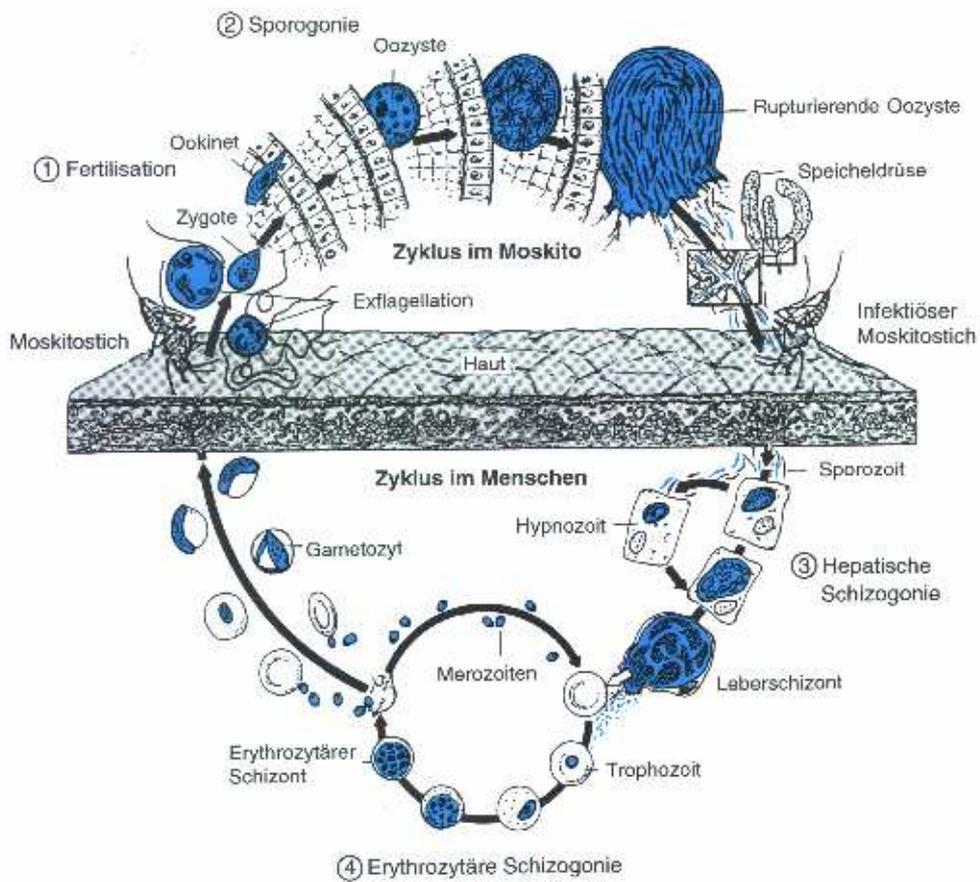
Alle vier Plasmodienarten durchlaufen den gleichen Lebenszyklus und sind dabei auf zwei Wirte angewiesen: Die weibliche Stechmücke der Gattung Anopheles für die geschlechtliche Vermehrung und den Menschen für die ungeschlechtliche Vermehrung.

Durch den Stich einer infizierten Anopheles – Mücke werden Sporozoiten in die Blutbahn injiziert, die innerhalb von Minuten die Leber erreichen und in Hepatozyten eindringen. Dort kommt es zur Vermehrung zu sog. extraerythrozytären Leberschizonten. Bei Ruptur der Schizonten werden Tausende von Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt, die dann Erythrozyten befallen. Innerhalb der roten Blutzellen beginnt der erythrozytäre Kreislauf mit dem Ringstadium (Trophozoit) und schließt nach 48 Stunden Dauer mit der Entwicklung zum Schizonten.

Es kommt zur Ruptur des Erythrozyten mit Freisetzung von Merozoiten, die dann ihrerseits wieder andere Erythrozyten befallen. Gleichzeitig kommt es zur Differenzierung einiger Merozoiten in die Geschlechtsformen (Gametozyt), den weiblichen Makrogametozyt und den männlichen Mikrogametozyt. Werden diese bei einer erneuten Blutmahlzeit der Mücke aufgenommen, kommt es zur Ausreifung der Gametozyten und sexuellen Vermehrung im Magen – Darm – Trakt zu den Sporozoiten, die dann bei einer erneuten Stichübertragung den Lebenszyklus abschließen.

Bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* können ausgehend von Hypnozoiten, die als Ruheformen in der Leber persistieren, sog. Rückfälle auftreten. Im Gegensatz dazu werden bei *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae* Rekrudeszenzen beobachtet, die auch Monate oder Jahre nach einer Erstinfektion auftreten, und ihren Ausgang von chronisch infizierten Erythrozyten nehmen, die in Gefäßendothelien persistieren. Die Rezidive können bei *P. falciparum* bis zu zwei Jahre nach Infektion auftreten (Frührezidiv), bei *P. malariae* wurden Spätanfänge sogar bis zu 52 Jahren (Spätrezidiv) nach einer Erstinfektion beschrieben.

Abb. Nr. 1 Lebenszyklus von Plasmodien



aus: Tropen- und Reisemedizin, J. Knobloch

1.3. Pathogenese von *P. falciparum*

Eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie von *Plasmodium falciparum* stellt die Fähigkeit dar, am Endothel von Kapillaren und postkapillären Venolen verschiedener Organe zu adhären (Luse u. Miller 1971, MacPherson 1985).

Dieser Vorgang, bei dem die infizierten Erythrozyten erst an der Kapillarwand entlang rollen, um sich dann später ans Endothel anzuheften, wird auch als Sequestration bezeichnet (Berendt et al. 1994; Cooke et al. 1995). Die Sequestration reifer Trophozoiten und Schizonten, die bevorzugt in Organen wie Gehirn, Niere, Lunge und Plazenta stattfindet, ermöglicht es den Parasiten, der Aussortierung in der Milz (Pitting) und damit ihrer eigenen Zerstörung zu entgehen. Diese Stadienspezifität erklärt auch die Abwesenheit reifer Trophozoiten und Schizonten im Peripherblut, während bei *P. ovale*, *P. vivax* und *P. malariae* alle Stadien in der Peripherie anzutreffen sind.

Neben der Sequestrierung spielt auch das Rosetting eine wichtige Rolle im Pathomechanismus von *P. falciparum*. Beim Rosetting beobachtet man eine Aggregatbildung von parasitierten Erythrozyten mit mindestens zwei nichtinfizierten Erythrozyten (Wahlgren 1986). Es wird auch in Zusammenhang mit der Pathogenese der cerebralen Malaria gestellt (Carlson et al. 1990).

Sowohl Sequestration als auch Rosetting führen zu einer Obstruktion von Kapillaren, mit einer resultierenden Sauerstoffverminderung, die wiederum eine anaerobe Glycolyse und Laktatazidose hervorrufen (White und Ho 1992).

Zur Zerstörung des Gewebes und zur klinischen Manifestation tragen die Induktion von inflammatorischen Zytokinen wie z. B. TNF- α und NO (Clark et al. 1987) bei. Obwohl angenommen wurde, dass der Vorgang des Rosettings die Zytoadhärenz infizierter Erythrozyten durch verminderten Fluss erleichtert, konnte Maubert (1998) in seiner Studie zeigen, dass keine Aggregatbildung innerhalb plazentaassoziierter Erythrozyten stattfindet, und Rosetting keine Rolle im Pathomechanismus plazentaler Malaria zu spielen scheint.

Cranston (1984) sah die Ursache der Sequestration in einer rein mechanischen Obstruktion der Kapillaren durch wenig deformierbare infizierte Erythrozyten. Jedoch konnte er damit nicht die bevorzugte Sequestration verschiedener Parasiten in bestimmten Organen (Organtropismus) erklären (MacPherson et al. 1995).

1.4 Malaria in der Schwangerschaft

Im Jahre 1937 beobachtete Wickramasuriya als erster während einer Epidemie in Sri Lanka die verheerenden Auswirkungen einer Malaria auf Schwangere und ihre Feten. In den folgenden Jahren wurden epidemiologische und klinische Untersuchungen in Hinblick auf schwangerschaftsassozierte Malaria mit folgenden Ergebnissen angestellt:

Symptomatik:

Hinsichtlich der symptomatischen Auswirkungen beschrieb Menon 1972 ausgehend von einer schweren Malaria bei Schwangeren in Malaysia Aborte, Frühgeburtlichkeit bis hin zum Tod der Mutter. Brabin stellte in seiner Studie von 1983 fest, dass in Gebieten mit stabiler Malariatransmission die mütterliche Morbidität hauptsächlich durch eine Anämie repräsentiert wird. Als pathologische Auswirkung auf den Fetus wurden erstmals 1968 von Jeliffe und später 1983 von McGregor ein reduziertes Geburtsgewicht beobachtet. Diese Reduktion lässt sich auf eine intrauterine Wachstumsretardierung zurückführen, die 1984 von McGregor als dominanter Mechanismus bei einer plazentalen Infektion angeführt wurde. Sie ist somit auch ein wesentlicher Mortalitätsfaktor für Neugeborene.

Epidemiologie:

Die Auswirkungen und Frequenz einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* hängen vom Immunitätsstatus, der Anzahl der Schwangerschaften sowie von der epidemiologischen Lage ab.

So konnten Gilles 1969 und Brabin 1983 zeigen, dass die Manifestation einer Malaria bei schwangeren Frauen schwerwiegender war als bei Nichtschwangeren. In Gebieten mit geringer oder unstabiler Transmission ist das Risiko für Schwangere an einer schweren Malaria zu erkranken oder gar an der Infektion zu sterben 2 bis 10mal höher als bei Schwangeren in stabilen Transmissionsgebieten. Auch das Risiko eines Spontanabortes oder der Frühgeburtlichkeit für den Fetus ist an die epidemiologische Situation gebunden (Brabin 1983).

Betrachtet man die Prävalenz einer *Plasmodium falciparum*- Infektion in Abhängigkeit vom Graviditätsstatus, so stellte Brabin 1983 fest, dass insbesondere Erst- und Zweitgebärende an Malaria erkranken und die Häufigkeit sowie die Schwere des Krankheitsverlaufes in den folgenden Schwangerschaften abnehmen. Nach Schätzungen von Steketee im Jahre 2001 sterben von 50 Millionen Schwangeren in Malaria endemischen Gebieten pro Jahr 75 000 bis zu 200 000 an den Folgen einer Infektion.

1.4.1 Sequestration in der Plazenta

Der Mechanismus der massiven Anhäufung von infizierten Erythrozyten in der Plazenta warf bis vor einigen Jahren noch viele Fragen auf. So wurde häufig eine Parasitämie in der Plazenta angetroffen, welche die in der Peripherie sogar um ein Vielfaches übersteigt (Brabin 1983; Bulmer et al. 1993).

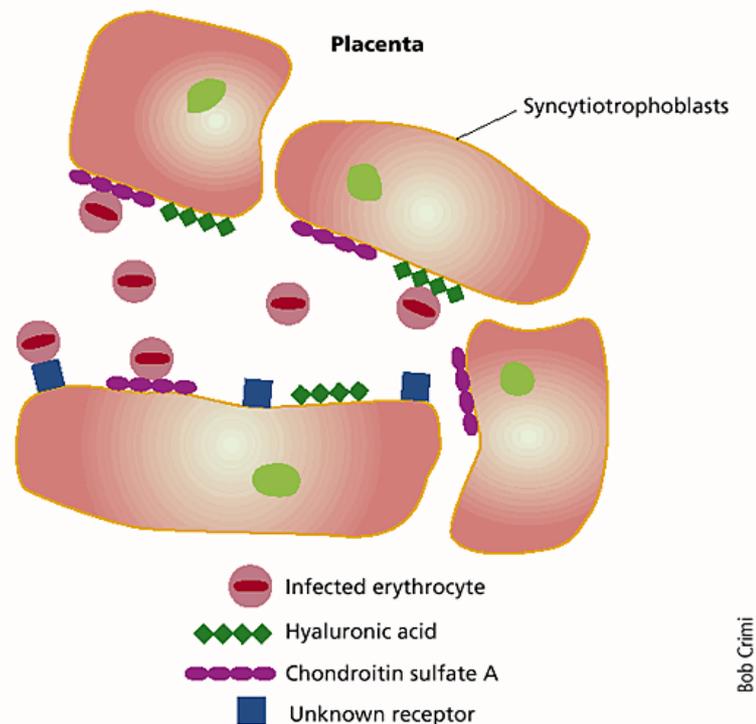
Als Ursache der Sequestration und einer erhöhten Anfälligkeit für Malaria bei Erstgebärenden wurde eine generalisierte Immunsuppression angenommen, die durch erhöhte Cortisolspiegel aufrechterhalten wird (Weinberg 1984; Brabin 1985). Es konnte gezeigt werden, dass der Cortisolspiegel bei schwangeren Frauen mit einer plazentalen Malaria höher war, als bei Schwangeren, die keine Infektion aufwiesen (Vleugels et al. 1989).

Mit der Hypothese der cortisolvermittelten Immunsuppression konnte jedoch nicht die bevorzugte Sequestration und Vermehrung von Parasiten in der Plazenta erklärt werden. Zudem lässt sich die Hypothese nicht mit der Tatsache vereinbaren, dass der Cortisolspiegel kontinuierlich in der Schwangerschaft absinkt, die Anfälligkeit für Malaria aber erst im zweiten Trimester ihren Höhepunkt erreicht.

Histologische Untersuchungen von infizierten Plazenten zeigen, dass parasitierte Erythrozyten bevorzugt an die Syncytiotrophoblastenzelllinie binden (Walter et al. 1982 ; Yamada et al. 1989).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass eine spezifische molekulare Wechselwirkung zwischen der Oberfläche des Syncytiotrophoblasten und des infizierten Erythrozyten als Mechanismus der Sequestration nahe liegt.

Abb. Nr. 2 Sequestration in der Plazenta



aus: „Sticky sugars attract malaria to the fetus“; M. Wahlgren; Nature Medicine 2000

1.4.2 Plazentaassoziierte Rezeptoren

Chondroitinsulfat A (CSA):

Nachdem bereits eine Protein – Protein - Interaktion als Ursache für die Sequestration infizierter Erythrozyten im Gewebe vermutet wurde, gelang es Robert 1995 in seinen *In- vitro* – Experimenten, Chondroitinsulfat A (CSA) als Rezeptor für die Sequestration zu identifizieren und bewies damit die Bindung an einen Zucker. CSA ist ein Glycosaminoglykan, welches alternierend aus Glucuronsäure - einheiten und N- Acetyl Galaktosaminen zusammengesetzt ist und strukturell Heparansulfat und Heparin gleicht.

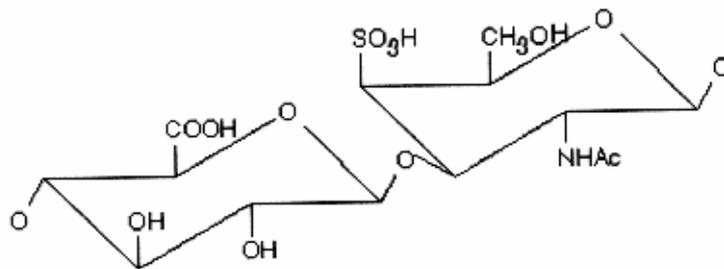
Chondroitinsulfat wurde histologisch als ein Bestandteil der Syncytiotrophoblastenoberfläche in der Plazenta identifiziert (Martin 1974; Parmley 1982).

Doch auch auf Endothelzellen im Gehirn, in der Lunge und in der Nabelschnur konnte der Zucker nachgewiesen werden (Robert et al. 1995 ; Silamut 1999).

In einer kenianischen *in vitro*- Bindungsstudie weisen Fried und Duffy 1996 eindeutig die Rolle von CSA im Pathomechanismus plazentaassoziiierter Malaria

nach. Dabei zeigen parasitierte Erythrozyten, die direkt aus Plazenten gewonnen wurden, eine signifikante Bindung an CSA, während Parasitenisolate von Männern, Nichtschwangeren und Kindern diese Bindungseigenschaft nicht aufweisen. Fried und Duffy schlossen aus dieser Beobachtung, dass es sich für die spezifische Bindung an CSA bei Schwangeren demnach um eine eigene Parasitensubpopulation handeln muss, die sich in ihren antigenen Eigenschaften von anderen unterscheidet. Obwohl, wie bereits erwähnt, CSA auch in Gehirn, Lunge und Nabelschnur repräsentiert ist, bleibt dennoch offen, ob, wie von Fried und Duffy postuliert, die CSA-Bindung rein plazentaspezifisch ist und welche Prozesse bei der spezifischen Akkumulation in der Plazenta ausschlaggebend sind.

Abb. Nr. 3 Struktur von Chondroitinsulfat A (CSA)



1.4.3 Hyaluronsäure (HA)

Hyaluronsäure gehört ebenfalls zur Gruppe der Glycosaminoglykane und unterscheidet sich von CSA in seiner fehlenden Sulfatierung (Laurent et al. 1992). Dem Rezeptor wird eine vermittelnde Rolle in der Sequestration von infizierten Erythrozyten in der Plazenta zugeschrieben (Beeson et al. 2000). HA konnte wie CSA auf der Oberfläche von Syncytiotrophoblasten nachgewiesen werden (Marzioni et al. 2001). Die Bedeutung von HA als Rezeptor ist jedoch kontrovers. So adhären die meisten Parasitenisolate, die eine spezifische Bindungseigenschaft für CSA aufweisen auch an HA, jedoch meist auf niedrigerem Niveau. Umgekehrt ist die alleinige Bindung an HA nur in sehr wenigen Fällen zu beobachten. Obwohl nicht

auszuschließen ist, dass eine Subpopulation mit spezifischen Bindungseigenschaften für HA existiert, wird die Adhäsion auf eine „Verunreinigung“ der Hyaluronsäure mit CSA zurückgeführt. Andere Bindungsstudien, in denen eine gereinigte Form von HA aus Streptokokken verwendet wurde, zeigen diese spezifischen Bindungseigenschaften nicht mehr (Valiyaveetil et al. 2001).

1.4.4 Weitere Zytoadhärenzrezeptoren

Während CSA und HA als spezifische Rezeptoren für die Sequestration in der Plazenta aufgefunden werden konnten, schreibt man die Zytoadhärenz in peripheren Gefäßen vor allem CD 36 und ICAM-1 (CD 54) zu. CD 36 und ICAM-1 sind häufige Rezeptoren für die Sequestration infizierter roter Blutzellen bei Männern, Nichtschwangeren und Kindern.

CD 36 ist ein Glykoprotein, welches vorwiegend auf Endothelzellen von Kapillaren und kleinen Blutgefäßen exprimiert wird. Eine geringe Expression lässt sich auch auf dem Endothel von Gehirnkapillaren bei Patienten mit nicht komplizierter Malaria nachweisen (Ockenhouse et al. 1991).

Obwohl ICAM-1 ebenfalls auf der Oberfläche von Syncytiotrophoblasten vorkommt (Maubert et al. 1997) und somit als möglicher Rezeptor für die Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta vermutet wurde, konnte eine Rolle im Pathomechanismus plazentaler Malaria nicht nachgewiesen werden (Sartelet et al. 2000 ; Maubert et al. 2000). Vielmehr scheint ICAM-1 in der Pathogenese cerebraler Malaria verwickelt zu sein, da besonders in schweren Fällen cerebraler Malaria ICAM-1 als häufigster Bindungsphänotyp beobachtet wurde (Turner et al. 1994).

Erst kürzlich beschrieben Flick und Scholander (2001) das Phänomen der Adhärenz zwischen infizierten Erythrozyten und nichtimmunen IgG- Antikörpern. Während die IgG- Antikörper mit ihrem variablen Fab- Teil den *P. falciparum*- infizierten Erythrozyten binden, fungiert der konstante Fc- Teil des Antikörpers als bindendes Glied zum Fc-Rezeptor auf der Plazenta. Inwiefern der plazentale Fc- Rezeptor zur Sequestration des Antikörper- Erythrozyten –Komplexes beiträgt, konnte in dieser *In vitro*-Studie jedoch nicht ausreichend geklärt werden.

1.5. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein - 1 (PfEMP1)

An der Zytoadhäsion sind neben den bereits erwähnten Rezeptoren auf der Gefäß- bzw. Zelloberfläche auch Parasitenantigene beteiligt. Die Reifung vom zirkulierenden Ringstadium zum pigmentierten Trophozoiten bewirkt zum einen die Ausbildung von sog. knobs, welche sich als knopfähnliche Vorwölbungen der Erythrozytenmembran darstellen. Zum anderen wird im späten Trophozoitenstadium das Parasitenantigen PfEMP1 produziert und an die Oberfläche der Erythrozytenmembran transportiert.

PfEMP1, ein hochmolekulares Protein von 250 kDa, verankert sich unter der Oberfläche der elektronendichten knobs, indem es eine molekulare Wechselwirkung mit dem knob associated histidine-rich proteins (KAHRP) eingeht (Waller et al. 1999). Die knobs sind durch ihre Aufgabe der Proteinpräsentation somit nur indirekt an der Zytoadhäsion beteiligt, wohingegen PfEMP1 als direkter zytoadhärenzvermittelnder Ligand aufgefasst werden kann.

Die Exposition des parasitären Antigens auf der Oberfläche des Erythrozyten verhindert durch die Sequestration im Endothel und im Gewebe eine Aussortierung durch die Milz. Andererseits wird das antigene PfEMP1 durch die Präsentation auf der Zelloberfläche zur Zielscheibe des Immunsystems.

Um dieses Problem erfolgreich zu umgehen, entwickelte *P. falciparum* eine antigene Variation, durch die ein Parasitenstamm verschiedene PfEMP1-Moleküle sequentiell exprimieren kann. Diese Fähigkeit zur antigenen Variation macht sich der Parasit zunutze, indem er das membranständige PfEMP1-Molekül unmittelbar nach Reinvasion durch ein anderes PfEMP1-Molekül ersetzt (Borst 1995). Sowohl die Fähigkeit zur Adhäsion, als auch die antigene Variation ermöglicht es *P. falciparum* eine persistierende Infektion aufrechtzuerhalten.

1.5.1. Die *var*-Gen-Familie

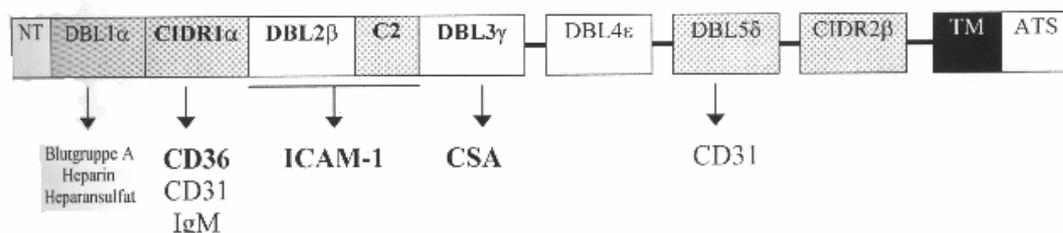
Das PfEMP1-Antigen wird durch die hoch variable *var*-Gen-Familie kodiert (Baruch et al. 1995; Smith et al. 1995; Su et al. 1995). Die *var*-Gene sind vorwiegend in den subtelomeren Regionen der insgesamt 14 *Plasmodium falciparum*- Chromosomen lokalisiert und verfügen über 59 verschiedene Kopien. Experimentelle Daten legen jedoch nahe, dass nur ein *var*-Gen auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert wird

und somit durch das jeweils kodierte PfEMP1 die Antigenität und die Präferenz für einen bestimmten Wirtsrezeptor vorgibt (Rowe et al. 1997).

Die hohe Antigenvariation bei *P. falciparum* beruht auf sogenanntes Gen-Switching. Die Häufigkeit, mit der ein neues *var*-Gen aus dem Repertoire exprimiert wird und somit die antigene Eigenschaft festlegt, liegt bei 2% pro Parasitenzyklus (Roberts et al. 1992).

Strukturell ist das *var*-Gen aus zwei Exonen aufgebaut. Exon I kodiert für den variablen extrazellulären Teil von PfEMP1, welche die Zytoadhärenz vermittelt. Exon II dagegen kodiert für den konservierten intrazellulären Anteil, welche PfEMP1 mit den submembranösen knob-Strukturen verankert (Waller et al. 1999).

Abb. Nr. 4 Struktur von PfEMP1 mit den unterschiedlichen Domänen und den dazugehörigen Rezeptoren



Der extrazelluläre Rahmen besteht aus einer semikonservierten Kopfstruktur, die aus einer Duffy-binding-like-Domäne (DBL) und einer CIDR-Domäne (Cysteinerich-interdomaine-region) zusammengesetzt ist. Gefolgt wird die semi-konservierte Struktur von einer sog. Tandem-Assoziation, die jeweils aus DBL-, C2 (Constant 2)- oder CIDR- Domänen kombiniert sind .

Bei einigen Domänen konnten bestimmte Funktionen in der Pathogenese von PfEMP1 im Sinne einer Spezifität für den Rezeptor entschlüsselt werden. So vermittelt z.B. die semikonservierte DBL1 α -Domäne die Bindung an sog. Rosetting-Rezeptoren wie CR1, Blutgruppe A oder Heparansulfat. Die variablen DBL2 β - oder C2-Domänen werden in Verbindung mit der Adhäsion an ICAM-1 gebracht, ein Rezeptor, der mit cerebraler Malaria assoziiert wird.

1998 gelang die Identifikation der PfEMP1-Domäne, welche ausschließlich die Bindung an CSA vermittelt und somit eine Schlüsselrolle in der Pathogenese plazentaler Malaria spielt: DBL3 γ . Die Mechanismen der *var*-Gen-Expression, die dazu führen, dass nur die adhärenzspezifische Domäne für CSA exprimiert wird unter Ausschluss anderer rezeptorspezifischer Domänen, konnte bislang nicht geklärt werden. Denn bisher blieb die Suche nach einem PfEMP1, welches zugleich die Adhärenz an CSA und CD36 vermittelt, ohne Erfolg (Gamain 2001).

1.5.2 Rifin Proteine

Im Rahmen des *P.falciparum* Genomprojektes gelang die Identifizierung der größten Genfamilie, der sogenannten Rifin Proteine. Sie werden durch die rif (repetitive interspersed family) Gene kodiert und liegen in ca. 150 Kopien vor.

Die Größe des membranassoziierten Proteins variiert zwischen 27-39 kDa. Rif Gene bestehen aus zwei Exonen. Das erste Exon umfasst ein Signalprotein. Das zweite Exon kodiert für eine extrazelluläre Domäne, die aus einem konservierten und variablen Anteil zusammengesetzt ist, sowie für eine kurze intrazelluläre Domäne (Gardner et al. 2002).

Im Gegensatz zur *var*-Gen-Familie, bei der jeweils nur ein Protein auf der Membranoberfläche erscheint, wird angenommen, dass bei den Rif-Genen pro Zyklus mehrere Proteine exprimiert werden. Die genaue Funktion der Rifin Proteine bleibt jedoch noch unklar. Aufgrund der Lokalisierung auf der Membranoberfläche und der antigenen Variation könnte es jedoch eine essentielle Rolle während der Wirt-Parasiten-Interaktion im asexuellen Blutstadium spielen.

1.6. Immunität gegen PfEMP1

Die klinische Ausprägung einer Infektion mit *P.falciparum*, von grippeähnlicher Symptomatik bis hin zu cerebraler Malaria, hängt vom Immunstatus des Betroffenen ab. Erwachsene, die in malariaendemischen Gebieten aufgewachsen sind, besitzen eine klinische Immunität gegen *P.falciparum* infolge wiederholter Infektionen. Die Exposition mit verschiedenen PfEMP1-Oberflächenproteinen im Laufe der Kindheit führt zur Ausbildung eines Antikörperrepertoires, welches Männern, nicht-

schwangeren Frauen und Kindern über 12 Jahren einen gewissen Schutz vor wiederholten Infektionen und schwerer klinischer Manifestation vor Malaria verleiht. Bei schwangeren Frauen schützt die natürlich erworbene Immunität jedoch nur zum Teil: Sera klinisch immuner Erwachsener weisen - als Zeichen zurückliegender Infektionen - die Fähigkeit auf, Parasitenisolate von infizierten Kindern zu agglutinieren. Auch Sera von Schwangeren können Parasitenisolate von Männern, nichtschwangeren Frauen und Kindern agglutinieren. Umgekehrt findet man im Serum von Männern und Erstgebärenden keine Antikörper gegen Parasitenisolate aus Plazenten oder aus dem Peripherblut schwangerer Frauen (Beeson 1999). Erstgebärende haben zwar ein Repertoire von anti-PfEMP1-Antikörper ausgebildet, sie richten sich aber vorwiegend gegen CD36-bindende Parasiten. Aufgrund von kaum vorhandenen Antikörpern gegen den CSA-bindenden Liganden eröffnet sich dem *P.falciparum* Parasiten nun eine neue Nische in der ersten Schwangerschaft. Dies führt zur Annahme, dass während der Schwangerschaft die Selektion einer Subpopulation erfolgen muss, die nun nicht mehr über die PfEMP1-Domäne CIDR1 α an den Endothelrezeptor CD36 bindet. Der Schlüsselmechanismus, der für die Pathogenese und die Aufrechterhaltung der Infektion während der Schwangerschaft zuständig ist, besteht im sog. Gen-Switching, bei dem statt der PfEMP1-Domäne CIDR1 α die CSA-bindende Domäne DBL3 γ auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert wird.

Das Antikörperrepertoire und die Immunitätslage ändern sich jedoch mit jeder Schwangerschaft: So weisen Sera von Mehrfachgebärenden Agglutinationseigenschaften gegen Parasitenisolate von Schwangeren auf, was darauf schließen lässt, dass mit jeder neu auftretenden Schwangerschaft neue Antikörper gegen unterschiedliche Parasitenantigene gebildet werden und so vor schweren Infektionen in folgenden Schwangerschaften schützen.

1.7. Entwicklung eines Malariaimpfstoffes

Obwohl in der Therapie der *Malaria tropica* effektive und kostengünstige Arzneimittel zur Verfügung stehen, wird die Behandlung in den letzten Jahren zunehmend durch Resistenzentwicklung gegen diese Chemotherapeutika erschwert. Neben der Entwicklung neuer Medikamente konzentriert sich die Malariaforschung zunehmend auf die Suche und Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes. Profitieren würde vor allem die Bevölkerung in Endemiegebieten, also Neugeborene, Kinder und schwangere Frauen (insbesondere Erstgebärende), bei denen ein Ausbruch schwerer Malaria verhindert werden soll. Aber auch nichtimmune Reisende sowie Flüchtlinge, die oft von der öffentlichen Gesundheitsversorgung abgeschnitten sind, gehören zur Risikogruppe. Neben einer effektiven Behandlung stehen auch ökonomische Gesichtspunkte im Vordergrund: Die Kosten, die durch Malaria allein im tropischen Afrika entstehen, belaufen sich auf ca. 2 Milliarden US-Dollar pro Jahr. Die Entwicklung eines effektiven Malariaimpfstoffes wird durch die Komplexität des *Plasmodium falciparum* – Parasiten - in Form einer Expression von stadienspezifischen Parasitenantigenen - erschwert.

Daraus wird ersichtlich, dass für einen idealen Impfstoff die Suche geeigneter Parasitenantigene und die Kombination von Antigenen verschiedener Stadien sowie die Kombination verschiedener Antigene eines Stadiums notwendig ist, um in die unterschiedlichen Stadien des Parasitenzyklus einzugreifen. Neben der Induktion einer ausreichenden Antikörperantwort sollte der Impfstoff eine starke zelluläre Immunantwort hervorrufen, an der unter anderem Zelltypen wie T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und Natürliche Killerzellen beteiligt sind.

Da die Kombination von geeigneten Antigenkandidaten noch aussteht, konzentriert sich die Forschung derzeit auf die Suche und Erprobung stadienspezifischer Antigene:

1. Anti- Sporozoiten- Impfstoff: Er richtet sich gegen die Leberstadien und hindert die Sporozoiten an einer Invasion in die Hepatozyten. Mit diesem Impfstoff werden klinische Manifestationen wie Anämie und Fieber verhindert. Sogenannte Anti-Infektionsimpfstoffe würden vor allem nichtimmunen Reisenden einen Schutz verleihen.

2. Anti- Merozoiten- Impfstoff: Der Impfstoff wendet sich gegen die asexuellen Blutstadien. Er verringert die Parasitendichte im Blut und reduziert somit die Schwere und Dauer einer Infektion und die Erkrankung.
3. Anti- Adhäsions- Impfstoff: Er verhindert die Sequestration reifer Blutstadien an Endothelzellen und die damit verbundene inflammatorische Reaktion.
4. Transmissionsblockierende-Impfstoffe: Sie richten sich gegen die sexuellen Stadien im Moskito und unterbinden sowohl die Entwicklung im Vektor selbst, als auch die weitere Übertragung von Plasmodien.
5. Anti-Toxin-Impfstoffe: Impfstoffe gegen das Malaria - Toxin Glycosylphosphatidylinositol (GPI) induzieren neutralisierende Antikörper, welche vor schwerwiegenden Folgen wie Azidose, Lungenödeme und cerebrale Symptome schützen.

Die Entwicklung eines Impfstoffes ist trotz einer großen antigenen Variation und eines Proteinpolymorphismus einzelner Parasitenproteine, wie z.B. bei PfEMP1, durchaus nicht aussichtslos.

In molekularbiologischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die PfEMP1 - Domäne CIDR kreuzreaktive Epitope besitzt. Monoklonale Antikörper, die spezifisch gegen diese Domäne gerichtet waren, zeigten auch Kreuzreaktionen mit CIDR-Domänen anderer Parasitenstämme (Gamain et al. 2001). Voraussetzung dafür ist eine konservierte Region innerhalb des variablen Moleküls. Für die CSA-bindende DBL3 γ -Domäne konnten ebenfalls Hinweise für eine strukturelle Konservierung geliefert werden (Khattab 2003).

Ein Ziel der Studie ist es deshalb, die konservierten Eigenschaften von DBL3 γ in Bindungsstudien mit Parasitenstämmen aus verschiedenen geografischen Regionen zu belegen.

1.8. Zielsetzung

Im ersten Teil der vorliegenden Studie wurden Plasma- Proben von insgesamt 164 schwangeren Frauen gesammelt, die sich im Zeitraum von Mai bis Oktober 2002 auf der Entbindungsstation des Albert- Schweitzer-Krankenhauses in Lambaréné/ Gabun präsentierten. Mit Hilfe der zytometrischen Durchflussanalyse wurde die Entwicklung von Antikörpern in diesen Frauen analysiert, welche sich gegen variante Oberflächenantigene (VSA) auf *Plasmodium falciparum*- infizierten Erythrozyten richteten. Zum einen wurde die Antikörperreaktivität in Abhängigkeit vom Graviditätsstatus untersucht. Zum anderen sollte analysiert werden, ob die Höhe des Antikörperlevels von einer Infektion zum Zeitpunkt der Entbindung abhängt.

Ferner soll in der vorliegenden Arbeit die Inhibition der Bindung an CSA mit Antikörpern unterschiedlicher Herkunft überprüft werden, unter anderem mit Antikörper gegen DBL3 γ .

Der PfEMP1-Domäne DBL3 γ wird eine essentielle Rolle in der Pathogenese schwangerschaftsassoziierter Malaria zugeschrieben, da sie die Sequestration infizierter Erythrozyten an Syncytiotrophoblasten vermittelt.

Mit Hilfe dieser funktionellen Studien soll ermittelt werden, ob sich die Hinweise auf eine strukturelle Konservierung der DBL3 γ -Domäne bestätigen lassen.

2. Patienten und Methoden

2.1 Studienaufbau

Der erste Teil der Studie wurde von Mai bis Mitte Oktober 2002 am Albert-Schweitzer – Krankenhaus in Lambaréné durchgeführt. Dieser Aufenthalt diente vorwiegend dem Sammeln von Probenmaterial, welches von den teilnehmenden Müttern, aus der Nabelschnur und der Plazenta gewonnen wurde.

Von November 2002 bis Mai 2003 wurde die Studie im Tübinger Institut für Tropenmedizin fortgeführt. Dort wurde mit Hilfe der FACS - Analyse verglichen, inwiefern sich die Erkennung von schwangerschaftsspezifischen Oberflächenproteinen zwischen Primi- und Multigraviden unterscheidet.

Außerdem wurden plazentale Parasiten auf ihre Bindungseigenschaften an Rezeptoren untersucht, die während der Schwangerschaft auf der Plazentaoberfläche exprimiert werden.

Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der internationalen Stiftung des Albert – Schweitzer – Krankenhauses sowie der Universität Tübingen gebilligt.

2.2 Studienort

Der erste Abschnitt der Studie wurde im Forschungslabor des Albert-Schweitzer-Krankenhauses in Lambaréné durchgeführt. Lambaréné, am Fluss Ogooué gelegen, bildet mit 15000 Einwohnern das Zentrum der Provinz Moyen-Ogooué und liegt im zentralafrikanischen Gabun. Im Norden grenzt Gabun an Äquatorialguinea und Kamerun, im Osten und im Süden an Kongo und westlich an den Atlantik.

Das Klima ist feucht-tropisch mit einer 80-90%-igen Luftfeuchtigkeit, und die Temperatur schwankt nur gering um 27°C im Jahresmittel. Es gibt zwei Regenperioden in Gabun, wobei die eine von Oktober bis Dezember andauert und die zweite sog. Grosse Regenzeit von Januar bis Mai. Die jährliche Niederschlagsmenge beträgt 2000 mm pro Jahr und nimmt an Intensität in Richtung Osten ab. Diese klimatischen Gegebenheiten bilden damit optimale Voraussetzungen für das Überleben der Anopheles Mücke, was Gabun so als hyperendemisches Übertragungsgebiet auszeichnet mit einer entomologischen

Inokulationsrate von 50 infektiösen Stichen pro Jahr (Wildling et al. 1995, Sylla et al. 2000). 90% aller Malariafälle werden dabei von *Plasmodium falciparum* verursacht mit saisonalen Schwankungen, die in der kleinen Regenzeit von Oktober bis Dezember ihren Höhepunkt erreichen. Doch auch *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* sind in Gabun endemisch.

Abb. Nr. 5 Landkarte von Gabun



Das Albert-Schweitzer-Krankenhaus liegt einige Kilometer von Lambaréné entfernt auf der gegenüberliegenden Flussseite und umfasst etwa 150 Betten für die Abteilungen Chirurgie, Innere Medizin, Pädiatrie sowie für die Geburtsstation. Auf dem weitläufigen Gelände des Krankenhauses befinden sich zudem Unterkünfte für die Angestellten, eine Zahnklinik sowie eine Grundschule.

2.3 Patienten

Im Zeitraum von Mai bis Mitte Oktober wurden insgesamt 164 Mütter für die Studie aufgenommen, die nicht durch Kaiserschnitt entbunden hatten.

Dabei wurden sie über den Zweck und die Durchführung der Studie aufgeklärt und gaben ihre Einwilligung durch schriftliches Einverständnis.

Es wurden demographische Daten ermittelt wie Name, Alter, Adresse, ethnische Gruppenzugehörigkeit, Blutgruppe, Gravitäts- und Paritätsstatus, Einnahme von Prophylaxe (Nivaquine) und wöchentlicher Dosis. Zudem wurden sie nach Malaria oder anderen Infektionen während der Schwangerschaft gefragt.

Bei allen Müttern wurde ein Dicker Tropfen des Peripherblutes angefertigt und nach Parasiten untersucht. Erwies sich der Befund als positiv, so wurden sie bei milder Malaria oral mit Chinin über einen Zeitraum von einer Woche behandelt (6 x 300 mg pro Tag). Patientinnen mit schwerer Malaria wurden stationär behandelt. Sie erhielten zunächst Chininchlorid (7 mg/kg Körpergewicht) intravenös über 30 Minuten und anschließend eine zweite Infusion Chininchlorid mit 10 mg/kg über 4 Stunden. Als weitere Erhaltungsdosis wurden alle 8 Stunden 10 mg/kg gegeben.

2.4 Probenentnahmen

Unmittelbar nach der Geburt wurde aus folgenden Bestandteilen Blut bzw. Gewebe entnommen:

- periphere Armvene der Mutter
- der noch abgeklemmten Nabelschnur (V. umbilicalis)
- Gewebe auf der mütterlichen Seite der Plazenta

Als erstes wurde dabei immer Nabelschnurblut entnommen, da dieses sehr schnell nach dem Abklemmen koagulierte. Dabei wurde etwa 5 cm über den Abgang eine Stelle der V. umbilicalis mit Alkohol desinfiziert und in einem Winkel von ca. 30° eingestochen. Das Blut wurde in mehreren Lithium Heparin (Li H4) Monovetten gesammelt.

Ebenfalls in LiH4-Monovetten wurde das mütterliche Peripherblut aufbewahrt. Auf der maternalen Seite wurde die Plazenta zunächst mit einem sterilen Skalpell zwischen Zentrum und Rand etwa 2 cm tief eingeschnitten.

Dabei war wichtig, möglichst nicht zu tief zu schneiden, um eine Vermischung mit dem fetalen Blut zu vermeiden. Das austretende Blut wurde zunächst in einer 2 ml Heparinmonovette aufgefangen. Danach wurde ein sog. Abklatsch nach der Lambaréné-Methode auf einem Objektträger angefertigt und zusätzlich ein Dicker Tropfen mit 10 µl Blut auf einem zweiten Objektträger ausgestrichen, um die Parasitämie quantitativ auswerten zu können.

Nach diesen Schritten wurde aus jeweils vier Stellen zwischen Zentrum und Rand der Plazenta Gewebeteile von 3 x 2 x 2 cm ausgeschnitten und einzeln in jeweils 15 ml steriler Lithium-Heparinlösung (10 U/µl) in einem 50 ml Falcon-Tube aufbewahrt.

2.5 Malariadiagnostik

Für die Diagnose einer Malaria tropica wurden jeweils aus Peripher-, Plazenta- und Nabelschnurblut Dicke Tropfen angefertigt und mikroskopisch auf asexuelle Parasiten untersucht. Dabei wurde aus allen drei Kompartimenten jeweils ein 10 µl-Tropfen gleichmäßig über einer Fläche von 10x18mm auf einem Objektträger verteilt. Die Dicken Tropfen wurden dann zum Trocknen im Trockenschrank aufbewahrt und anschließend 20 Minuten in Giemsa-Lösung gefärbt. Die Färbelösung wurde regelmäßig neu aus einer konzentrierten Stocklösung und Trisolphosphatpuffer im Verhältnis 1:5 hergestellt und durch spezielles Papier gefiltert.

Nach der Färbung wurde der Objektträger vorsichtig in Wasser gewaschen und wieder getrocknet. Anschließend wurde dann bei 1000-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Tropfens Immersionsöl mikroskopiert.

Für die quantitative Auswertung der Parasitämie wurden 100 Felder nach Parasiten durchmustert. 100 Felder entsprechen 1/6 µl Blut. Die Zahl der gezählten Parasiten wurde mit dem Umrechnungsfaktor 6 multipliziert, was dann die Parasitämie pro µl ergab. Die genaue Stadienbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Ausstriches. Dazu wurde etwa 2 µl Blut auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem anderen Objektträger ausgestrichen.

Nach einer 30 Sekunden andauernden Fixierung in Methanol erfolgte die Färbung des Ausstrichs nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben.

2.5.1 Zusätzliche hämatologische Diagnostik

Neben der Suche nach *P. falciparum*, die im Vordergrund stand, wurden weitere hämatologische Parameter mit der QBC – Methode (Quantified Buffy Coat) ermittelt: Hämatokrit, Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Eosinophile und Basophile.

2.6. Parasitenisolate

Für die nachfolgenden Versuche wurden je zwei gabunesische (Gb 218 und Gb 337) und senegalesische (VIP 42 und VIP 43) Wildisolate aus der Plazenta verwendet.

Bei Gb 218 handelt es sich um ein Isolat einer Mehrfachgebärenden mit einem Graviditätsstatus von 3, VIP 42 und VIP 43 sind ebenfalls von Multigraviden mit einem dazugehörigen Graviditätsstatus von 5 bzw. 3. Lediglich das gabunesische Isolat Gb 337 stammt von einer Erstgebärenden.

Die infizierten Erythrozyten wurden sofort nach Diagnose von *Plasmodium falciparum* mittels Ficoll – Separation von den weißen Blutkörperchen getrennt und in *in vitro* Kultur überführt. Dabei wurden sie solange in Kultur gehalten, bis Trophozoiten erstmals im Ringstadium auftraten und somit bei ausreichend hoher Parasitämie eingefroren werden konnten.

2.7 In- vitro- Adaptation von Parasitenisolaten

Um die in Flüssigstickstoff gefrorenen Isolate wieder kultivieren zu können, wurde der Inhalt im Cryotube ca. 2 min bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min ; 1500 U/min) wurde der Überstand abgenommen und das verbleibende Erythrozyten-Volumen geschätzt.

Die äquivalente Menge an 3,5 % - iger NaCl - Lösung wurde tropfenweise hinzupipettiert, um eine osmotische Lyse zu verhindern. Dann wurde die NaCl-Erythrozyten – Suspension abzentrifugiert (5 min; 1500 U/min), das NaCl mit einer Pasteurpipette entfernt und durch 1ml Kulturmedium ersetzt.

Das Erythrozytenpellet wurde im Medium resuspendiert, erneut zentrifugiert (5 min; 1500 U/min) und nach Abnahme des Überstandes wiederum in 1 ml Medium verteilt.

Die Erythrozytensuspension wurde in einer sterilen Kulturflasche mit 5ml RPMI Medium (Gibco BRL) überführt, das zuvor mit 50 µl/ml Hypoxanthin, 2 mM HEPES-Puffer, NaHCO₃, Glutamax, 5% Albumax II, 2% humanem AB –Serum sowie 2,5 µg/ml Gentamycin angereichert worden war. Nach einer Einstellung auf 5% Hämatokrit mit 0+Blut wurde die Kultur in einer Atmosphäre von 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ inkubiert. Es wurde regelmäßig frisches , lymphozytenarmes 0+ Blut hinzugefügt, um den Hämatokrit von 5 % aufrechtzuerhalten. Die Isolate wurden kultiviert, bis eine Parasitämie von 2 – 4% erreicht wurde, und nach Abschluss der Versuche wieder im Ringstadium eingefroren.

2.8. Statische Bindungsstudien

Bei den statischen Bindungsstudien wurden die mit *P.falciparum* infizierten Erythrozyten auf ihre qualitative und quantitative Bindungseigenschaft hin untersucht. Dabei wurde nach folgenden Schritten vorgegangen:

- Vorbereitung der Bindungsplatten und Einwirkenlassen der Rezeptoren
- Inkubation der Erythrozytensuspension
- Entfernen der nichtgebundenen Erythrozyten durch mehrmaliges Waschen
- Fixierung der gebundenen Erythrozyten
- Färbung mit Giemsa
- Auswertung unter dem Inversionsmikroskop

Die Schritte werden im Einzelnen ausführlicher beschrieben:

a) Vorbereiten der Bindungsplatten und Einwirkenlassen der Rezeptoren:

Auf die Rückseite von Petrischalen (Falcon 1016) wurden Kreise von 1cm Durchmesser für den CSA-Rezeptor aufgemalt. Daraufhin wurden jeweils 7 µl des Rezeptors auf den Mittelpunkt des Kreises pipettiert. Die Konzentration von CSA betrug dabei 100 µl/ml und wurde aus einem Stock mit der Konzentration 10 µg/ml 1:100 verdünnt.

Man ließ den Rezeptor ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur einwirken und entfernte ihn danach. Auf die Platte wurden 4ml einer Blockierungslösung gegeben, die aus 1% BSA in PBS-Lösung, 0,05% Natriumazid und 27 µg/ml Gentamycin besteht. Die Platte wurde mit Parafilmstreifen abgedichtet und bei 4°C aufbewahrt.

b) Inkubation der Erythrozytensuspension

Bevor die Erythrozyten für die Bindungsstudie aufbereitet werden konnten, musste mikroskopisch überprüft werden, ob sich die Parasiten im späten Trophozoitenstadium befanden, da erst nach Ablauf des jungen Trophozoitenstadiums das Oberflächenprotein PfEMP1 auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert wird, welches die Bindung an CSA vermittelt.

Pro Platte wurden jeweils 3 bis 4ml von der Kultur entnommen, bei 1500 U/min und 5 Minuten zentrifugiert und das Kulturmedium durch die äquivalente Menge an Bindungsmedium ersetzt, welches sich aus RPMI 1640 Pulver, 16mM Glucose, 37,5 mM HEPES und 1% BSA in Wasser zusammensetzte. Das Bindungsmedium wurde auf einen pH von 6,9 eingestellt, bei dem sich die Bindung an CSA als optimal erwiesen hat.

Die so zubereitete Erythrozytensuspension wurde auf die Platte pipettiert und für eine Stunde in den Wärmeschrank bei 37°C gelegt, wobei nach jeweils 15 Minuten die abgesunkenen Erythrozyten durch leichte Schüttelbewegung resuspendiert wurden.

c) Waschvorgang

Nach 1 Stunde wurde die Erythrozytensuspension von der Platte entfernt. Die nichtgebundenen Erythrozyten wurden mit Bindungsmedium gewaschen, indem sie immer wieder durch leichtes Schütteln in Suspension gebracht wurden und somit abpipettiert werden konnten. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis unter dem Inversionsmikroskop außerhalb des markierten Kreises keine Erythrozyten mehr zu sehen waren.

d) Fixierung

Die gebundenen Erythrozyten wurden mit 2 ml einer 2%-igen Glutardialdehydlösung ca. 30 min lang fixiert und nach dem Vorgang einmal mit 2 ml PBS gewaschen.

e) Färbung

Gefärbt wurde eine Stunde lang mit 2 ml einer 10%-igen Giemsalösung, wobei zuerst durch spezielles Filterpapier und dann zusätzlich durch eine 0,22 µm Membran (Millipore) gefiltert wurde. Nach dem Vorgang wurden die Farbrückstände mit destilliertem Wasser entfernt und die Platte an der Luft getrocknet.

f) Auswertung

Unter 10-facher Vergrößerung wurden pro markiertem Rezeptorenfeld 4 Felder á 1 mm² ausgezählt und die durchschnittliche Anzahl der gebundenen Erythrozyten pro Feld bestimmt. Davon wurde aus 4 Feldern außerhalb des Kreises die durchschnittliche Anzahl der gebundenen Erythrozyten pro 1 mm² bestimmt und vom ersten Wert abgezogen. Der so erhaltene Wert entsprach der Anzahl der infizierten Erythrozyten/ 1mm².

2.9. Reagenzien für die Inhibition der Bindung

Für die Inhibition der Bindung infizierter Erythrozyten an CSA wurden drei verschiedene Arten von Reagenzien verwendet:

1) Antikörper, die in Ratten erzeugt wurden:

- gegen die DBL3 γ - Domäne aus einem kameruner Plazentaisolat,
- gegen die DBL1 α -Domäne aus dem kindlichen Peripherblut eines gabunesischen Isolates
- gegen das Oberflächenprotein rif 40, welches ebenfalls einem klinischen Isolat aus Gabun entstammt. Alle Oberflächenproteine wurden zuvor in *E. coli* exprimiert, um dann in Ratten die entsprechenden Antikörper gegen die gereinigte Form zu erhalten.
- Rattenserum, das man kurz vor der Immunisierung gegen die DBL3 γ -Domäne erhielt. Das Präimmunserum diente als Negativkontrolle.

2) Humansenen:

- Seren von primi- und multigraviden gabunesischen Frauen
- Seren von malariaexponierten gabunesischen Männern, die als Negativkontrolle dienen

3) Lösliches CSA einer Rindertrachea (SIGMA) mit einer Konzentration von 100 μ l/ml.

Für die Inhibitionstudien wurden jeweils 10 μ l aller aufgeführten Reagenzien pro ml Erythrozytensuspension hinzugefügt.

2.10 Aufbereitung infizierter Erythrozyten für die Analyse im Durchflusszytometer

Die IgG-spezifische Antikörperantwort von Schwangeren auf variante Oberflächenantigene (VSA) wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen. Dazu wurden die infizierten Erythrozyten kurz vor dem Versuch auf ihre Bindungsfähigkeit an CSA getestet und bei positivem Ergebnis für die Analyse weiterverarbeitet.

War die Adhäsionskapazität trotz hoher Parasitämie nicht ausreichend, wurden die infizierten Erythrozyten auf CSA-Bindung selektiert und anschließend so lange in Kultur gehalten, bis die Parasitämie auf über 2% anstieg.

Vor der Analyse im Durchflusszytometer wurden die infizierten Erythrozyten in einer Magnetsäule (MACS) von den nicht parasitierten getrennt. Dies war jedoch nur möglich, wenn sich die Mehrheit im Trophozitenstadium befand, da nur diese das magnetische Hämozoin enthalten. Die trophozoitenangereicherte Fraktion wurde auf ungefähr 2×10^6 Erythrozyten/ml in einer PBS +2%BSA-Lösung verdünnt. Die so entstandene Suspension wurde mit 20 μ l Ethidiumbromid (Konz.: 0,1 mg/ml) pro ml angereichert.

Je 100 μ l der Suspension wurde in Reagenzgläser aliquotiert und mit 5 μ l humanem Plasma für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS+2%BSA wurden 100 μ l einer Ziegen-Anti-Mensch-IgG-Antikörper-Lösung hinzugefügt (1:250 verdünnt) und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

Nicht gebundene Antikörper wurden beim Waschvorgang abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100 μ l einer (1:25 verdünnt) Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)-gekoppelten Hase-Anti-Ziegen-IgG-Antikörper-Lösung inkubiert.

Nach einem letzten Waschschritt wurde der Überstand aus infizierten Erythrozyten und gebundenen Antikörpern in 100 μ l PBS+2% BSA resuspendiert. Die so gefärbten Proben wurden dann einzeln im FACScan (Becton Dickinson N.J. USA) Durchflusszytometer analysiert, die Ergebnisse mit dem CellQuest 3.3 Software Programm verarbeitet.

2.11 Analyse im Durchflusszytometer

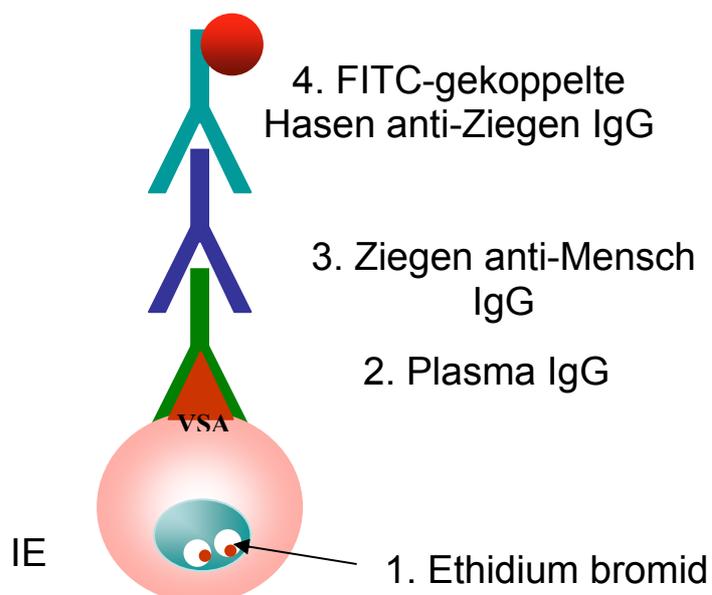
Das Durchflusszytometer wandelt optische Signale in elektronische Signale um. Suspendierte Einzelzellen werden an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden. Folgende Parameter werden dabei gemessen: Lichtbeugung, welche proportional zur Zellgröße ist; Lichtbrechung und Reflektion (proportional zur Zellgranularität) und Fluoreszenzlicht, das von der Probenvorbereitung abhängt.

Mit Hilfe dieser Parameter kann z.B. eine lysierte Vollblutprobe aufgetrennt werden in Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten, da jede Population charakteristische Unterschiede in Größe und Dichte aufweist.

Je nach Anzahl der gebundenen Fluorochrommoleküle z.B. FITC wächst auch die Intensität des gemessenen Signals, da Fluorochrom die Energie des Laserlichtes absorbiert.

Bezogen auf diesen Versuch steht somit die emittierte Fluoreszenz-Intensität von FITC – konjugierten Antikörpern im Vordergrund, die an ethidiumbromid-gefärbte Erythrozyten binden. Da reife Erythrozyten keinen Nucleus mehr besitzen und Ethidiumbromid an DNA – haltiges Material bindet, folgt daraus, dass Ethidiumbromid nur parasitierte Erythrozyten anfärbt. Jeder doppelt gefärbte Erythrozyt, der das optische System passierte, wurde als Event definiert. Für jede einzelne Probe wurden 5000 Events gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde aus dem geometrischen Mittel unter der Kurve ermittelt, die sich für jede doppelt gefärbte Erythrozytenpopulation ergab.

Abb. Nr. 6 Immunofluoreszenz Doppelfärbung



2.12 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden in das Sigma Plot 2000 Programm aufgenommen und ausgewertet. Für die Analyse der Bindungswerte von parasitierten Erythrozyten an CSA wurde der gepaarte t –Test verwendet. Für den Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) zwischen Multi – und Primigraviden, die nicht einer Normalverteilung entsprechen, kam der Wilcoxon / Kruskal –Wallis Test (Rangsummentest) zur Anwendung. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

Die Korrelation der MFI innerhalb der verschiedenen geografischen Parasitenisolate wurde mit Hilfe des Spearman Rangtests ermittelt.

Um Proportionen innerhalb bzw. zwischen Gruppen vergleichen zu können (hier: Anteil der infizierten Schwangeren innerhalb von Primi - und Multigraviden) wurden Kontingenztafeln mittels Fisher´s exaktem Test aufgestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

An der Studie nahmen insgesamt 164 schwangere Frauen teil, die nicht durch Kaiserschnitt entbunden hatten. Davon waren 29 Frauen (17%) zum Zeitpunkt der Entbindung mikroskopisch nachweislich mit *Plasmodium falciparum* infiziert.

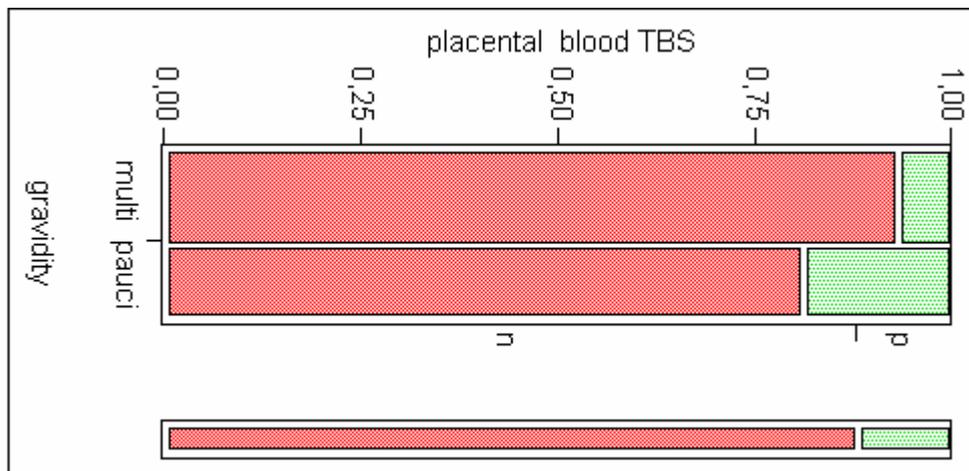
Tabelle Nr.1 zeigt eine Einteilung der rekrutierten Frauen in Erst-, Zweit- und Mehrfachgebärende und gibt eine Übersicht über die Anzahl und Art der Infektionen pro Gruppe. Hinsichtlich der Infektionen wurde unterschieden in Doppelinfektionen (plazental und peripher), welche unter allen Gruppen dominierte, sowie Einfachinfektionen (entweder plazental oder peripher).

Tabelle Nr. 1

	Primigravidae (n= 48)	Secundigravidae (n= 22)	Multigravidae (n=96)
nicht infiziert	33	17	85
infiziert	13	5	11
Art d. Infektion			
plazental u. peripher	10	4	8
plazental	3	1	2
peripher	0	0	1

In Abbildung Nr.7 wird der Anteil der infizierten Frauen zum Zeitpunkt der Entbindung innerhalb von Multigraviden und Paucigraviden (Erst- u. Zweitgebärenden) verglichen.

Abb.7



Der Vergleich zwischen beiden Gruppen zeigt ein statistisch signifikantes Ergebnis ($p = 0,04$) bezüglich einer erhöhten Infektionshäufigkeit bei Paucigraviden. Zur Berechnung des signifikanten Unterschiedes wurde Fisher's exakter Test verwendet.

3.2 Auswertung der Erkennung von Plazentaisolaten durch spezifische Antikörper schwangerer Frauen im Durchflusszytometer (FACS)

Mit Hilfe der FACS- Analyse wurde untersucht, ob die Erkennung der PfEMP1-variablen Oberflächenantigenen eine Abhängigkeit vom Graviditätsstatus aufweist. Analysiert wurden 164 Serumproben schwangerer Frauen und zusätzlich je 10 Proben von malaria-exponierten Männern und Nulligraviden aus endemischen Gebiet. Die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) korrelierte mit der antikörpervermittelten Reaktivität auf einzelne Plazentaisolate und stellte somit auch ein Maß für die Erkennung von Parasitenisolate dar. Bei den Plazentaisolaten handelte es sich um VIP 43, VIP 42, Gb 218 sowie Gb 337, die auch schon für die Bindungsstudien zum Einsatz kamen.

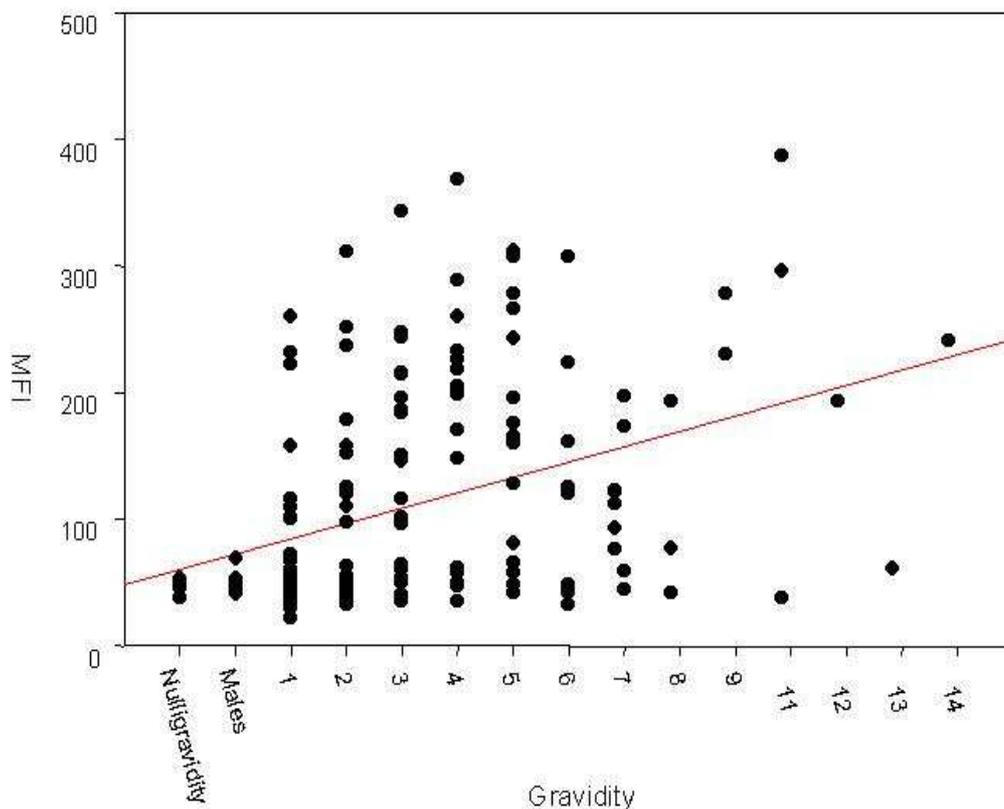
3.2.1 Analyse der MFI in Abhängigkeit vom Graviditätsstatus

Abbildung Nr. 8 zeigt die Proben aufgeschlüsselt nach Gravidität (1-14) gegen die jeweils gemessene MFI für VIP 43. Die Serumproben der Nulligraviden und der malaria-exponierten Männer dienten als Negativkontrolle. Das Schaubild von VIP 43 soll repräsentativ für die Ergebnisse aller Plazentaisolate stehen.

Der Abbildung lässt sich entnehmen, dass die Erkennung des Plazentaisolates VIP 43 in Korrelation mit steigendem Graviditätsstatus steht.

Lediglich die obersten drei MFI-Werte in der Gruppe der Erstgebärenden weisen einen relativ hohen MFI-Wert im Vergleich zu denen der Multigraviden auf.

Abb. Nr. 8 MFI in Abhängigkeit vom Graviditätsstatus



3.2.2 Vergleich der Erkennung von Plazentaisolaten zwischen Paucigraviden und Multigraviden

In Abbildungen Nr. 9 a-d werden die MFI-Werte von Mehrfachgebärenden mit denen der Erst- und Zweitgebärenden für die einzelnen Isolate verglichen.

Abb. Nr. 9 a)

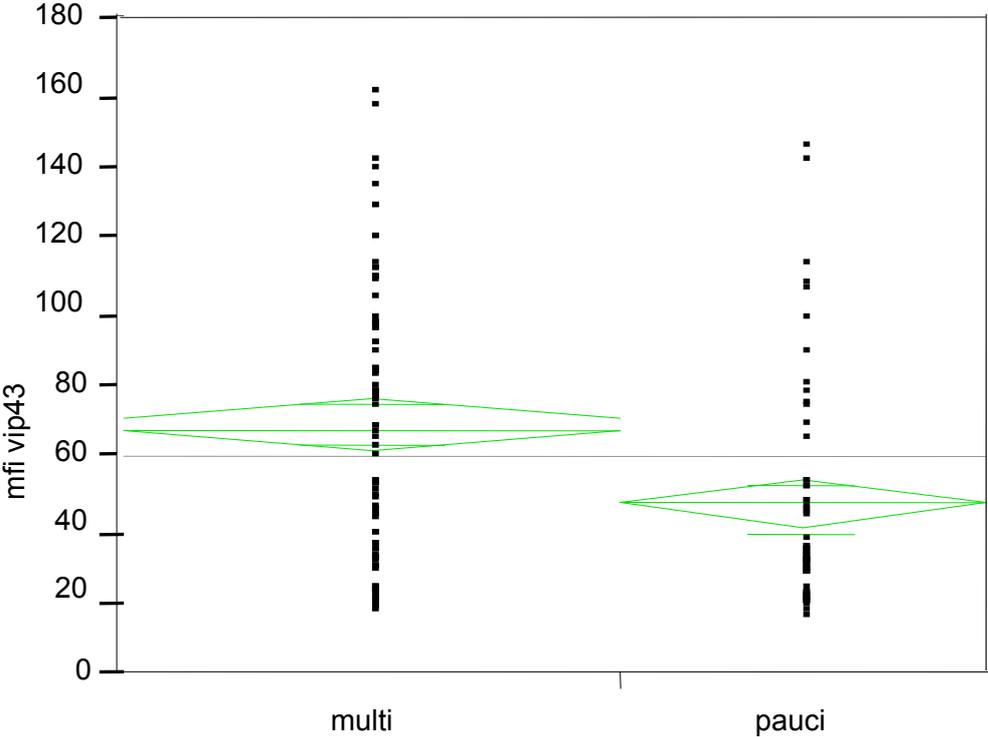


Abb. Nr. 9b)

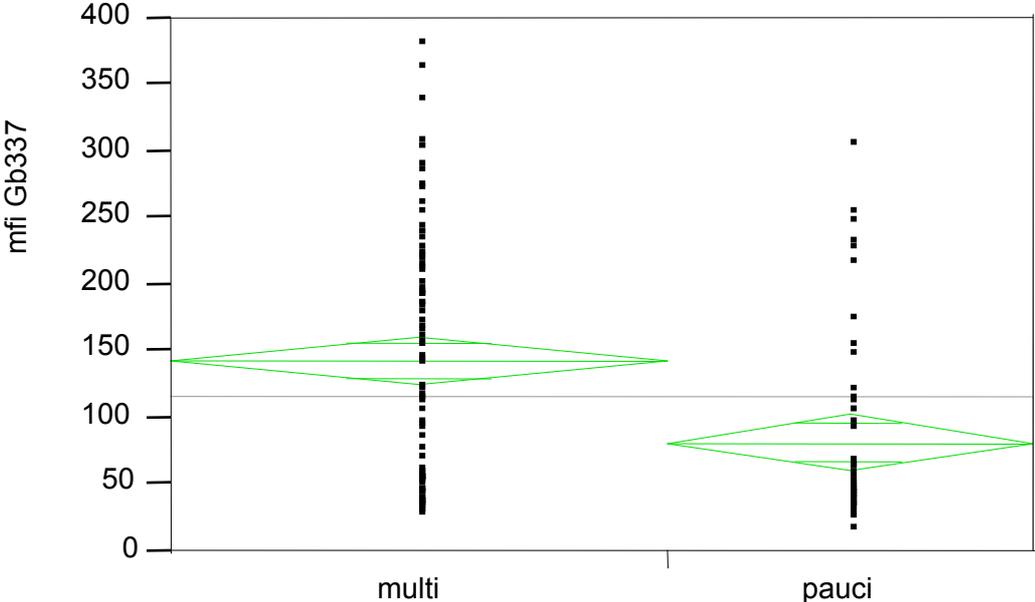


Abb. Nr. 9c)

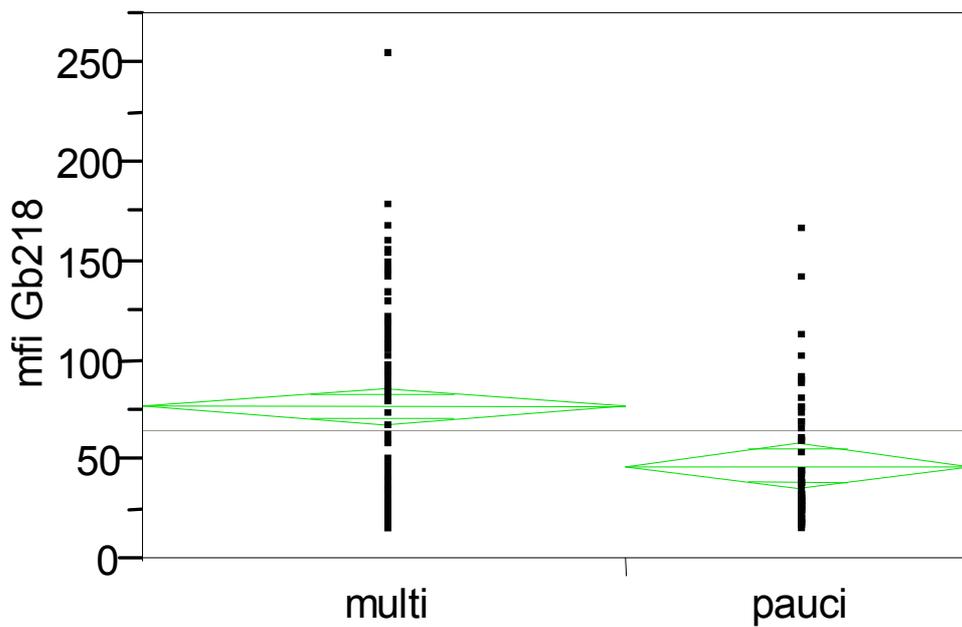
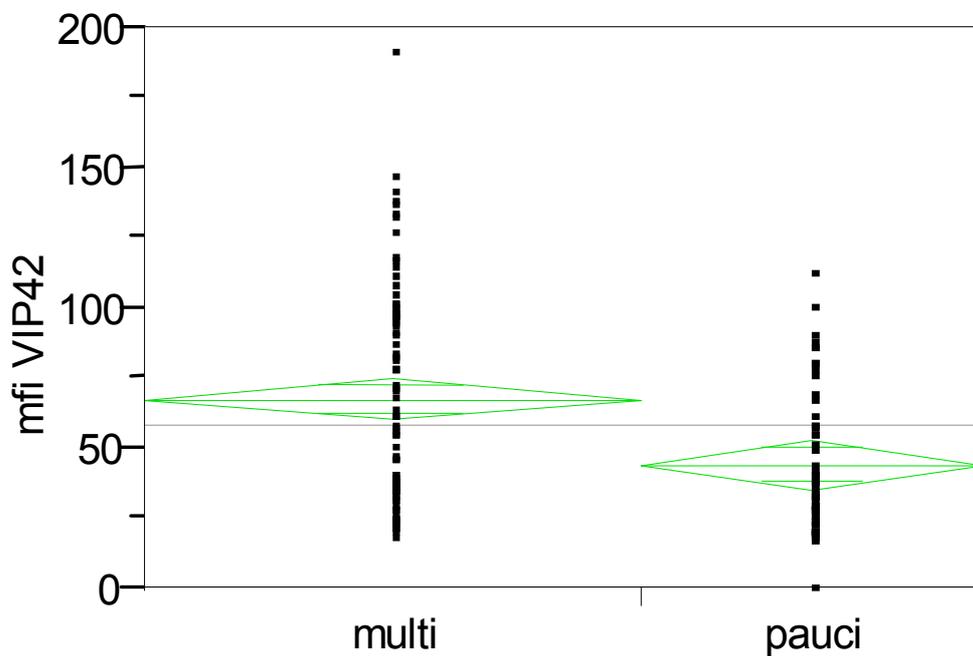


Abb. Nr. 9d)



Sowohl für die senegalesischen als auch für die gabunesischen Plazentaisolate ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede bezüglich einer geringeren Erkennung in der Gruppe der Paucigraviden. Berechnet wurde der signifikante Unterschied mit Hilfe des Wilcoxon / Kruskal- Wallis Rangsummentest.

(Gb 337 $p < 0.0001$, Gb 218 $p < 0,0008$, VIP 43 $p < 0,0004$, VIP 42 $p < 0,0001$)

3.2.3. Vergleich der Erkennung von Plazentaisolaten innerhalb von Multigraviden bzw. Paucigraviden

Um die Frage zu klären, ob bei der Erkennung von Plazentaisolaten eine Infektion zum Zeitpunkt der Entbindung eine Rolle spielt, wurden innerhalb von Multi- bzw. Paucigraviden zwei Gruppen gebildet. Dabei wurde jeweils für jedes Plazentaisolat die Reaktivität der Antikörper verglichen zwischen Frauen, die keine Infektion bei Entbindung aufwiesen und Frauen, die mikroskopisch nachweislich mit *Plasmodium falciparum* infiziert waren.

Abb Nr. 10 a-d Vergleich der MFI-Werte innerhalb der Gruppe der Multigraviden
Abb. Nr. 10a)

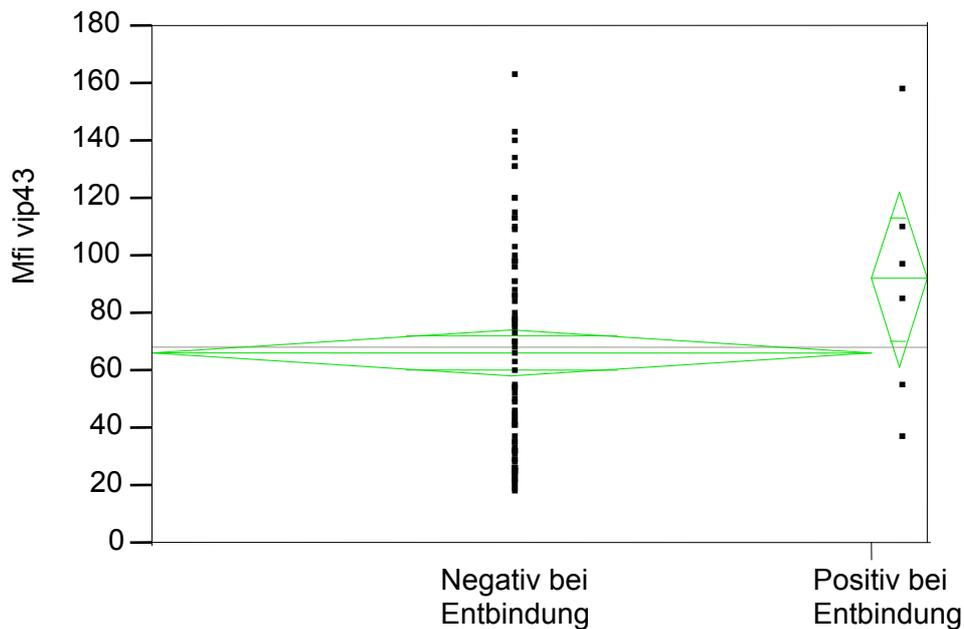


Abb. Nr. 10b)

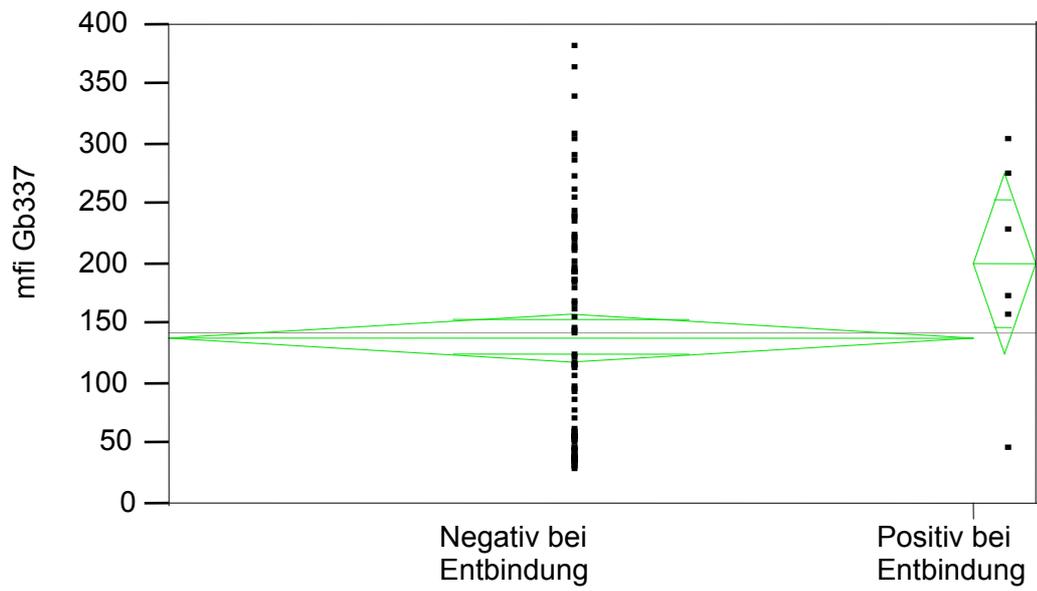


Abb.Nr. 10c)

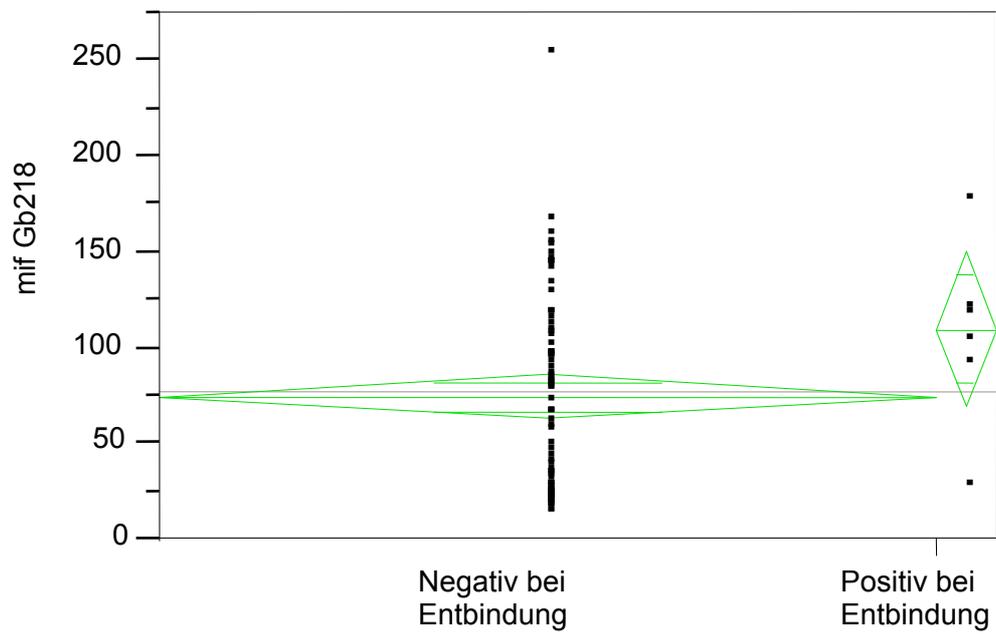
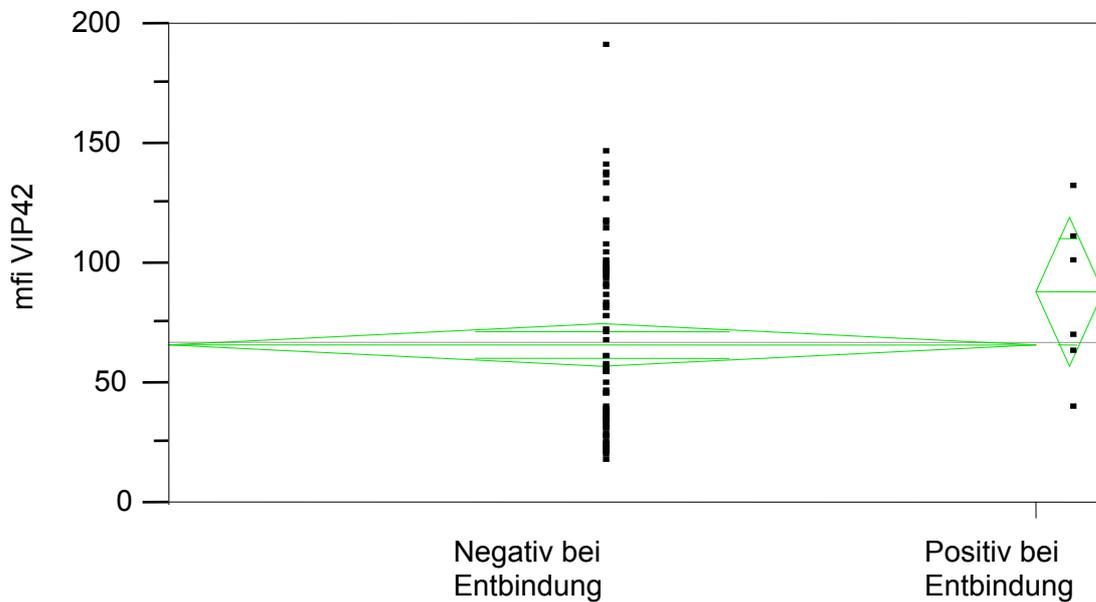


Abb. Nr.10d)



Betrachtet man die Gruppen der Multigraviden, so besteht bei keinem der Plazentaisolate ein statistisch signifikanter Unterschied in der Erkennung zwischen beiden Gruppen (positiv bzw. negativ bei Entbindung).

Auch hier wurde der Wilcoxon / Kruskal – Wallis Test angewendet:

VIP 43 (p= 0,12), Gb 337 (p= 0,12), Gb 218 (p= 0,07); VIP 42 (p=0,08)

Abbildungen Nr. 11 a-d Vergleich der MFI-Werte innerhalb der Paucigraviden
Test: Wilcoxon/Kruskal- Wallis Rangsummentest

Abb. Nr. 11a)

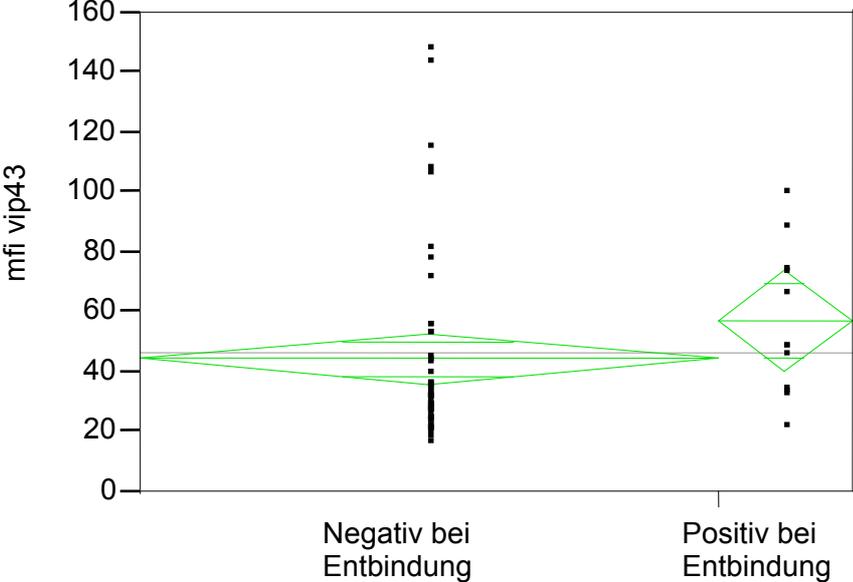


Abb. Nr. 11b)

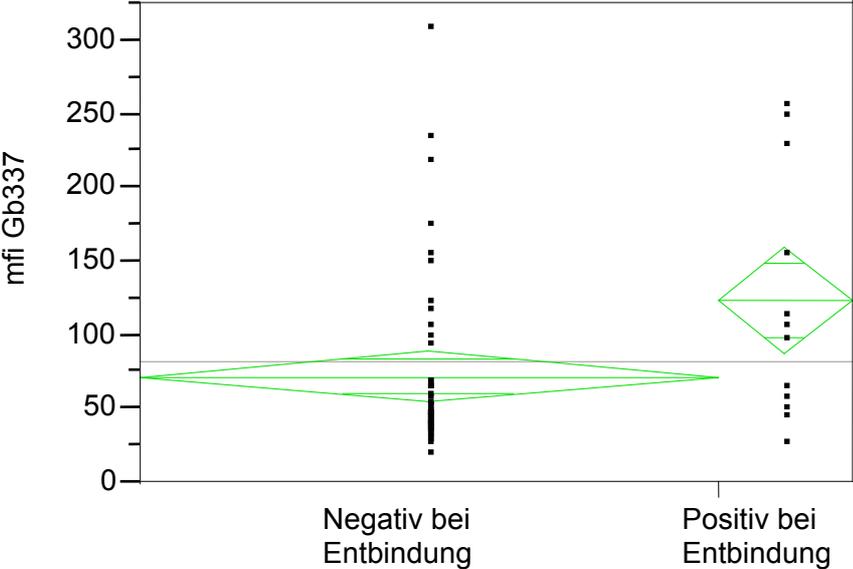


Abb. Nr. 11c)

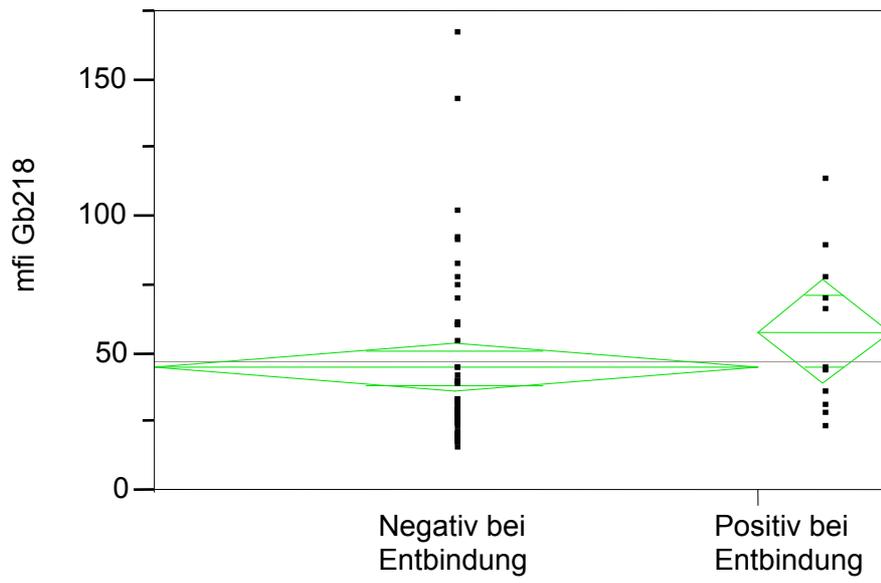
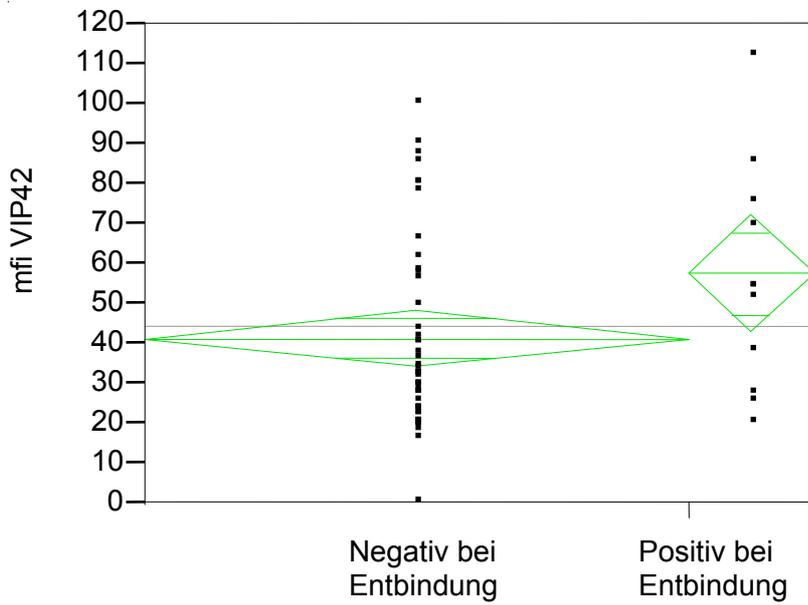


Abb. Nr. 11d)



Anders sieht es jedoch in der Gruppe der Erst- und Zweitgebärenden aus. So konnten für zwei Isolate (VIP 43 und Gb 337) ein statistisch signifikantes Ergebnis in Bezug auf eine höhere Erkennung nachgewiesen werden, wenn die Infektion zum Zeitpunkt der Entbindung mikroskopisch nachgewiesen werden konnte (VIP 43 $p=0,02$; Gb 337 $p=0,01$).

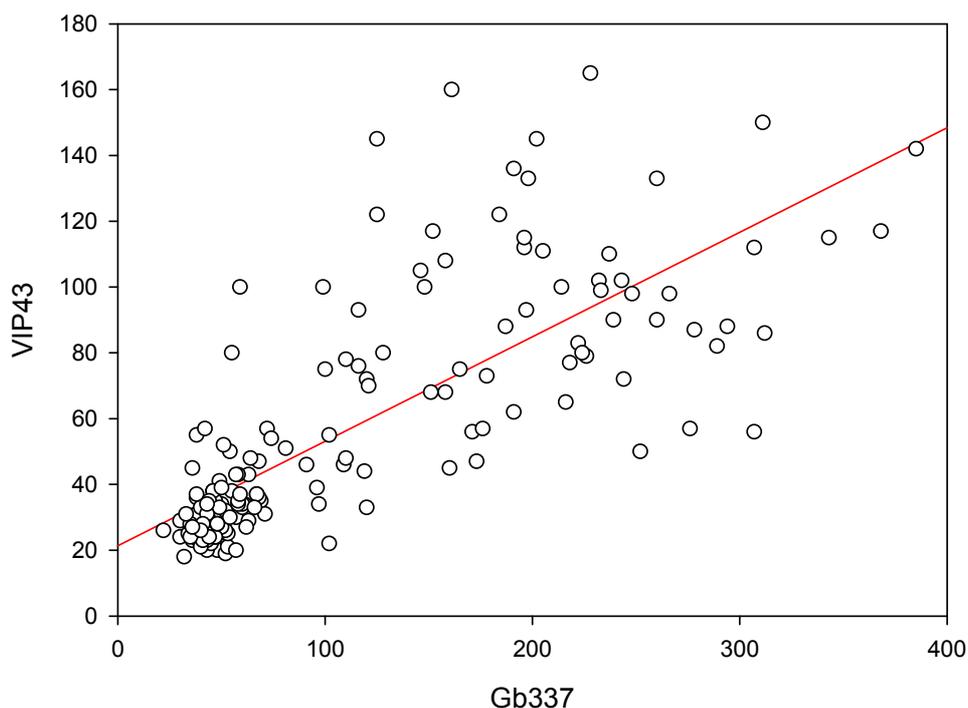
Bei dem gabunesischen Isolat Gb 218 lag der Unterschied in der Erkennung zwischen beiden Gruppen an der Grenze der statistischen Signifikanz ($p=0,05$).

Nur das senegalesische Isolat VIP 42 zeigte als einziges eindeutig keinen signifikanten Unterschied zwischen Frauen, die negativ bzw. positiv bei Entbindung waren ($p=0,07$).

3.3 Korrelation von MFI-Werten zwischen Plazentaisolaten

In Abbildung Nr. 12 sind die einzelnen MFI-Werte der Serumproben vom senegalesischem Isolat VIP 43 gegen die MFI-Werte des gabunesischen Isolats Gb 337 graphisch aufgetragen.

Abb. Nr. 12



Bei Betrachtung einzelner Werte ergibt sich z.B. für einen Punkt aus der Agglomeration im linken unteren Abschnitt des Bildes, dass Antikörper von Proben, die bei der Erkennung von Gb 337 einen niedrigen MFI -Wert aufweisen, ebenso das senegalesische Isolat VIP 43 auf minimalem Niveau erkennen. Umgekehrt zeigen Serumproben mit hoher Reaktivität der Antikörper auf Gb 337 auch einen hohen Erkennungswert für VIP 43.

Die Messung der Korrelation erfolgte mittels nichtparametrischen Spearman´s Rho-Test. Für das Beispiel VIP43 / Gb 337 ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,82.

Abb.Nr. 13 Gegenüberstellung von MFI-Werten einzelner Serumproben für alle Plazentaisolate

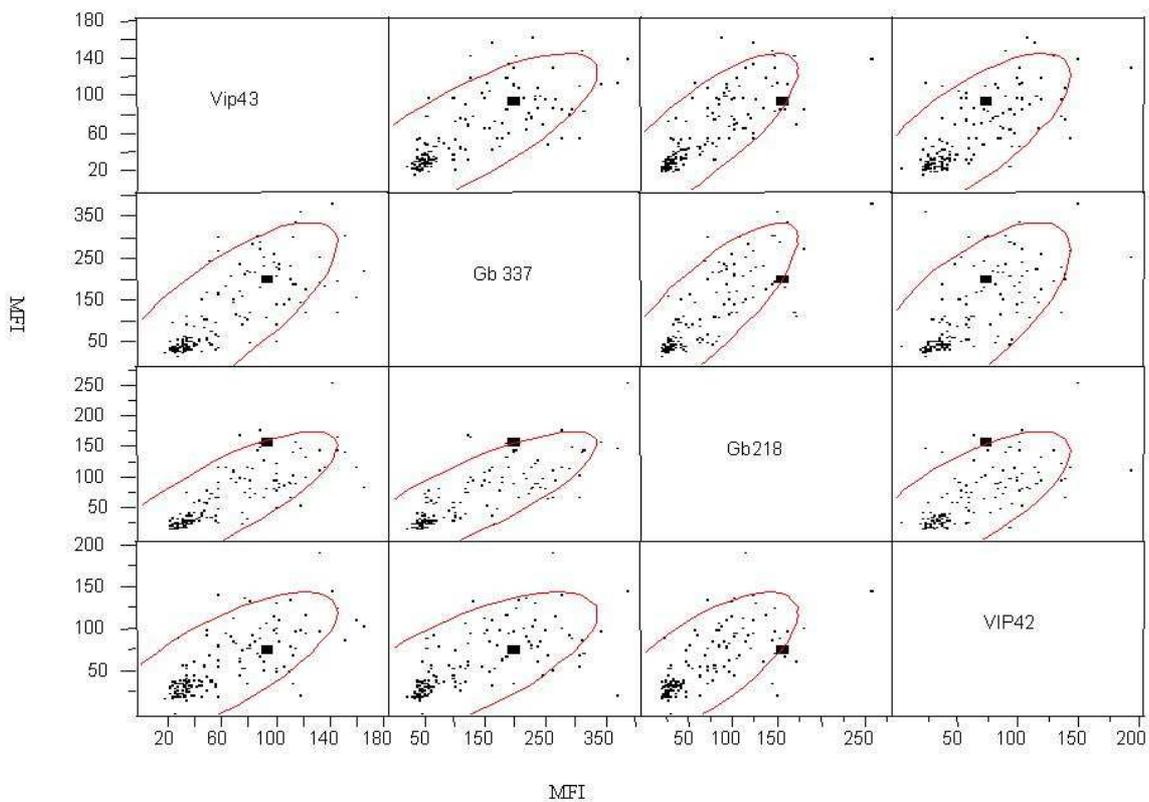


Tabelle Nr. 2 Messung der Korrelation zwischen der Erkennung von Plazentaisolaten mit Hilfe des Spearman Rho -Test

Isolat A	Isolat B	Spearman Rho
Gb 337	VIP 43	0,82
Gb 218	VIP 43	0,86
Gb 218	Gb 337	0,84
VIP 42	VIP 43	0,75
VIP 42	Gb 337	0,79
VIP 42	Gb 218	0,76

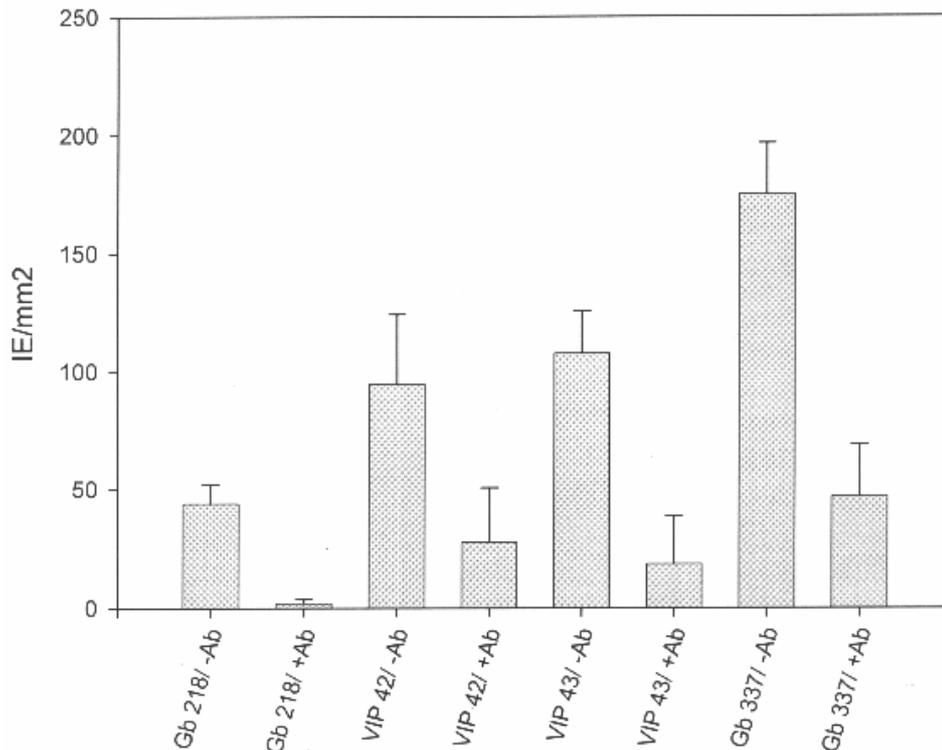
3.4 Auswertung der Bindungsstudien

Bei der Auswertung der Bindungsstudien konzentrierten wir uns auf den Rezeptor CSA (Chondroitinsulfat A), da bei diesem als einzigem eine gesicherte Rolle im Pathogenitätsmechanismus plazentaler Malaria nachgewiesen werden konnte. Die folgenden Abbildungen beziehen sich deshalb auf die Bindung infizierter plazentaler Erythrozyten an CSA. Verwendet wurden die in 2.6 beschriebenen Parasitenisolate Gb 218 und Gb 337 aus Gabun sowie VIP 42 und VIP 43 aus dem Senegal. Die Abbildungen Nr. 14, 16 und 17 zeigen die Anzahl der Erythrozyten / 1mm^2 , d.h. ausgezählte parasitierte Erythrozyten pro mm^2 abzüglich der Negativkontrolle. Eine signifikante Bindung wurde angenommen, wenn die Zahl der gebundenen Erythrozyten pro mm^2 - > 5 war.

3.4.1 Analyse der Bindungsstudie nach Inhibition mit anti- DBL3 γ -Antikörpern

Abb Nr. 14 zeigt die Bindung der infizierten Erythrozyten an CSA jeweils mit (+Ab) und ohne (-Ab) Zugabe von anti - DBL3 γ – Antikörpern. Es handelt sich um die Rohwerte der gebundenen infizierten Erythrozyten.

Abb. Nr. 14 Inhibition der Bindung an CSA mit anti -DBL3 γ -Antikörpern (absolut)



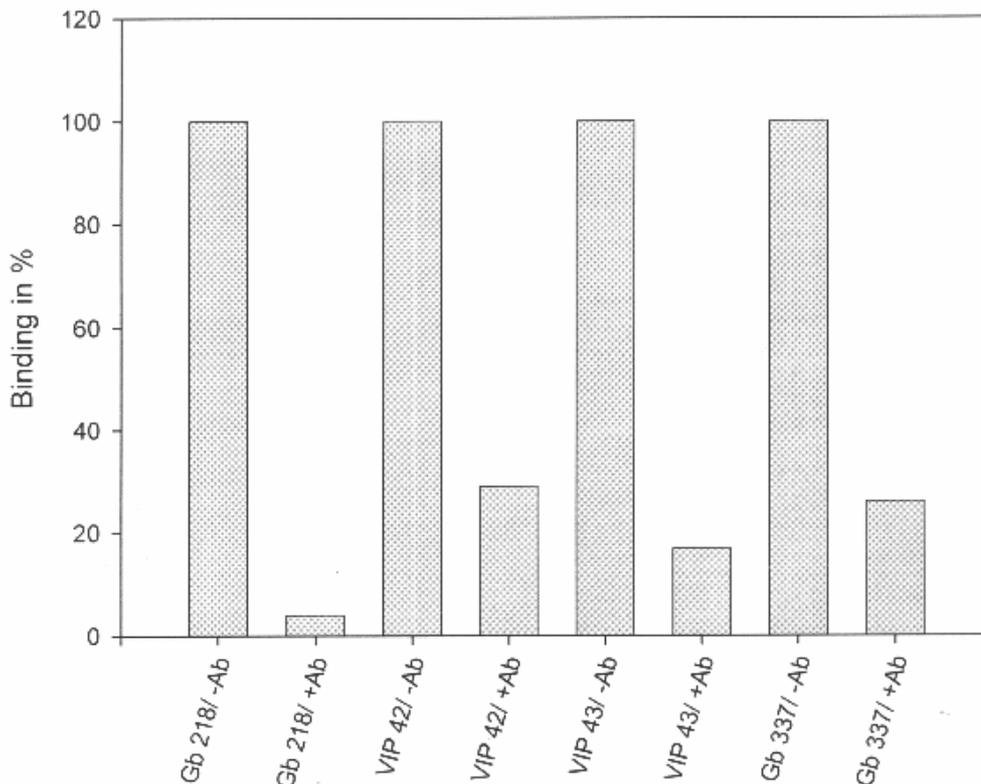
Bei allen vier Isolaten lässt sich eine signifikante Inhibition nach Zugabe von Antikörpern gegen DBL3 γ nachweisen (p-Werte nach gepaartem t-Test bei allen Isolaten < 0,05). Sie unterscheiden sich lediglich in ihrer Bindungskapazität an CSA, die trotz einer Parasitämie von je 3-4 % eine Spannbreite von 50 bis 200 infizierten Erythrozyten/ mm² (Kontrollbereich) annimmt.

Abb. Nr. 15 stellt die gleichen Bindungsergebnisse nach Inhibition in % dar. Es soll das Ausmaß der Bindung nach Zugabe von Antikörpern innerhalb der geografisch verschiedenen Isolate gegenüberstellen.

Demnach ergibt sich für das gabunesische Isolat Gb218 eine Bindung von 4% der infizierten Erythrozyten, bei Gb 337 binden 26 %. Die senegalesischen Isolate VIP 42 und VIP 43 binden nur noch zu 29 % bzw. zu 17 % nach Zugabe von anti-DBL3 γ - Antikörpern.

Diese Bindungsstudien zeigen deutlich, dass polyklonale Antikörper gegen die PfEMP1-Domäne DBL3 γ , welche ursprünglich aus einem kamerunischen Plazentaisolat gewonnen wurde, in der Lage sind, die Bindung an CSA von infizierten Erythrozyten auch aus geographisch verschiedenen Plazentaisolaten (Gabun und Senegal) zu inhibieren.

Abb. Nr. 15 Bindung an CSA nach Inhibition mit anti- DBL3 γ -Antikörpern (in %)



3.4.2 Analyse der Bindungsstudie nach Erweiterung des Antikörperrepertoires

Die Inhibition der Bindung wurde mit Antikörpern gegen DBL1 α , rif 40 und Serumproben von Schwangeren unterschiedlichen Graviditätsstatus erweitert, um herauszufinden, welche der Antikörper ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Bindung an CSA aufweisen. Bei den Serumproben handelt es sich um die in 2.10 beschriebenen Sera. Es soll jedoch noch hinzugefügt werden, nach welchen Kriterien die Proben von Multi- bzw. Primigraviden ausgewählt wurden. Demnach handelt es sich bei der Serumprobe der Mehrfachgebärenden um Antikörper, die in der Analyse der Antikörperantwort auf DBL3 γ eine hohe MFI aufwies, während die Serumprobe der Erstgebärenden kaum Erkennung von DBL3 γ

zeigte. Das lösliche CSA wurde als positive Inhibitionskontrolle verwendet, während Präimmun- und malariaexponiertes männliches Serum als Negativkontrolle dienten.

Durchgeführt wurde der erweiterte Versuch mit VIP 43 und Gb 337. Es waren zugleich auch diejenigen Isolate, die in den vorausgegangenen Experimenten die stärkste Bindung an CSA aufwiesen.

Abb. Nr. 16 Inhibition der Bindung von VIP 43 an CSA

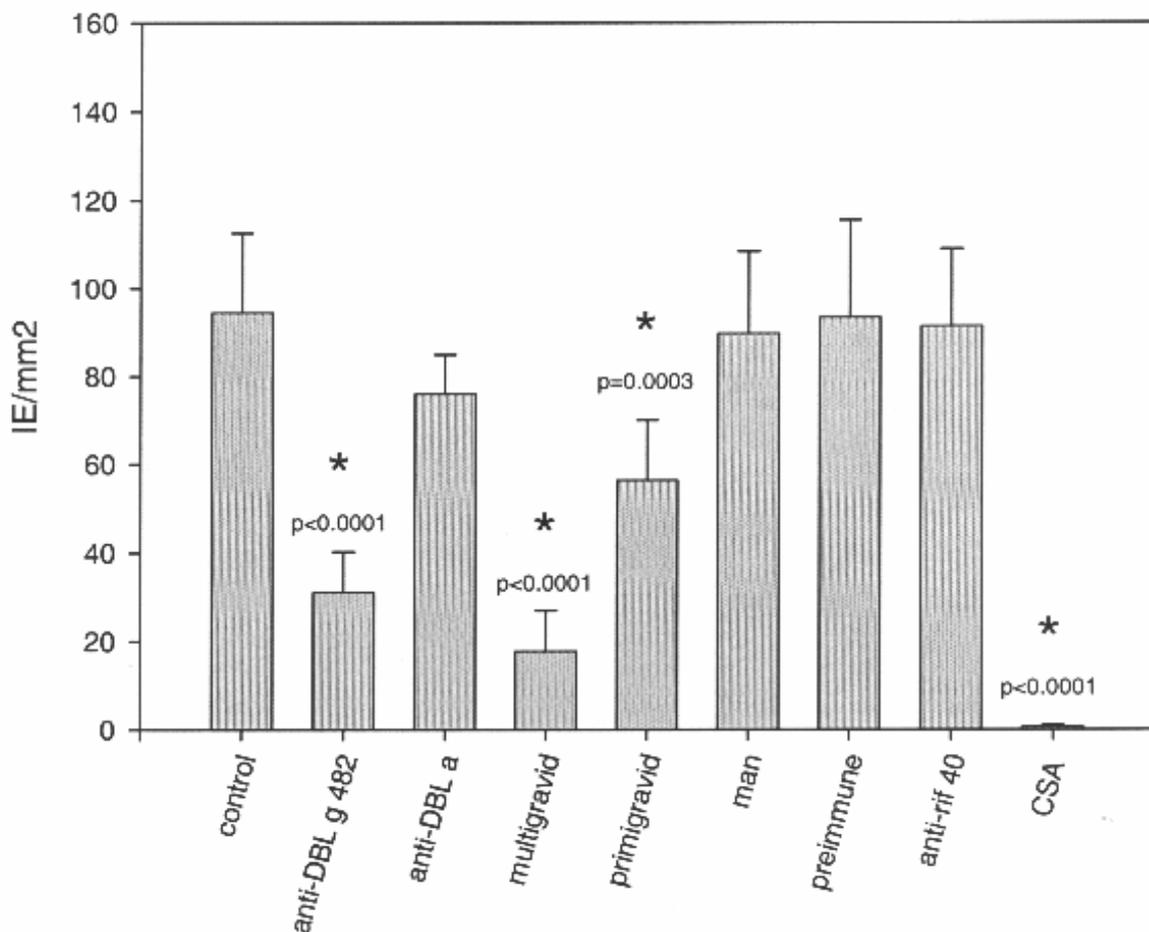
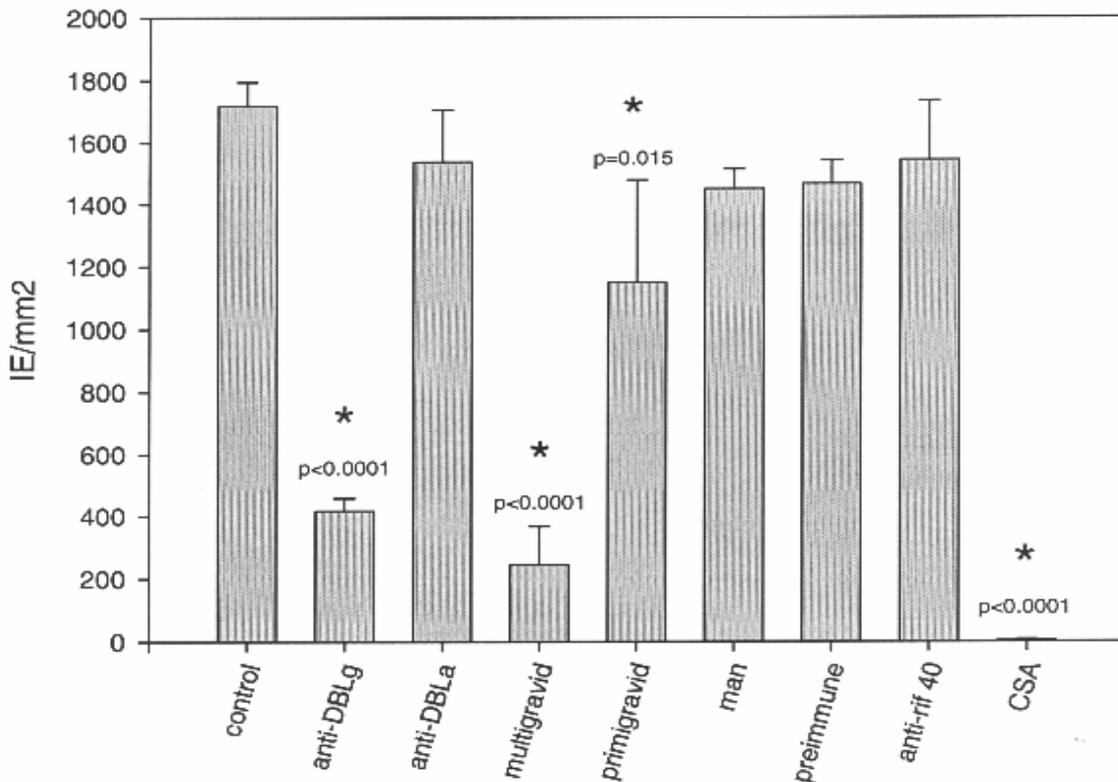


Abb.Nr. 17 Inhibition der Bindung von Gb337 an CSA



Nach Betrachtung der Ergebnisse für VIP 43 und Gb 337 in Abb. 10 und 11 ergibt sich ein ähnliches Bindungsverhalten nach Inhibition mit identischem Antikörperrepertoire. Die stärkste Hemmung, abgesehen von der Positivkontrolle mit löslichem CSA, geht dabei von anti-DBL γ – Antikörpern und vom Serum der Mehrfachgebärenden aus (p-Werte jeweils < 0,0001).

Für anti-DBL α – und anti-rif – Antikörper sowie für das Serum eines malaria-exponierten Mannes aus einem endemischen Gebiet konnte keine statistisch signifikante Blockierung der Bindung an CSA festgestellt werden.

Lediglich die Zugabe von Primigravidenserum zeigt eine Inhibition im statistisch signifikanten Bereich (p-Werte: 0,0003 bei VIP43, 0,015 bei Gb 337).

Mit dem Präimmunserum konnte ausgeschlossen bzw. gezeigt werden, dass die Inhibition der Bindung an CSA von Antikörpern nicht allein durch sterische Hinderung, sondern überwiegend aufgrund der Spezifität für die DBL γ – Domäne erfolgt ist.

4. Diskussion

In den bisherigen Studien, die sich mit der Erkennung von varianten Oberflächenproteinen beschäftigt haben, aber auch in einer Inhibitionsstudie mit anti-DBL3 γ -Antikörpern (Reeder 1999) wurden hauptsächlich Laborisolate verwendet. Der Grund dafür ist die meist einfachere Kultivierung und schnelle Zunahme der Parasitämie bei Laborstämmen. Optimal wäre jedoch die Verwendung von Wildisolaten, die direkt vor Ort gewonnen werden und somit noch das ursprüngliche Adhärenzprofil besitzen.

Denn es ist bekannt, dass sich das Adhärenzprofil von infizierten Erythrozyten aufgrund von Gen-Switching mit einer Wahrscheinlichkeit von 2% pro Zyklus verändert.

Die Anwendung von infizierten Erythrozyten aus der Plazenta ist aber mit technischen und logistischen Schwierigkeiten verbunden. Zum einen besteht die Möglichkeit der Kontamination mit Bakterien oder Hefen beim Entbindungsvorgang.

Andererseits können durch den Vorgang der Kryokonservation zusätzlich infizierte Erythrozyten zerstört werden. In den beschriebenen Versuchen wurden aufgrund einer jeweils zu niedrigen Parasitämie (< 0,05%) keine der Parasitenisolate verwendet, die im Laufe des Aufenthaltes gesammelt wurden.

Die Ergebnisse beziehen sich deshalb ausnahmslos auf die in 2.6. beschriebenen gabunesischen und senegalesischen Wildisolate.

Um eine mögliche Veränderung des Adhärenzprofils auszuschließen, wurden alle Isolate nach Kryokonservation und Kultivierung vor den Bindungsversuchen und den zytometrischen Analysen auf den CSA-Bindungsphänotyp hin selektioniert.

4.1. Antikörpervermittelte Erkennung von Plazentaisolaten bei Schwangeren

Folgende Fragen interessierten uns bei der Auswertung der FACS-Analyse:

- 1) Gibt es einen Unterschied in der Erkennung von Plazentaisolaten zwischen Primi- und Multigraviden?
- 2) Hängt die Erkennung der Isolate ab von einer Infektion zum Zeitpunkt der Entbindung?

3) Besteht eine Korrelation in der Erkennung von geografisch unterschiedlichen Plazentaisolaten?

1. Gibt es einen Unterschied in der Erkennung von Plazentaisolaten zwischen Primi- und Multigraviden ?

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die Erkennung von Wildisolaten abhängt von einer zunehmenden Parität. Unter Anwendung von Laborisolaten gelangen Ricke et al. (2000) zu einem identischen Ergebnis.

Somit decken sich die Ergebnisse mit den Beobachtungen von Brabin (1983), die davon ausgehen, dass eine protektive Immunität bei Schwangeren erst durch mehrere Schwangerschaften erworben werden kann.

Ferner lässt sich auch erklären, warum die Erkennung von Plazentaisolaten in der Gruppe der Multigraviden höher ist und dass der Anteil infizierter Frauen in der Gruppe der Mehrfachgebärenden geringer ist, als bei den Erst- und Zweitgebärenden.

Ricke et al. (2000) konnte in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen einer hohen Erkennung und der Inhibition der Bindung von Plazentaisolaten an CSA herstellen:

Da die antikörpervermittelte Erkennung von Parasiten von einem hohen Antikörper-Level abhängig ist, entspricht ein hoher MFI-Wert auch dem Maß, die Bindung an CSA und folglich die Sequestration in der Plazenta zu verhindern.

Es wird daher ersichtlich, dass die erworbene protektive Immunität gegen *Plasmodium falciparum* sowohl auf der Quantität der Antikörper als auch auf der Fähigkeit beruht, spezifische Membranproteine zu erkennen.

Die Beobachtung, dass Männer und nichtschwangere Frauen aus endemischen Gebieten trotz klinischer Immunität Plazentaisolate nicht erkennen, spricht für die Richtigkeit der These, dass es sich bei plazentalen Isolaten um eine Subpopulation handeln muss, die sich durch andere antigene Eigenschaften auszeichnen.

2. Hängt die Erkennung des Isolates ab von einer Infektion zum Zeitpunkt der Entbindung?

Um diese Frage beantworten zu können, wurden die Multigraviden und Paucigraviden in jeweils zwei Gruppen unterteilt: positiv bzw. negativ bei Entbindung.

In der Gruppe der Mehrfachgebärenden gab es keinen signifikanten Unterschied in der Erkennung. Es kann also davon ausgegangen werden, dass durch die wiederholte Exposition mit verschiedenen Parasitenantigenen in zurückliegenden Schwangerschaften ein breites Spektrum von Antikörpern bei Entbindung vorhanden war.

In der Gruppe der Erst- und Zweitgebärenden konnten für die Plazentaisolate VIP 43 (Senegal) und Gb 337 (Gabun) signifikante Unterschiede erhoben werden, wenn eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* bei Entbindung vorlag.

Eine mögliche Ursache für den fehlenden Unterschied zwischen beiden Gruppen in der Erkennung von Gb 218 (Gabun) und VIP 42 (Senegal) mag wohl in der niedrigeren Bindungskapazität der Plazentaisolate an CSA begründet sein, die sich auch schon in den Inhibitionsstudien herausstellte, wobei sich auch hier der gleiche Trend zeigte. Bei genauerer Betrachtung von Abbildung Nr.8 lässt sich entnehmen, dass in der Gruppe der Primigraviden die obersten drei Punkte einen relativ hohen MFI-Wert aufzeigen und teilweise sogar die Werte von Multigraviden übertreffen. Die Analyse der obersten zwei Punkte ergibt eine Infektion der Erstgebärenden zum Entbindungszeitpunkt. Untersucht man jedoch den dritten Punkt auf eine Infektion, so ergibt sich kein Nachweis von *Plasmodium falciparum*. Das scheinbare Paradox zwischen dem Vorhandensein von Antikörpern und einer nicht nachweisbaren Infektion lässt sich wohl damit erklären, dass eine Infektion wahrscheinlich zu einem frühen Zeitpunkt in der Schwangerschaft stattgefunden haben muss, und eine mögliche Behandlung mit Chemotherapeutika die Parasiten aus dem Blutkreislauf eliminiert, so dass zur Entbindung keine infizierten Erythrozyten mehr mikroskopisch nachweisbar sind. Beide Ergebnisse zeigen also, dass entgegen der Annahme eines Antikörperlecks bei Erstgebärenden (Fried 1998) durchaus Antikörper in hohen Mengen vorhanden sein können, die in der Lage sind, bereits in der ersten Schwangerschaft Plazentaisolate zu erkennen.

Wie lässt sich aber die beschriebene erhöhte Anfälligkeit bei Erstgebärenden gegenüber *Plasmodium falciparum* mit diesen Beobachtungen vereinbaren?

Die Präsenz von Antikörpern bei Erstgebärenden blieb bisher kontrovers. Mehrere Studien konnten aber die Produktion von Antikörpern bei Erstgebärenden nachweisen (Gysin et al. 1999, Maubert et al. 1999, Ricke et al. 2000). O'Neil-Dunne et al. (2001) demonstrierte sogar, dass die Mehrheit der schwangeren Frauen unabhängig vom Graviditätsstatus einen Antikörpermangel im 1. Trimenon aufweisen. Die Produktion von Antikörpern erfolgt erst während des 2. Trimesters infolge einer Antwort auf die Präsenz von CSA-bindenden Parasiten in der Plazenta.

Interessanterweise zeigte sich ein Unterschied in der Kinetik der Antikörperproduktion zwischen Primi- und Multigraviden:

Bereits nach der 12. Schwangerschaftswoche lassen sich bei Mehrfachgebärenden Antiadhäsions-Antikörper nachweisen, während die Produktion von Antikörpern bei Erstgebärenden nicht vor der 20. Schwangerschaftswoche erfolgt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Antikörper bis zur nächsten Schwangerschaft stark erniedrigt und praktisch aus der Zirkulation entfernt waren, was eine Erklärung für das Antikörperleck bei Multigraviden bis zur 12. Schwangerschaftswoche liefert.

Eine plazentale Infektion, die meist zu Beginn des 2. Trimenons stattfindet, also nach vollständiger Ausbildung der Syncytiotrophoblasten, führt zur Sequestration und einer damit verbundenen Triggerung der Antikörperantwort.

Aufgrund präexistierender Gedächtniszellen aus vorherigen Schwangerschaften sind Mehrfachgebärende in der Lage, schneller effektive Antikörper zu produzieren. Die rapide Produktion von hohen Antikörpermengen zu Beginn des 2. Trimenons verhindert die schwere Akkumulation von infizierten Erythrozyten in der Plazenta und limitiert somit das Risiko einer schweren Malaria.

Im Gegensatz dazu benötigen Primigravide für die Produktion von Antikörpern ca. 8 Wochen länger, so dass ausreichende Mengen von Antikörpern, die die Sequestration in der Plazenta verhindern, erst nach der 20. Schwangerschaftswoche erscheinen.

Das Fehlen von Antikörpern während dieser schnellen Entwicklungsphase der Plazenta zu Beginn des 2. Trimesters führt zu einer schweren Akkumulation von

infizierten Erythrozyten mit gravierenden Auswirkungen auf die Gesundheit von Mutter und Fetus. Die erhöhte Anfälligkeit bei Erstgebärenden wird somit erklärbar durch eine zeitlich verschobene Produktion von Antikörpern mangels vorhandener Gedächtniszellen und nicht aufgrund eines völligen Fehlens.

3. Besteht eine Korrelation in der Erkennung von geografisch unterschiedlichen Plazentaisolaten?

Die Gegenüberstellung der einzelnen MFI-Werte von den gabunesischen und senegalesischen Isolaten zeigt eine hohe Korrelation in der antikörpervermittelten Erkennung. Eine strukturelle Konservierung der PfEMP1-Domäne DBL3 γ ist wahrscheinlich, um ihre Funktion als Adhäsionsligand aufrecht erhalten zu können.

Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche sowie der FACS-Analyse erhärten die Hinweise auf eine strukturelle Konservierung (Khattab 2003) und demonstrieren, dass sowohl die Blockierung als auch die Erkennung von CSA-bindenden Parasiten unabhängig sind von der Herkunft der Plazentaisolate.

Mit der Erkennung von geografisch unterschiedlichen Parasitenisolaten konnte erstmals gezeigt werden, dass DBL3 γ ähnlich wie die konservierte CIDR-Domäne (Gratepanche et al. 2003, Gamain et al. 2001) Epitope besitzt, welche die Produktion von kreuzreaktiven Antikörpern induzieren.

Wie lässt sich jedoch die Kreuzreaktivität von Antikörpern nach Exposition mit der DBL3 γ -Domäne erklären?

Von der DBL3 γ -Domäne werden üblicherweise zwei Subtypen exprimiert, die eine Homologie zu FCR3 und CS2 aufweisen (Fried, Duffy 2002).

Es wäre also möglich, dass einige B-Lymphozyten während ihres Reifungsprozess durch die simultane Präsentation beider Subtypen stimuliert werden. Dies würde zu einer Ausbildung von Antikörpern führen, die sich in ihren Eigenschaften von solchen unterscheiden, die zuvor nur mit einem einzigen rekombinaten Protein immunisiert wurden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass additive Effekte, die von einem individuellen Antigen ausgehen, zu einer Kreuzreaktivität führen (Gratepanche et al. 2003).

4.2. Bindungsstudien

In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Inhibition mit anti-DBL3 γ -Antikörpern von infizierten Erythrozyten an den Rezeptor CSA gezeigt werden.

Da die Antikörper spezifisch für die PfEMP1-Domäne sind, bestätigt dies die zytoadhärenzvermittelnde Funktion von DBL3 γ an CSA (Reeder 1999).

Erstmals wurden in einem Inhibitionsversuch Antikörper verwendet, die gegen eine DBL3 γ -Domäne gerichtet sind, welche ursprünglich aus einem Wildisolat (Kamerun) gewonnen wurde, anstatt wie bisher aus Laborisolaten.

Die Bindung an CSA verringerte sich nach Zugabe von Antikörpern sowohl bei den gabunesischen als auch bei den senegalesischen Isolaten. Aufgrund der Fähigkeit der Antikörper, die Bindung von geografisch unterschiedlichen Parasitenisolaten zu inhibieren, lässt sich schließen, dass die Inhibition von infizierten Erythrozyten an CSA unabhängig ist vom Parasitenstamm. Auch die Tatsache, dass die DBL3 γ -Domäne aus einem anderen Gebiet stammt als die zu inhibierenden Plazentaisolate, spricht für eine Unabhängigkeit der Inhibition an CSA von der Herkunft.

Im Inhibitionsversuch mit erweitertem Antikörperrepertoire (3.4.2) wurden auch erstmals Antikörper gegen Rifin verwendet. Obwohl in vorhergehenden Studien eine immunogene Wirkung von rif-Proteinen bei Erwachsenen in endemischen Gebieten gezeigt werden konnte (Abdel-Latif 2002), ließ sich keine signifikante Inhibition von infizierten Erythrozyten an CSA nachweisen. Aufgrund der Tatsache, dass Rifin zu der größten Genfamilie von Plasmodium gehört und eine größere antigene Variation besitzt als PfEMP1, sowie der Beobachtung, dass mehrere Proteine gleichzeitig auf der Membran exprimiert werden können, lässt sich eine pathogenitätsvermittelnde Rolle von Rifin bei plazentaler Malaria z.B. durch Bindung an einen noch unbekanntem Rezeptor nicht ganz ausschließen.

Auch konnte gezeigt werden, dass anti-DBL1 α -Antikörper keine inhibierende Wirkung auf die Plazentaisolate besaßen. Die Funktion scheint nach bisherigen Erkenntnissen auf die Vermittlung an Rosettingrezeptoren beschränkt zu sein,

welche bei der Pathogenese schwangerschaftsassoziierter Malaria aber keine Rolle spielen (Maubert 1998).

Interessanterweise zeigten Antikörper von Multigraviden eine stärkere Inhibition von infizierten Erythrozyten als anti-DBL3 γ -Antikörper.

Dies ließe sich mit der wiederholten Exposition verschiedener Parasitenisolate während durchgemachter Schwangerschaften erklären, so dass Mehrfachgebärende ein Repertoire an Antikörpern gegen unterschiedliche DBL3 γ -Domänen erwerben, welche die Inhibition von parasitierten Erythrozyten an CSA blockieren und so vor weiteren Infektionen schützen.

Die Beobachtung, dass die membranständige DBL3 γ -Domäne, mit der das Serum reagierte, ursprünglich aus einer anderen Region stammt, lässt auf das Vorhandensein einer strukturellen Konservierung der Domäne schließen, für das in molekularbiologischen Studien (Khatab 2003) erste Hinweise geliefert werden konnte. Ergänzend dazu lässt sich die länderübergreifende Inhibition mit der Entwicklung von kreuzreagierenden Antikörpern erklären, die zwar eine Spezifität für die jeweilige DBL3 γ -Domäne aufweisen, mit der sie konfrontiert wurden, jedoch auch DBL3 γ -Domänen anderer Parasitenstämme binden können.

Eine Konservierung des CSA-bindenden Liganden würde auch erklären, wie Antikörper von Multigraviden die Bindung an CSA von plazentalen Parasiten verschiedener Kontinente blockieren (Fried 1998).

Ebenso bestätigt die vorliegende Studie die Beobachtung von Fried und Duffy, dass Serumproben von Mehrfachgebärenden mit Antigenen auf der Oberfläche von CSA-bindenden Parasiten reagieren, während Serumproben von Männern diese Eigenschaft nicht aufweisen.

In der vorliegenden Studie konnte für die beiden Parasitenisolate Gb337 und VIP43 eine geringfügige aber statistisch signifikante inhibitorische Aktivität mit Erstgebärendenserum gezeigt werden. Diese Beobachtung stünde jedoch in Widerspruch mit der von Duffy und Fried postulierten These eines Antikörperlecks bei Erstgebärenden. Andere Studien konnten aber eine Produktion von Antikörpern nach erfolgter Infektion bei Erstgebärenden nachweisen (O`Neil-Dunne et al. 2001).

Die inhibitorische Aktivität des Primigravidenserums würde sich eher mit den Ergebnissen der Studie von O`Neil-Dunne et al. erklären lassen, sodass folglich Antikörper, die kurz nach einer Infektion produziert werden, als Ursache für die Inhibition anzunehmen sind.

Die blockierende Wirkung von Antikörpern Erstgebärender ist jedoch im Vergleich zur Inhibition mit Multigravidenserum als relativ gering zu betrachten, was somit auch der von Fried und Duffy beschriebenen Unvollständigkeit des Antikörperschutzes oder Naivität des Immunsystems gegenüber des CSA-bindenden Liganden bei Erstgebärenden entsprechen würde.

Weitere Inhibitionsversuche mit einer größeren Anzahl von Primi- und Multigravidenserum sowie die Anwendung von weiteren DBL3 γ -Domänen aus Plazentaisolaten anderer Kontinente sind nötig, um endgültige Aussagen treffen zu können.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Konservierung von DBL3 γ , sowohl in funktioneller als auch in struktureller Hinsicht, sowie das Vorhandensein von kreuzreaktiven Epitopen für einen geeigneten Antigenkandidaten bei der Entwicklung von Impfstoffen in Zusammenhang mit schwangerschaftsassoziierter Malaria sprechen.

Weitere Analysen, z.B. von Plazentaisolaten aus unterschiedlichen Kontinenten, sind daher notwendig, um mögliche Subtypen von DBL3 γ zu identifizieren und im nächsten Schritt in Impfstudien einzusetzen.

5. Zusammenfassung

Eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* in der Schwangerschaft ist sowohl für die Mutter als auch für den Fetus mit gravierenden klinischen Auswirkungen verbunden: Mütterliche Anämie, intrauterine Wachstumsretardierung, ein erniedrigtes Geburtsgewicht sowie eine erhöhte perinatale und maternale Mortalität wurden häufig bei Schwangeren aus endemischen Gebieten beobachtet. Die Anfälligkeit gegenüber Malaria ist besonders hoch bei Erstgebärenden und nimmt mit zunehmender Anzahl der Schwangerschaften ab. Der Schlüsselmechanismus maternaler Malaria liegt in der Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta. Auf der Oberfläche der Syncytiotrophoblasten wird Chondroitinsulfat A (CSA) ausgebildet, welches als Rezeptor für infizierte Erythrozyten fungiert. Die Bindung von infizierten Erythrozyten an CSA wird über *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP1) vermittelt, ein Membranprotein mit einer großen Antigenvariabilität. Für die Sequestration in der Plazenta wurde im Speziellen die PfEMP1-Domäne DBL3 γ identifiziert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in funktionellen Studien zu untersuchen, ob DBL3 γ konservierte strukturelle Eigenschaften besitzt.

Die Inhibitionsversuche zeigten, dass Antikörper gegen DBL3 γ die Adhäsion an CSA von Plazentaisolaten aus verschiedenen geografischen Regionen blockieren können. Analysen im Durchflusszytometer ergaben, dass Sera von schwangeren Frauen aus Gabun Plazentaisolate unterschiedlicher Herkunft erkennen. In funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Inhibition als auch die Erkennung von CSA-bindenden Parasiten unabhängig von der geografischen Herkunft der Isolate sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen somit für eine strukturelle Konservierung der DBL3 γ -Domäne, nicht zuletzt deshalb, um ihre Funktion als Adhäsionsligand aufrechtzuerhalten. Eine Konservierung sowohl in struktureller als auch in funktioneller Hinsicht ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen schwangerschaftsassozierte Malaria.

6. Literaturverzeichnis

- Abdel-Latif, M. S., Khattab, A., Lindenthal, C., Kremsner, P. G., and Klinkert, M. Q. (2002). Recognition of variant Rifin antigens by human antibodies induced during natural *Plasmodium falciparum* infections. *Infect.Immun.* 70, 7013-7021.
- Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldmann M, Tarachi, T.F., Howard, R.J. (1995). Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes: *Cell* 82, 77-87.
- Beeson, J.G., Brown, G.V., Molyneux, M.E., Mhango, C., Dzinjalama, F., and Rogerson, S.J. (1999). *Plasmodium falciparum* isolates from pregnant women and children are associated with distinct adesive and antigenic properties. *J.Infect.Dis.* 180, 464-472.
- Beeson, J. G., Rogerson, S.J., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Chai, W., Lawson, A.M., Molyneux, M.E., and Brown, G.V. (2000). Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat.Med.* 6, 86-90.
- Berendt, A. R., Ferguson, D. J. P., Gardner, G.T., Rowe, A., McCormick, C., Roberts, D., Graig, A., Pinches, R., Elford, B.C., and Newbold, C.I. (1994). Molecular mechanism of sequestration in malaria. *Parasitology* 108,19-28.
- Brabin, B.J. (1983). An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull. World Health Organ.* 61, 1005- 1016.
- Brabin, B. J., (1985). Epidemiology of infection in pregnancy. *Rev.Infect.Dis.* 7, 579-603.
- Bulmer, J. N., Rasheed, F.N., Francis, N., Morrison, N., and Greenwood, B.M. (1993). Placental malaria. I. Pathological classification: *Histopathology* 22, 211-218.
- Carlson, J., Helmy, H., Hill, A. V. S., Brewester, D., Greenwood B. M., and Wahlgren, M. (1990). Human cerebral malaria: association with erythrocyte resetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet* 336, 1457-1460.
- Clark, I. A., Cowden, W.B., Butcher, G.A., and Hunt, N.H. (1987). Possible roles of tumor necrosis factor in pathology of malaria: *Am.J.Pathol.* 129,192-199
- Cooke, B.M., and Coppel, R.L. (1995). Cytoadhesion and falciparum malaria: going with the flow. *Parasitol.Today* 11, 282-287.
- Cranston, H.A., Boylan, C.W., Carroll, G.L., Sutera, S.P., Williamson, J.R., Gluzman, I.Y., and Krogstad, D.J. (1984). *Plasmodium falciparum* maturation abolishes physiologic red cell deformability: *Science* 223, 400-403.

- Flick, K., Scholander, C., Chen, Q., Fernandez, V., Pouvelle, B., Gysin, J., and Wahlgren, M. (2001). Role of nonimmune IgG bound to PfEMP1 in placental malaria. *Science* 293, 2098-2100.
- Fried, M., and Duffy, P.E. (1996). Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta: *Science* 272, 1502-1504.
- Fried, M., and Duffy, P. E. (2002). Two DBLy subtypes are commonly expressed by placental isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 122, 201-210.
- Fried, M., Duffy, P. E., Brockman, A., Brabin, B. J., and Duffy, P. E. (1998). Maternal antibodies block malaria. *Nature* 395, 851-852.
- Gamain, B., Miller, L. H., and Baruch, D. I. (2001). The surface variant antigens of *Plasmodium falciparum* contain cross-reactive epitopes. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 98, 2664-2669
- Gamain, B., Smith, J.D., Miller, L.H., and Baruch, D.I. (2001). Modifications in the CD36 binding domain of the *Plasmodium falciparum* variant antigen are responsible for the inability of chondroitin sulfate A adherent parasites to bind CD36. *Blood* 97, 3268-3274.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., and Carlton, J. M. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511.
- Gilles, H.M., Lawson, J.B., Sibelas, M., Voller, A., and Allan, N. (1969). *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 63, 245-263.
- Gratepanche, S., Gamain, B., Smith, J. D., Robinson, B. A., Saul, A., and Miller, L. H. (2003). Induction of crossreactive antibodies against the *Plasmodium falciparum* variant protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100, 13007-13012.
- Gysin, J., Pouvelle, B., Fievet, N., Scherf, A., and Lepolard, C. (1999). Ex vivo desequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from human placenta by chondroitin sulfate A. *Infect.Immun.* 67, 6596-6602.
- Jeliffe, E. F. P. (1968). Low birth weight and malarial infection of the placenta. *Bull. World Health Organ.* 38, 69-78.
- Khattab, A., Kremsner, P. G., and Klinkert, M. Q. (2003). Common surface-antigen var genes of limited diversity expressed by *Plasmodium falciparum* placental isolates separated by time and space. *J.Infect.Dis.* 187, 477-483.
- Laurent, T.C., and Fraser, J.R.E. (1992). Hyaluronan. *FASEB J.* 6, 2397-2404.
- Luse, S.A., and Miller, L.H. (1971). *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels: *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 20, 655-660.

- MacPherson, G.G., Warrell, M.J., White, N.J., Looareesuwan, S., and Warrell, D.A.(1985). Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am.J.Pathol.*119, 385-401.
- Martin, B.J., Spicer, S.S., and Smythe, N.M. (1974). Cytochemical studies of the maternal surface of the syncytiotrophoblast of human early and term placenta. *Anat.Rec.* 178, 769-785.
- Marzioni, D., Crescimanno, C., Zaccheo, D., Coppari, R., Underhill, C.B., and Castelluci, M. (2001). Hyaluronate and CD44 expression patterns in the human placenta throughout pregnancy. *Eur.J.Histochem* 45, 131-140.
- Maubert, B., Fievet, N., Tami, G., Beudin, C., and Deloron, P. (2000). Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the human placenta. *Parasite Immunol.* 22, 191-199.
- Maubert, B., Fievet, N., Tami, G., Boudin, C., and Deloron, P. (1998). *Plasmodium falciparum*-isolates from Cameroonian pregnant women do not rosette. *Parasite* 5, 281-283.
- Maubert, B., Fievet, N., Tami, G., Cot, M., Boudin, C., and Deloron, P. (1999) Development of antibodies against chondroitin sulfate A-adherent *Plasmodium falciparum* in pregnant women. *Infect.Immun* 67, 5367-5371.
- Maubert, B., Guilbert, L.J., and Deloron, P. (1997). Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to intercellular adhesion molecule 1 and chondroitin-4- sulfate expressed by the syncytiotrophoblast in the human placenta. *Infect. Immun.* 65, 1251-1257.
- McGregor, I.A. (1984). Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 33, 517-525.
- McGregor, I. A., Wilson, M.E., and Billewicz, W.Z. (1983). Malaria infection of the placenta in The Gambia, West Africa; its incidence and relationship to stillbirth, birthweight and placental weight. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 77, 232-244.
- Menon, R. (1972). Pregnancy and malaria. *Med.J.Malaya.* 27, 115-119.
- O`Neil-Dunne, I., Achur, R. N., Agbor-Enoh, S. T., Valiyaveetil, M., Naik, R. S., Ockenhouse C. F., Zhou, A., Megnekou, R., Leke, R., Taylor, D. W., and Gowda D. C. (2001). Gravidity-dependent production of antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy. *Infect.Immun.*69, 7487-7492.
- Ockenhouse, C.F., Ho, M., Tandon, N.N., van Seventer, G.A., Shaw, S., White, N.J., Jamieson, G.A., Chulay, J.D., and Webster, H.K. (1991). Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: Differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. *J.Infect.Dis.* 164, 163-169.

Parmley, R.T., Takagi, M., and Denys, F.R. (1984). Ultrastructural localization of glycosaminoglycans in human term placenta. *Anat.Rec.* 210, 477-484.

Reeder, J. C., Cowman, A. F., Davern, K. M., Beeson, J. G., Thompson, J. K., Rogerson, S. J., and Brown, G. V. (1999). The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 5198-5202.

Ricke, C. H., Staalsoe, T., Koram, K., Akanmouri, B. D., Riley, E. M., Theander, T. G., and Hviid, L. (2000). Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A. *J.Immunol.* 165, 3309-3316.

Robert, C., Pouvelle, B., Meyer, P., Muanza, K., Fujioka, H., Aikawa, M., Scherf, A, and Gysin, J. (1995). Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells: *Res.Immunol.*146, 383-393.

Roberts, D. J., Craig, A. G., Berendt, A. R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K., and Newbold, C. I. (1992). Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* 357, 689-692.

Rogerson, S. J., and Beeson, J.G. (1999). The placenta in malaria: mechanism of infection, disease and foetal morbidity: *Ann.Trop. Med.Parasitol.* 93 , S35-S42.

Rowe, J. A., Moulds, J. M., Newbold, C.I., and Miller. L. H. (1997). *P. falciparum* resetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement- receptor 1. *Nature* 388, 292-295.

Sartelet, H., Garraud, O., Rogier, C., Milko-Sartelet, I., Kaboret, Y., Michel, G., Roussilhon, C., Guerre, M., and Gaillard, D. (2000). Hyperexpression of ICAM-1 and CD36 in placentas in sequestration of infected red blood cells in placenta. *Histopathology* 36, 62-68.

Silamut, K., Phu, N.H., Whitty, C., Turner, G.D., Louwrier, K., Mai, N.T., Simpson, J.A., Hien, T.T., and White, N.J. (1999). A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain: *Am.J.Pathol.* 155, 395-410.

Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I., and Miller, L.H. (1995). Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82, 101-110.

Steketee, R .W., Nahlen, B.L., Parise, M.E., and Menendez. (2001). The Burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas: *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 64, 28-35.

Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A., and Wellems, T.E. (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82, 89-100.

Sylla, E. H., Kun, J. F., and Kremsner, P. G. (2000). Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 94, 652-656.

Turner, G.D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T.M., Lovareesuwan, S., Buley, I.D., Gatter, K.C., Newbold, C.I., and Pukritayakamee, S. (1994). An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am.J.Pathol.* 145, 1057-1069.

Valiyaveetil M., Achur, R.N., Alkhalil, A., Ockenhouse, C.F. and Gowda, D.C. (2001). *Plasmodium falciparum* cytoadherence to human placenta: Evaluation of Hyaluronic Acid and chondroitin 4-sulfate for Binding of infected erythrocytes. *Exp.Parasitol.* 99, 57-65.

Vleugels, M.P.H., Brabin, B., Eling, W.M.C., and De Graaf, R. (1989). Cortisol and *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Kenya. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 83, 173-177.

Wahlgren, M. (1986). Antigens and antibodies involved in humoral immunity to *Plasmodium falciparum*. Ph. D. Thesis. Karolinska Institute, Stockholm. ISDN 91-7900-026-6.

Waller, K. L., Cooke, B.M., Nunomura, W., Mohandas, N., and Coppel, R.L. (1999). Mapping the binding domains involved in the interaction between the *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *J.Biol.Chem.* 274, 23808-23813.

Walter, P.R., Garin, Y., and Blot, P. (1982). Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am.J.Pathol.* 109, 330-342.

Weinberg, F.D. (1984). Pregnancy associated depression of cell mediated immunity. *Rev.Infect.Dis.* 6, 814-831.

White, N. J, and Ho, M. (1992). The pathophysiology of malaria, p. 84-175. In R M J R Baker, *Advances in Parasitology*. Academic press, London, United Kingdom

Wildling, E., Winkler, S., Kremsner, P. G., Brandts, C., Jenne, L., and Wernsdorfer, W. H. (1995). Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Trop.Med.Parasitol.* 46, 77-82.

Wickramasuriya, G. A. W. (1937). Clinical features of malaria in pregnancy. In: Malaria and Ankylostomiasis in the pregnant woman. London: Oxford University Press.

Yamada, M., Steketee, R., Abramowsky, C., Kida, M., Wirima, J., Heymann, D., Rabbege, J., Breman, J. And Aikawa, M. (1989). *Plasmodium falciparum* associated placental pathology: a light and electron microscopic and immunohistologic study. Am.J.Trop.Med.Hyg. 41, 161-168.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Kremsner für die freundliche Überlassung des Themas und seine Unterstützung bedanken.

Ich danke Frau PD Dr. Mo-Quen Klinkert für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung sowie freundschaftliche Zusammenarbeit während der gesamten Zeit.

Mein Dank gilt allen Kollegen aus Lambaréné und Tübingen für die anregende und freundschaftliche Zusammenarbeit. Besonders danke ich Herrn Dr. Ayman Khattab für seine Geduld, permanente Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung sowohl in Lambaréné als auch in Tübingen.

Ich möchte mich ganz besonders bei Wilfried Meier für seinen steten Beistand, seine Motivation und für die kritische Lektüre des Manuskriptes bedanken.

Eduard Kusch danke ich ganz herzlich für seine Geduld und andauernde Hilfsbereitschaft, die er mir bei der Fertigstellung des Manuskriptes entgegengebracht hat, sowie meiner gesamten Familie.

Ich danke allen Hebammen des Albert-Schweitzer-Hospitals für deren enge Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, sowie allen Müttern, die bereitwillig an dieser Studie teilgenommen haben.

Lebenslauf von Christina Kimberly Reinhardt

Geboren:	19.05.1979 in Karlsruhe
1985-1989	Grundschule in Rastatt
1989-1998	Gymnasium in Rastatt
1998-2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
06.09.2000	Physikum
2000-2006	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
21.03.2002	Erstes Staatsexamen
2002-2003	Forschungsaufenthalt (6 Mon.) im Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné/ Gabun und Fortführung der Studie für weitere 6 Monate im Tropeninstitut Tübingen Sektion Humanparasitologie
31.03.2005	Zweites Staatsexamen
2005-2006	Praktisches Jahr: 1. Tertial: Chirurgie Inselspital Bern, Schweiz Sunnybrook Health Science Centre, Toronto, Kanada 2. Tertial: Gynäkologie Hospital Civil Nuevo, Guadalajara, Mexiko 3. Tertial: Innere Medizin Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart
10.05.2006	Drittes Staatsexamen

