

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
(Department) Tübingen  
Abteilung Innere Medizin VII Tropenmedizin  
Sektion Humanparasitologie  
Leiter: Professor Dr. P. G. Kremsner**

**Neonatale und mütterliche zelluläre Immunantwort in  
Abhängigkeit von plazentarer *Plasmodium falciparum*  
Infektion**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Ulrike Möller**

**aus**

**Wedel**

**2009**

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Steinle

Dass wir Ärzte in Lambaréné jetzt zu dritt sind, erlaubt also, dass wissenschaftlich gearbeitet wird und Feststellungen gemacht werden, die von großer Bedeutung für die Behandlung der Kranken sind.

Der Arzt, der im Urwald allein arbeitet, wird von dem täglichen Betriebe so in Anspruch genommen, dass ihm weder Zeit noch Energie bleiben, rätselhaften Fällen auf den Grund zu gehen. In jedem Tropenspital sollten also mindestens zwei Ärzte sein.

Albert Schweitzer, 1926

S.D.G.



## Inhaltsverzeichnis

### 1 Einleitung

<b>1.1 Malaria – Bedeutung</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Historisches</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Mikrobiologie</b>	<b>2</b>
1.3.1 Spezies	2
1.3.2 Entwicklungszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	2
1.3.3 Epidemiologie	4
1.3.3.1 Geographische Verteilung	4
1.3.3.2 Klinische Epidemiologie	6
<b>1.4 Malaria tropica</b>	<b>7</b>
1.4.1 Klinik	7
1.4.2 Pathophysiologie von <i>P. falciparum</i>	7
1.4.3 Diagnostik	9
<b>1.5 Malaria in der Schwangerschaft</b>	<b>10</b>
1.5.1 Epidemiologie	10
1.5.2 Pathogenese der Plazentaren Malaria	11
<b>1.6 Immunologie von <i>Plasmodium falciparum</i></b>	<b>12</b>
1.6.1 Natürliche Resistenz	13
1.6.2 Erworbene (spezifische) Immunität	14
1.6.2.1 Zelluläre Immunität vermittelt durch T-Lymphozyten	15
1.6.2.2 Humorale Immunität vermittelt durch B-Lymphozyten	17
1.6.3 Angeborene (unspezifische) Immunität	18
1.6.3.1 NK-Zellen	18
1.6.3.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen	19
1.6.4 Zytokine	20
1.6.5 Modell für Immunantwort bei <i>P. falciparum</i> Malaria	21
1.6.6 Immunologie der Malaria in der Schwangerschaft	22
1.6.6.1 Allgemeine Immunologie in der Schwangerschaft	22
1.6.6.2 Immunologie der PAM	23
1.6.7 Neonatale Immunologie	25
1.6.7.1 Allgemeine Immunologie des Neugeborenen	25
1.6.7.2 Neonatale Immunologie und PAM	26
<b>1.7 Ziel dieser Arbeit</b>	<b>30</b>

## 2 Methodik

<b>2.1 Studienort</b>	<b>32</b>
2.1.1 Geographie	32
2.1.2 Epidemiologie	33
<b>2.2 Rekrutierung</b>	<b>34</b>
2.2.1 Einwilligung und Anamnese	34
2.2.2 Probengewinnung	34
<b>2.3 Diagnostik</b>	<b>35</b>
2.3.1 Hämatologische Diagnostik	35
2.3.2 Gruppeneinteilung aufgrund des Malariastatus	35
2.3.2.1 Dicker Tropfen	36
2.3.2.2 PCR für <i>P. falciparum</i> DNA	37
<b>2.4 Isolierung der mononukleären Zellen (PBMCs)</b>	<b>38</b>
<b>2.5 <i>P. falciparum</i>-spezifische PMBC-Stimulation</b>	<b>39</b>
2.5.1 Schizontenlysat von <i>P. falciparum</i>	40
2.5.1.1 Parasitenkulturen	40
2.5.1.2 Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination	41
2.5.1.3 Synchronisation der Parasitenkultur durch MACS	41
2.5.2 Ansatz der Stimulation	43
<b>2.6 Unspezifische PMBC-Stimulation</b>	<b>43</b>
<b>2.7 Unstimulierte <i>ex vivo</i> PBMCs</b>	<b>44</b>
<b>2.8 Zellen „ernten“ und fixieren</b>	<b>44</b>
<b>2.9 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)</b>	<b>45</b>
2.9.1 Färbung	47
2.9.2 Analyse	47
<b>2.10 Statistische Analyse</b>	<b>50</b>

## 3 Ergebnisse

<b>3.1 Gruppeneinteilung nach Malariadiagnostik</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Klinische Daten der Studienpopulation</b>	<b>53</b>
3.2.1 Vergleich von Multigravidae und Primigravidae	54
3.2.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen	55
<b>3.3 Oberflächenmarker und Zytokinmessungen nach Stimulation</b>	<b>56</b>
3.3.1 HLA-DR	56
3.3.2 CD45	57

3.3.3	CD25	58
3.3.4	IL-10 und IL-5	59
3.3.5	IFN- $\gamma$ und IL-13	59
3.3.6	Perforin und Granzym B	60
<b>3.4</b>	<b>Vergleich von PBMCs und CBMCs</b>	<b>63</b>
<b>3.5</b>	<b>Zusammenhang zwischen Jahreszeit und Zytokinproduktion</b>	<b>66</b>
<b>3.6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
<b>4.1</b>	<b>Klinische Aussagen und Hämatologie</b>	<b>69</b>
<b>4.2</b>	<b>Expression spezifischer Oberflächenmarker und Zytokine</b>	<b>70</b>
4.2.1	Allgemeines	70
4.2.2	HLA-DR	71
4.2.3	CD45	72
4.2.4	CD25	73
4.2.5	IFN- $\gamma$ und IL-13	73
4.2.6	Perforin und Granzym B	74
<b>4.3</b>	<b>Unterschiede im mütterlichen und neonatalen Immunsystem</b>	<b>75</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss der Jahreszeit auf das Immunsystem</b>	<b>79</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	
<b>7.1</b>	<b>Material</b>	<b>107</b>
7.1.1	Lebendes Material	107
7.1.2	Chemikalien, Lösungen, Nährmedien, Puffer, Reagenzien, Gase	107
7.1.3	Monoklonale Antikörper und Isotypkontrollen	108
7.1.4	Verbrauchsmaterial	109
7.1.5	Geräte	110
7.1.6	Hardware, Software	111

<b>7.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>111</b>
<b>7.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>7.4</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>117</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Malaria – Bedeutung

Malaria ist nach wie vor die bedeutendste Tropenkrankheit und stellt zusammen mit AIDS und Tuberkulose eines der wichtigsten medizinischen Probleme in den Entwicklungsländern dar. Bei Malaria handelt es sich um eine durch Plasmodien verursachte Protozoeninfektion, die durch Stechmücken übertragen wird. Etwa 40 % der Weltbevölkerung (> 2,1 Milliarden Menschen), besonders in den ärmsten Ländern, sind dem Malariarisiko ausgesetzt [9] und die Inzidenz beträgt 300 bis 500 Millionen Neuerkrankungen jährlich [7]. Jedes Jahr ist Malaria die Todesursache von etwa 2 Million Menschen weltweit [67]. Hauptsächlich sind dabei Kinder unter fünf Jahren im subsaharischen Afrika betroffen, wo täglich etwa 3000 Kinder an den Folgen von Malaria sterben. Malaria ist dort für etwa 20 % der Todesfälle bei Kindern verantwortlich [7]. Außer den Kindern sind besonders schwangere Frauen und ihre Neugeborenen von der schweren klinischen Verlaufsform der Krankheit bedroht. Noch gibt es keine Impfung, die flächendeckend eingesetzt werden könnte, um diese Todesfälle zu verhindern.

Auch ökonomisch hat Malaria besonders in den Ländern Afrikas einen negativen Einfluss und hindert das wirtschaftliche Wachstum: 10-12 Milliarden US Dollar werden durch die Krankheit jedes Jahr in Afrika am Bruttoinlandsprodukt verloren [7] und Malaria ist laut Wirtschaftswissenschaftlern verantwortlich für 1,3 % Verlust an Wachstum pro Jahr in einigen afrikanischen Ländern [2]. Die vielfältigen direkten und indirekten Kosten für die Wirtschaft beinhalten einen Verlust an humanen Ressourcen durch Tod und Arbeitszeitverlust, Ausfall von Produktivität und Einkommen, ebenso wie Auswirkung auf die Schulbildung durch vermehrte Absenienzeiten und neurologischen Sequelae nach zerebraler Malaria [2].

## 1.2 Historisches

Der Name "Malaria" kommt vom lateinischen "mal aria" - schlechte Luft. In Italien wurde im 18. Jahrhundert die schlechte Luft in den Sümpfen um Rom in Verbindung mit fieberhaften Erkrankungen gebracht. Auch der französische Begriff "paludisme" leitet sich von "palus" ab, dem marschigen Land [265, 270]. Saisonale intermittierende Fieber sind schon seit 3000 Jahren bekannt [279], aber Hippokrates beschrieb im 5. Jahrhundert als erster das genaue klinische Bild der Malaria [265]. 1880 wurde von dem französischen Chirurgen Laveran in Algerien Parasiten in menschlichen Erythrozyten eines Patienten mit Malaria beschrieben und 1897 konnte der Schotte Ronald Ross in Indien zuerst Malariaparasiten in einer Stechmücke nachweisen. Malaria konnte nach dem 19. Jahrhundert aus Europa, Nordamerika und Russland eradiziert werden, aber in den Tropen nahm die Krankheit besonders durch die Resistenzentwicklung der Plasmodien gegenüber Antimalariamitteln seit den 60er Jahren wieder an Bedeutung zu [265, 270].

## 1.3 Mikrobiologie

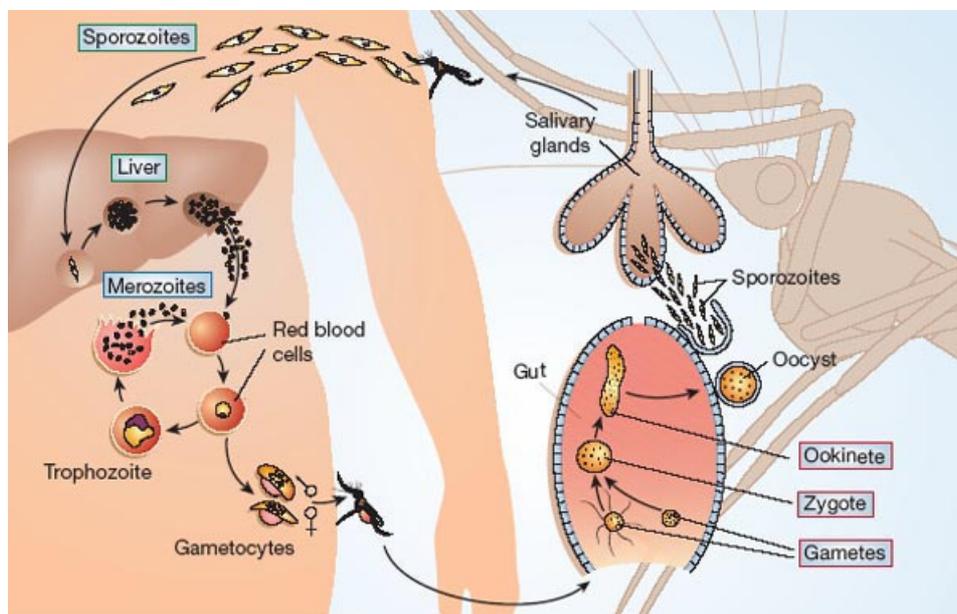
### 1.3.1 Spezies

Die Plasmodien sind Protozoen, die zur Klasse der Sporozoen gehören. Es existieren vier humanpathogene Plasmodienarten, die unterschiedliche Verbreitung und klinische Manifestationen aufweisen: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* [132]. *Plasmodium falciparum* hat dabei die größte klinische Bedeutung - als Erreger der Malaria tropica verursacht *P. falciparum* beinahe alle Todesfälle und schweren Erkrankungen [270].

### 1.3.2 Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum*

*P. falciparum* wird von weiblichen Stechmücken der Gattung *Anopheles*, die den Hauptwirt darstellen, auf den Menschen übertragen. Die Plasmodien

entwickeln sich über einen sexuellen Zyklus in der *Anopheles* und über einen asexuellen Zyklus im Menschen (Abb. 1.1). Die weibliche *Anopheles* benötigt die Blutmahlzeit für die Entwicklung ihrer Eier - ein Saugakt genügt für die Produktion von etwa 100 Eiern. Bei so einer Blutmahlzeit injiziert sie Sporozoiten aus ihrer Speicheldrüse ins Gewebe. Innerhalb von 45 Minuten gelangen diese dann über den Blutkreislauf zur Leber und invadieren dort Hepatozyten. Durch asexuelle Reproduktion entstehen aus jedem Sporozoiten innerhalb etwa einer Woche Leberschizonten - exoerythrozytäre Schizonten. Wenn diese rupturieren, werden aus jeder Zelle 10.000 bis 30.000 Merozoiten frei. Alle intrahepatischen Parasiten der *P. falciparum* entwickeln sich so weiter; es gibt keine in Ruhephase verbleibenden Hypnozoiten, die bei *P. vivax* und *P. ovale* zu Rückfällen führen. Die freigesetzten Merozoiten befallen bevorzugt junge Erythrozyten nach Binden über spezifische erythrozytenbindende Proteine und entwickeln sich in ihnen zu Trophozoiten - unter dem Mikroskop als klassische Ringformen erkennbar (siehe 1.4.3).



**Abbildung 1.1** Entwicklungszyklus *Plasmodium falciparum* [161]

Später exprimieren die Trophozoiten das *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP1*) an der Oberfläche der infizierten Erythrozyten in knopfartigen Ausstülpungen der Membran („knobs“), über welches diese ans

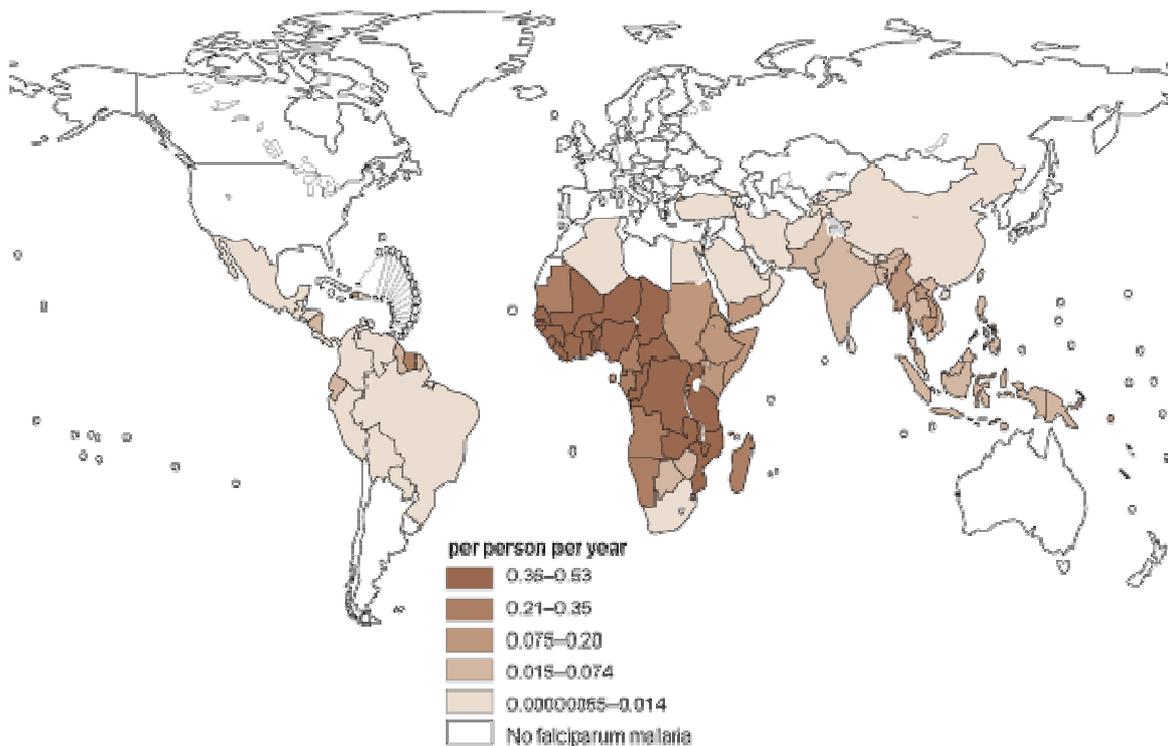
Endothel von postkapillären Venolen zytoadhären [139, 257]. Über diese Sequestration verschwinden sie allmählich aus der Zirkulation und entgehen der Elimination durch die Milz [67, 167, 278]. Die Trophozoiten konsumieren das Hämoglobin der roten Blutkörperchen und entwickeln sich dabei über Zellteilung zu Schizonten mit 6 bis 36 Merozoiten. Wenn die reifen Erythrozytenschizonten schließlich platzen, werden die Merozoiten freigesetzt und invadieren neue Erythrozyten. Dieses ist die asexuelle Phase im Menschen, die Schizogonie, die etwa 48 Stunden dauert. Einige der Trophozoiten entwickeln sich innerhalb von 7-10 Tagen zu männlichen oder weiblichen Gametozyten, die lange überleben und mobil sind. Diese können vom Anophelesweibchen bei einer Blutmahlzeit wieder aufgenommen werden - nun findet die sexuelle Phase statt, die Sporogonie, die 8-35 Tage dauern kann. Im Magen der Mücke werden die Gametozyten aktiviert: Die männlichen Gametozyten teilen sich in 8 flagellierte Mikrogameten, die auf die Suche nach den weiblichen Makrogameten gehen. Über Fusion entsteht eine Zygote. Die sich vergrößernde Ookinete penetriert die Magenwand und formt außerhalb eine Oozyste, die sich durch asexuelle Teilung vergrößert. Nach Ruptur der Oozyste wandern die Sporozoiten zur Speicheldrüse der Mücke und können mit dem Speichel beim nächsten Stich wieder einen Menschen infizieren [132, 270]. Außer dieser horizontalen Übertragung über den Vektor Mücke von einem Menschen auf den anderen, ist auch eine direkte Übertragung der Plasmodien auf dem Blutweg möglich wie bei Transfusionen oder Transplantationen - oder die vertikale Übertragung von der Mutter auf den Fetus.

### **1.3.3 Epidemiologie**

#### **1.3.3.1 Geographische Verteilung**

Malaria kommt weltweit in den Tropen in einem breiten Gürtel um den Äquator vor (Abb. 1.2). *Plasmodium falciparum* lässt sich hauptsächlich im subsaharischen Afrika, aber auch in Südostasien, Papua-Neuguinea, kleinen Gebieten im Norden Südamerikas und Haiti finden. Die Verbreitung entspricht derer der *Anopheles* Moskitos, von denen knapp 400 verschiedene Arten

beschrieben wurden - etwa 80 davon können Malaria übertragen, 45 gelten als wichtige Vektoren der Plasmodien. Alle haben verschiedene Verhaltensweisen [270]. *Anopheles* kommen in der Nähe des Äquators nicht in über 2500 Meter Höhe vor und in anderen Gebieten nicht in über 1500 Meter [132]. Damit sind diese Höhenlagen malariafrei.



**Abbildung 1.2** Verbreitung von *P. falciparum* 2004 - geschätzte Inzidenz klinischer Episoden pro Person und Jahr [8]

In den meisten Gebieten ist Malaria am häufigsten in der Regenzeit, die den Moskitos mit reichlich Wasser zum Brüten die besten Bedingungen zum Überleben bietet [270]. Malaria ist für 10,7 % aller Todesfälle bei Kindern in Entwicklungsländern verantwortlich und steht damit an vierter Stelle der Todesursachen in dieser Gruppe [6]. *P. falciparum* hat in Afrika die wichtigste Bedeutung: 30 % aller ambulanten Klinikbesuche im subsaharischen Afrika haben Malaria zur Ursache, die Krankheit verursacht mindestens 25 % aller Hospitalisierungen [5].

### 1.3.3.2 Klinische Epidemiologie

Es gibt verschiedene Grade der Endemie von Malaria: holoendemische, hyper- oder mesoendemische und hypoendemische Gebiete. Diese Gebiete werden über das prozentuale Vorkommen von Splenomegalie oder Parasitämien im Kindesalter eingeteilt [265]. Die klinische Epidemiologie und Krankheitsausprägung ist je nach Endemiegebiet sehr unterschiedlich. Im Folgenden soll nur auf Gebiete mit stabiler Malaria eingegangen werden, wobei hyper- bis holoendemische Gebiete gemeint sind: Die Durchseuchung mit Malaria ist in diesen Gebieten so groß, dass es geringere epidemiologische Schwankungen gibt. Die *Anopheles* brütet ganzjährig und ist gleichmäßig verbreitet, so dass die Zahl der Neuinfektionen fast konstant bleibt. In diesen Gebieten entwickeln Erwachsene einen hohen Grad an klinischer Immunität (Semi-Immunität) [132].

Kinder, die in Gebieten mit hoher Übertragung geboren werden und bei denen in bis zu 25 % im Nabelschnurblut *P. falciparum* Parasitämien nachgewiesen werden können [75, 249], scheinen für 3 bis 6 Monate immun zu sein [202]. Kongenitale Malaria entsteht durch infizierte Erythrozyten, die intrauterin die Plazentaschranke überschreiten [147], aber selten klinisch manifest werden [136]. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Die Parasiten werden meist schnell aus dem Blut entfernt - wahrscheinlich bedingt durch die Übertragung der maternalen Immunoglobuline und den hohen Anteil an Hämoglobin F in den infantilen Erythrozyten, die das Wachstum der Parasiten hemmen [184, 202, 270]. Im ersten Lebensjahr kann man oft Parasiten im Blut nachweisen, die schwere Ausprägung der Infektion ist aber selten [270]. Nach der Zeit einer gewissen Immunität sind die Kinder dann anfälliger für diese [265, 266]. Die hauptsächliche klinische Auswirkung in den ersten drei Lebensjahren ist dabei eine schwergradige Anämie. Ab dem 5. Lebensjahr gibt es dann kaum noch klinisch manifeste Malaria und ihr Schweregrad wird geringer, auch wenn eine Durchseuchung mit Parasiten weiter besteht [157]. In Gebieten mit stabiler Malaria entwickeln Erwachsene nie den schweren klinischen Verlauf, die meisten Infektionen bei Erwachsenen verlaufen asymptomatisch oder sehr mild [270].

## 1.4 Malaria tropica

### 1.4.1 Klinik

Malaria kann viele verschiedene Krankheitserscheinungen und -ausprägungen verursachen. Diese sind abhängig von der Endemität der Region und der vorher bestehenden altersabhängigen Immunität des Patienten. Die Inkubationszeit beträgt 8-15 Tage. Danach sind die ersten Symptome meist unspezifisch und grippeähnlich: Kopfschmerzen, Myalgien, Abdominalschmerzen, Anorexia und Lethargie gehen oft dem Fieber schon einige Tage voraus. Die vollständig synchronisierte Infektion würde beim gleichzeitigen Platzen der Schizonten alle zwei Tage einen Fieberschub auslösen, aber bei *P. falciparum* ist diese Periodizität meistens nicht erkennbar. Eine klassische Fieberattacke beginnt mit der „kalten Phase“ und Schüttelfrost beim Fieberanstieg bis zu über 39° C, der 10-30 Minuten dauern kann. Bei der maximalen Fieberausprägung fühlt sich der Patient warm an und beim Fieberabfall kommt es klassischerweise zum Schweißausbruch, der Patient schläft erschöpft. Meistens sind allerdings bei der Malaria tropica eher unregelmäßige oder gar kontinuierliche Fieberschübe zu beobachten [132, 270].

Schließlich kommt es zu Gewichtsverlust, Hepatosplenomegalie und Anämie. Weitere Manifestationen sind gastrointestinale Störungen und respiratorische Symptome [270]. Verschiedene Ausprägungen der Bewusstseinsstörung bis hin zum Koma deuten auf zerebrale Malaria hin. WHO-Kriterien (2002) der schweren Malaria sind: schwere Anämie (Hämoglobin < 5 g/dl), zerebrale Malaria, akutes Nierenversagen, Lungenödem, Hypoglykämie, Schock, Spontanblutungen, wiederholte generalisierte Krämpfe, metabolische Azidose, makroskopische Hämoglobinurie (früher Schwarzwasserfieber genannt), Prostration oder Hyperparasitämie [270].

### 1.4.2 Pathophysiologie von *P. falciparum*

Die Pathophysiologie der Plasmodien ist noch nicht eindeutig geklärt. Alle klinischen Symptome werden dem erythrozytären Stadium der Parasiten

zugeordnet [281]. Die hauptsächlichen Mechanismen, die bei der Pathogenese eine Rolle spielen, scheinen das Rosetting und die Sequestration zu sein. Infizierte Erythrozyten verlieren ihre Verformbarkeit und werden rigide, was den Blutfluss beeinträchtigt. Zusätzlich scharen sie in einer Rosettenform nicht infizierte Erythrozyten um sich („Rosetting“). Die Bindung geschieht durch *PfEMP<sub>1</sub>* an verschiedene Moleküle der Erythrozytenoberfläche. Die übrigen infizierten Erythrozyten sequestrieren - auch über *PfEMP<sub>1</sub>* [270]. Dieses Membranprotein wird von der Familie der *var* Gene der Parasiten kodiert und an der Oberfläche der *P. falciparum* infizierten Erythrozyten exprimiert [226, 235]. Es unterliegt *in vitro* einer Antigenvariation von 2 % je Generation [204]. Die Bindung finden über verschiedene Ligandenproteine auf den Zielzellen statt: Fast alle Parasiten binden an CD36 im Endothelium und auf Makrophagen und Monozyten. Über ICAM1 (inter-cellular adhesion molecule) binden die Erythrozyten im Gehirn und über Chondroitinsulfat A (CSA) in der Plazenta. Die mikrozirkulatorische Obstruktion in vielen Organen führt zu anaerober Glycolyse, Laktatazidose und zellulärer Dysfunktion [270]. Nur jeweils ein *PfEMP<sub>1</sub>* zur Zeit wird an der Oberfläche der befallenen Erythrozyten exprimiert - für jeweils einen spezifischen Liganden auf den Zielzellen [76].

Die normozytäre Anämie ist multifaktoriell verursacht - hauptsächlich durch Hämolyse beim Freisetzen der Merozoiten bei der Schizogonie, aber auch durch vermehrten Abbau nicht infizierter Zellen, Hemmung der Erythropoese und möglicherweise immunologische Mechanismen [188, 270]. Die Pathophysiologie kann außerdem durch das Freisetzen von Zytokinen aus den betroffenen Zellen des Immunsystems erklärt werden. Neben einer Reihe pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und deren Regulatoren scheint TNF- $\alpha$  eine Rolle bei der schweren Verlaufsform zu spielen, obwohl es widersprüchliche Studien zu seiner Wirkung gibt [270]. Zytokine lösen sicherlich Fieber aus, regen wohl die Stickoxid-Bildung (NO) an, promovieren Zytoadhärens durch Hochregulieren der Adhäsionsmoleküle und supprimieren wahrscheinlich die Erythropoese und Glukoneogenese [270].

### 1.4.3 Diagnostik

Die Diagnose von Malaria wird vor allem in endemischen Gebieten immer noch mikroskopisch gestellt, obwohl es nun auch immundiagnostische Möglichkeiten gibt. Die klassischen Methoden sind entweder der normale Blutausstrich oder der Dicke Tropfen, die beide nach Giemsa gefärbt werden (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3** *P. falciparum* im Giemsapräparat - Ausstrich und Dicker Tropfen [1]

Während beim Blutausstrich die Erythrozyten nebeneinander liegen und deshalb die Abgrenzung der verschiedenen Spezies einfacher ermöglicht, hat der Dicke Tropfen eine bessere Sensitivität auch bei geringer Parasitämie. Letzterer wird nämlich nicht fixiert und erlaubt eine einfachere Diagnostik, da mehrere Schichten lysierter Erythrozyten mit ihren Parasiten übereinander

liegen und weniger Sichtfelder evaluiert werden müssen. Von *P. falciparum* findet man im peripheren Blutastrich hauptsächlich Ringformen, seltener Schizonten oder Gametozyten. Die Parasitämie wird dann in Parasiten pro Mikroliter Blut oder als Prozentsatz aller Erythrozyten angegeben [270]. Für eine negative Diagnose sollten drei sukzessive Präparate als negativ befunden werden.

Zu den immundiagnostischen Möglichkeiten gehören die immunchromatographischen Antikörper-Nachweise der Antigene *PfHRPII* und *PfLDH*, die als Schnelltests auf Testkarten erhältlich sind und im Feld eingesetzt werden können. DNA-Nachweise über PCR werden vor allem für Forschungszwecke, nicht aber für klinische Diagnostik eingesetzt [270].

## **1.5 Malaria in der Schwangerschaft**

### **1.5.1 Epidemiologie**

Jährlich sind im subsaharischen Afrika ungefähr 25 Millionen Schwangerschaften dem Malariarisiko ausgesetzt [54]. Während der Schwangerschaft - bei der PAM (pregnancy-associated Malaria) - zeigt sich ein klares epidemiologisches Muster in hyper- und holoendemischen Gebieten. Die klinische Immunität [166, 217] einhergehend mit allmählicher Abnahme der Frequenz und Schwere der Infektionen, die während der ersten Lebensjahre entwickelt wurde, nimmt wieder ab [33] und das trifft besonders auf die erste Schwangerschaft zu [29, 155]. Dabei entwickeln die Schwangeren selten eine klinische Erkrankung [156, 162]; der Plasmodienbefall verursacht vor allem maternale Anämie [29] und niedriges Geburtsgewicht der Neugeborenen (< 2500 g) [158]. In nachfolgenden Schwangerschaften nimmt diese Anfälligkeit der Schwangeren wieder ab [60, 263]. Bei jeder vierten Frau kann zum Zeitpunkt der Geburt plazentare Malaria nachgewiesen werden [54].

Niedriges Geburtsgewicht ist in Entwicklungsländern hauptsächlich durch intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) verursacht [262]. Malaria dürfte dabei eine ausschlaggebende Rolle spielen, denn in einem Bericht aller in den Jahren 1985-2000 publizierten Studien zu dem Thema - hauptsächlich aus dem subsaharischen Afrika - wurde Malaria assoziiert mit maternaler Anämie, niedrigem Geburtsgewicht, IUGR und Säuglingssterblichkeit [231]. Niedriges Geburtsgewicht ist der wichtigste Determinant für die Höhe der Säuglingssterblichkeit [154]. Geschätzte 100.000 Säuglingstodesfälle werden jedes Jahr im malariaendemischen Afrika nur durch niedriges Geburtsgewicht aufgrund von PAM verursacht [87]. Malaria erhöht in Gebieten mit hoher Transmission auch das Risiko für eine Frühgeburt [164], wobei eine Infektion während der Schwangerschaft mehr zu IUGR und eine Infektion bei Geburt mehr zu einer Frühgeburt prädisponieren zu scheitert [238]. Alle Faktoren erhöhen im Endeffekt die Rate der Säuglingssterblichkeit - die perinatalen Mortalitätsraten sind in malariaendemischen Ländern signifikant erhöht [259]. Wenn eine Schwangere symptomatische Malaria entwickelt, handelt es sich häufiger als außerhalb der Schwangerschaft um schwere Malaria und fetale sowie mütterliche Mortalität sind häufig [270].

### **1.5.2 Pathogenese der Plazentaren Malaria**

In der Schwangerschaft ergibt sich durch das neue Organ der Plazenta für die Parasiten eine Möglichkeit den Immunzellen in der Zirkulation und der Passage durch die Milz zu entgehen. Die periphere Parasitämie ist gewöhnlich sehr viel geringer als die Parasitämie in der Plazenta [30, 264] und es wurden auch verschiedene Plasmodiengenotypen in Plazenta und Peripherie gefunden [213, 214]. Bestimmte befallene Erythrozyten können nämlich an Chondroitinsulfat A des Synzytiotrophoblasten der Plazenta binden und dort sequestriert werden. Diese binden über die duffy binding-like (DBL- $\gamma$ 3) Domäne des *PfEMP1* [36, 198]. CSA-bindende Parasitenklone werden möglicherweise nur während der Schwangerschaft selektiert und verursachen dann plazentare Malaria. Sie binden keine der anderen Rezeptoren und sind bei nichtschwangeren Patienten nicht nachzuweisen [78].

Besonders Primigravidae sind von Malaria betroffen - sie entwickeln eine Parasitämie häufiger und ausgeprägter als Multigravidae [29] und sind auch von den Folgen wie Anämie [155] und Säuglingssterblichkeit in einem höheren Maß betroffen [231]. Dieser Unterschied in der Immunität zwischen Primi- und Multigravidae lässt sich zumindest teilweise erklären durch die Tatsache, dass bei Multigravidae Antikörper gegen CSA-bindende Parasiten gefunden wurden, die Primigravidae fehlen. Diese Antikörper scheinen erst in subsequenten Schwangerschaften die Bindung parasitierter Erythrozyten an das CSA und damit die Sequestration der Parasiten in der Plazenta zu verhindern [80].

### **1.6 Immunologie von *Plasmodium falciparum***

Die Immunität gegenüber Parasiten ist viel komplexer als die gegenüber Viren oder Bakterien, da sie viele verschiedene Antigene und eine komplexe genetische Struktur haben und sich optimal an den Wirt angepasst haben [132]. Die entstehende Immunität ist oft zeitlich begrenzt. Bei *P. falciparum* wird unterschieden zwischen klinischer Immunität, die trotz vorhandener Parasitämie vor den klinischen Symptomen von Malaria schützt, und antiparasitärer Immunität, die die Parasitämie verringert [19, 217]. Anscheinend entwickelt sich die klinische Immunität in drei Stadien: Zuerst gegenüber der lebensbedrohlichen Ausprägung von Malaria, dann gegenüber der symptomatischen Infektion und schließlich eine partielle Immunität gegenüber der Parasitämie an sich [104, 216, 217]. Einige Autoren unterscheiden im Hinblick auf diese Entwicklung nur die klinische Immunität und die antiparasitäre Immunität [200]. Selbst in holoendemischen Gebieten lebende Patienten entwickeln nie eine vollständige sterile antiparasitäre Immunität [217, 251]. Die immunologischen Vorgänge im Zusammenhang mit *P. falciparum* sind äußerst komplex und noch nicht vollständig bekannt. Es scheint sich um eine stadienspezifische und stammspezifische Immunität zu handeln [38, 151, 265]. In jeder Phase der Infektion - ob gegenüber Sporozoiten, dem Leberschizonten, den Merozoiten, dem intraerythrozytischen Stadium oder den Gametozyten - ist das

Immunsystem unterschiedlichen Antigenen ausgesetzt und reagiert möglicherweise mit verschiedenen Immunantworten. Durch die Polymorphismen und Antigenvariation der Plasmodien werden diese Antworten noch komplexer [49, 121]. Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem spielen bei der Reaktion auf Malaria eine Rolle. Individuen müssen laufend Malaria exponiert sein, um Immunität aufrechtzuerhalten [217]. Auch Mechanismen der Toleranz gegenüber Toxinen spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Reaktion des menschlichen Organismus auf Plasmodien [217].

### 1.6.1 Natürliche Resistenz

Einige genetische Faktoren schützen vor einer Erkrankung mit *P. falciparum*, wenn es sich dabei auch nicht um Bestandteile des Immunsystems im eigentlichen Sinn handelt. Schon 1949 stellte Haldane die Malaria Hypothese auf, die besagte, dass die geographische Verteilung der Thalassämien mit der der Malaria übereinstimmt, weil heterozygote Merkmalsträger wohlmöglich durch einen Überlebensvorteil gegenüber Malaria selektiert würden [88]. Dieser müsste den Nachteil für die Homozygoten ausgleichen, so dass das Merkmal in der Bevölkerung erhalten bleibe. Inzwischen gibt es Bestätigungen in Form von Populationsstudien für eine solche Annahme, die auch auf andere Hämoglobinopathien ausgeweitet werden kann, auch wenn die Mechanismen im Einzelnen oft nicht bekannt sind [16, 265]. Unter den Hämoglobinopathien stellen vor allem die Sichelzellenanämie und die Ovalozytose [270], sowie möglicherweise die Thalassämien einen Schutz vor Malaria dar [265]. Die Plasmodien scheinen die betroffenen Erythrozyten unter niedrigerer Sauerstoffspannung schlechter invadieren zu können und sich in diesen schlechter zu vermehren [81, 183].

Es gibt Hinweise, dass auch der Glukose-6-Phosphatdehydrogenasemangel durch Malaria selektioniert sein könnte. Das Gen für G6PD liegt auf dem X-Chromosom und das fehlende Enzym ist entscheidend in der Produktion von NADPH. Für diesen Enzymmangel heterozygote Frauen und hemizygoten

Männer sind beide von schwerer Malaria seltener betroffen [208]. Auch bei den HLA-Genen, die Oberflächenmoleküle als Bestandteil des Immunsystems codieren, wird vermutet, dass sie durch Infektionserreger einer natürlichen Selektion unterlagen. HLA-Klasse-I-Antigen HLA-Bw53 und ein HLA-Klasse-II-Haplotyp (DRB\*1302-DQB1\*0501), die vorwiegend in Westafrika vorkommen, schützen vor schwerer Malaria [96]. HLA-B53-positive zytotoxische T-Zellen erkennen LSA-1 (liver-stage-specific antigen-1) der exoerythrozytären Parasitenstadien und scheinen die Grundlage dieser Resistenz zu bilden [97].

Auch Polymorphismen von bestimmten Genen, die mit dem Immunsystem assoziiert sind, scheinen einen Einfluss auf die klinische Ausprägung von Malaria zu haben - im Fall von einigen Polymorphismen des Gens für das Zytokin TNF- $\alpha$  ist der Träger für zerebrale Malaria anfälliger. Viele andere solcher Polymorphismen werden auf ihren Einfluss auf Malaria hin untersucht [131, 159, 203, 233].

### **1.6.2 Erworbene (spezifische) Immunität**

Bei der erworbenen Immunantwort handelt es sich um Mechanismen, die gegen bestimmte Antigene der eindringenden Erreger gerichtet sind und damit spezifisch sind. Sowohl B-Zellen - als Lymphozyten, die im Knochenmark differenzieren - als auch T-Zellen, bei denen es sich um differenzierte Lymphozyten aus dem Thymus handelt, sind Teil der spezifischen Immunantwort. Nach der unspezifischen Phagozytose oder Pinozytose von Antigenen der Parasiten hauptsächlich durch dendritische Zellen präsentieren diese antigenpräsentierenden Zellen (APC) den T-Zellen in den Lymphknoten die Antigene an ihrer Oberfläche [119]. Sie werden über MHC-Klasse II Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplex) des HLA-Systems präsentiert, die auf allen APC vertreten sind. Nur APC wie dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen können bei der Präsentation der Antigene auch co-stimulierende Signale senden. Dadurch werden naive B- und T-Zellen, die den Rezeptor für das jeweilige Antigen tragen, aktiviert [117].

### 1.6.2.1 Zelluläre Immunität vermittelt durch T-Lymphozyten

Naive T-Zellen, die zwischen Blutkreislauf und Lymphorganen pendeln, mustern die Oberfläche der APC nach einem von MHC präsentem Antigen, für das ihr jeweiliger T-Zellrezeptor spezifisch ist. Die T-Zellrezeptoren einer T-Zelle können durch klonale Selektion jeweils nur ein Antigen erkennen. Nach der Aktivierung naiver T-Zellen durch Erkennung des Antigen und Co-stimulation proliferieren diese und differenzieren zu T-Effektorzellen oder T-Gedächtniszellen. Gedächtniszellen führen bei einer erneuten Infektion zu einer schnelleren spezifischen Immunantwort. Effektorzellen aktivieren B-Zellen und Makrophagen und weisen veränderte Zelladhäsionsmoleküle auf. Sie exprimieren zum Beispiel die CD45RO-Isoform, was auf ihre Aktivierung hinweist [113]. Aktivierte Makrophagen bauen die schon phagozytierten Erreger mit ihren Phagosomen effizienter ab [117].

Unter den T-Effektorzellen gibt es CD8-T-Zellen, die zytotoxisch sind, und CD4-T-Zellen, die als Helferzellen entweder zu  $T_H1$ -Zellen oder  $T_H2$ -Zellen differenzieren und andere Zellen aktivieren. CD8-positive T-Zellen erkennen Antigene, die über MHC-Klasse I Moleküle präsentiert werden. MHC-Klasse I Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und präsentieren hauptsächlich Antigene aus dem Zytosol. Zytotoxische Zellen können lytische Granula an einer so gebundenen Zelle freisetzen, die diese zerstören: Perforin polymerisiert zu Poren in der Membran der Zielzelle und Granzyme sind Serinproteasen, die in der Zielzelle eine Enzymkaskade anstoßen. Phagozyten in der Umgebung erkennen, dass sich die Zellmembran verändert hat und phagozytieren die angegriffenen Zellen. CD4-positive T-Zellen dagegen erkennen Antigene, die über MHC-Klasse II Moleküle präsentiert werden, die es nur auf APC gibt. Daher handelt es sich um phagozytierte Antigene.  $T_H1$ -Zellen aktivieren als Reaktion auf intrazelluläre Erreger hauptsächlich Makrophagen und das zelluläre Immunsystem, während  $T_H2$ -Zellen nach Erkennung extrazellulärer Antigene B-Zellen aktivieren und damit die humorale Immunantwort stärken [117].

Eine zellvermittelte Immunität gegenüber *P. falciparum*, die CD4- und CD8-T-Zellen und Zytokinproduktion involviert, kann durch niedrig dosierte Infektion mit infizierten Erythrozyten hervorgerufen werden [190]. Dass bestimmte HLA-Klasse-I-Antigene einen Schutz vor Malaria gewährleisten, deutet schon darauf hin, dass CD8-T-Zellen eine Rolle bei der Immunität gegenüber *P. falciparum* spielen [215]. Da Erythrozyten keine MHC-Moleküle zum Präsentieren der Parasitenantigene besitzen, lösen die intraerythrozytären Plasmodienstadien kaum eine zytotoxische T-Zellreaktion aus. Die Hepatozyten, die von den Sporozoiten zuerst invadiert werden, sind davon allerdings betroffen [270].

Die erythrozytären Stadien werden von CD4-T-Zellen bekämpft [83]. Diese Lymphozyten können Plasmodien *in vitro* töten [70] und die parasitenspezifische lymphoproliferative Antwort von Einwohnern endemischer Gebiete *in vitro* korreliert mit klinischer Immunität [172]. Bei immunsupprimierten Mäusen können transferierte antigenspezifische CD4-T-Zellen Plasmodien reduzieren aber nicht eliminieren [98, 246]. Im Mausmodell zeigt sich in den ersten 14 Tagen der erythrozytären Infektion eine T-Zellantwort vom T<sub>H</sub>1-Typ und dann nach drei Wochen mehr eine T<sub>H</sub>2-Antwort. Es scheint also, dass die initiale Antwort antikörperunabhängig ist, für die vollständige Beseitigung der Infektion aber eine humorale Immunantwort benötigt wird [134, 243, 245]. Auch im Menschen gibt es Hinweise, dass sowohl T<sub>H</sub>1-Zellen als auch T<sub>H</sub>2-Zellen während einer Plasmodieninfektion aktiviert sind [243].

Dass allerdings eine Co-Infektion mit HIV den Verlauf von Malaria in den initialen Studien kaum beeinflusste, sprach zunächst eher gegen einen wichtigen Anteil der T-Helferzellen an der Elimination von Plasmodien [85, 199]. Neuere Studien haben einen Zusammenhang zwischen der HIV-Infektion und höheren Parasitämien bzw. mehr klinischer Malaria beschrieben [77, 86, 271]. Geringere CD4-T-Zellmengen durch eine HIV-Infektion gehen zudem mit geringerer Zytokinproduktion einher und mit Zerstörung von T-Gedächtniszellen [175].

Bei akuter Malaria mit hohen Parasitämien im Menschen ist jedoch die parasitenspezifische zelluläre Immunantwort beeinträchtigt - durch Leukopenie und funktionelle Beeinträchtigung [32, 100]. Die anscheinende Leukopenie könnte damit erklärt werden, dass die antigenspezifischen und aktivierten T-Zellen sequestriert sind und deshalb bei Blutabnahmen aus dem peripheren Blut nicht gemessen werden [253].

Eine überschießende Immunreaktion scheint zur Pathogenese der schweren Krankheitsausprägung beizutragen [203]. Zu den regulatorischen T-Zellen, die diese überschießende Reaktion verhindern sollen, gehören endogene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen und T<sub>H3</sub>-, T<sub>R1</sub>- und CD8-T<sub>reg</sub> Zellen. Ihre Wirkung wird über verschiedene Zytokine vermittelt, unter anderem über IL-10 [35].

#### **1.6.2.2 Humorale Immunität vermittelt durch B-Lymphozyten**

B-Zellen erkennen hauptsächlich extrazelluläre Antigene mit ihren Antigenrezeptoren, bei denen es sich um Antikörper (Immunglobuline) handelt. Nach ihrer Aktivierung produzieren und sezernieren sie diese Antikörper ins Blut. Durch die Immunglobuline können Antigene wie Toxine neutralisiert, Krankheitserreger opsonisiert oder das Komplementsystem aktiviert werden, um die Erreger letztendlich meist über Phagozytose zu entfernen [35]. Bei Immunglobulinen handelt es sich um Glykoproteine. Die verschiedenen Formen der Immunglobuline haben unterschiedliche Funktionen, im Serum kommen vor allem IgG, aber auch IgM und IgA vor. Von IgG gibt es vier Subklassen (IgG1 bis IgG4), die sich anhand ihres Aufbaus unterscheiden [116].

Im Fall von akuter Malaria ist eine polyklonale B-Zellaktivierung und Hypergammaglobulinämie bekannt, möglicherweise zu verstehen als eine Manipulation des Immunsystems durch den Parasiten [57]. Während einer akuten Plasmodieninfektion produzieren Menschen aber auch spezifische Antikörper gegen Antigene dieser Parasiten [37, 151]. Durch Gabe von Immunglobulin (IgG) immuner Individuen an nichtimmune Infizierte können Parasitämien verringert werden und es ist eine klinische Besserung zu

beobachten [27, 45]. Im Modell zeigt sich allerdings, dass B-Zell-Depletion bei Mäusen nur eine Veränderung in der chronischen Phase der Infektion bewirkt, was darauf schließen lässt, dass auch andere Mechanismen daran beteiligt sind, eine Plasmodieninfektion zu eliminieren [233]. Es wurden Antikörper gegen verschiedene Plasmodienantigene nachgewiesen. Unter anderem gehören dazu PfEMP1 [37], MSP-1 [351, 363, 393], MSP-2 [281], MSP-3 [178], GPI [174, 187, 203] und CSP (circumsporozoite antigen) [103].

### **1.6.3 Angeborene (unspezifische) Immunität**

Die angeborene Immunität umfasst Mechanismen, die gegen jedes Antigen in gleicher Weise eingesetzt werden. Sie sind immer bereit, Krankheitserreger unspezifisch abzuwehren und umfassen Zellen wie die antigenpräsentierenden Zellen (APC) Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Dazu kommen außerdem neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, NK-T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Makrophagen und neutrophile Granulozyten können mit ihren Oberflächenrezeptoren allgemeine Merkmale von Infektionserregern erkennen und sie phagozytieren [185, 258]. Komplementär führt das Komplementsystem durch eine Proteinkaskade auf der Oberfläche von Bakterien zur Proteolyse. Zytokine tragen zum Entstehen einer Entzündung bei und Chemokine locken weitere Zellen zum Entzündungsherd. Diese Reaktionen bekämpfen die Krankheitserreger so lange, bis die erworbene Immunantwort bereit ist, die Erreger spezifisch anzugreifen [114]. Bei Malaria limitieren angeborene Immunmechanismen die maximale Parasitendensität nach einer Hypothese, für die es einige Bestätigungen in epidemiologischen Studien gibt. Sie werden danach bei Überschreiten einer bestimmten Parasitendichte immer wieder getriggert und können so die Parasitämie kontrollieren, bis die spezifische Immunität die Parasiten ganz eliminieren kann [233].

#### **1.6.3.1 NK-Zellen**

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind CD3-negative Lymphozyten und könnten als Teil des angeborenen Immunsystems die Initiatoren einer Kaskade von angeborenen Immunmechanismen gegen Malaria sein [233]. Sie sind bei

der Reaktion auf prä-erythrozytäre Stadien der Plasmodien bei Mäusen impliziert worden [58]. Gegenüber *P. falciparum* infizierten Erythrozyten wurde eine lytische Aktivität menschlicher NK-Zellen *in vitro* festgestellt [180], die unter anderem durch Granzym B vermittelt wird [153]. Zytotoxische Aktivität wurde gemessen, wenn die Parasiten zuerst in die Zirkulation entlassen werden [94]. Zumindest in Mäusen scheint dieser zytotoxische Effekt der NK-Zellen gegenüber den infizierten Erythrozyten allerdings nicht zur Eindämmung einer Infektion mit *P. chabaudi* beizutragen, hier ist der hauptsächliche Effekt über IFN- $\gamma$  vermittelt [169]. In Abwesenheit von NK-Zellen erreichen die Parasitämien in Mäusen aber höhere Maximalwerte, sie tragen also zur Immunabwehr bei [233]. NK-Zellen scheinen zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem zu stehen. Sie werden nur in Gegenwart von Monozyten oder dendritischen Zellen durch Plasmodien aktiviert, um IFN- $\gamma$  zu produzieren. NK-Zellen sind teilweise für die Produktion der ersten frühen Welle von IFN- $\gamma$  als Reaktion auf Plasmodien verantwortlich [18, 51]. IFN- $\gamma$  vermittelt unter anderem die Differenzierung von T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen und beeinflusst so die spezifische Immunantwort [25, 218].

### 1.6.3.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Unter den CD3-positiven T-Zellen gibt es neben CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen und den CD4-positiven T-Helferzellen unter anderem auch noch CD4- und CD8-negative T-Zellen. Sie besitzen einen T-Zellrezeptor der keine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sondern eine  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette besitzt und machen weniger als 5 % der im Blut zirkulierenden T-Zellen aus. Im Gewebe sind diese  $\gamma\delta$ -T-Zellen besonders in Schleimhäuten von Gastrointestinal- und Fortpflanzungstrakt konzentriert. Ihre Funktion ist nicht endgültig geklärt [113, 114], sie scheinen aber eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität zu bilden [233]. Es gibt Vermutungen, dass sie eine Art Wächterfunktion an den mukösen Oberflächen haben [209] und sie scheinen vor allem eine Rolle bei intrazellulären Pathogenen zu spielen [258]. Im Fall von *P. falciparum* können  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine Parasitämie zwar nicht allein bekämpfen [135], könnten aber möglicherweise eine immunregulatorische Rolle einnehmen [209].  $\gamma\delta$ -T-Zellen

sind bei Erwachsenen mit keiner vorherigen Exposition zu Malaria während einer ersten akuten Infektion mit *P. falciparum* und bis zu vier Monate danach erhöht [101, 110, 207]. Diese Zellen werden vor allem durch Parasiten im Schizontenstadium stimuliert [84], allerdings besser durch lebende Schizonten als durch Lysat, mit welchem sich vor allem  $\alpha\beta$ -T-Zellen stimulieren lassen [268].  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind die hauptsächlichen Produzenten von IFN- $\gamma$  in PBMC-Kulturen, die mit Schizontenlysat stimuliert wurden [51, 84]. Außerdem produzieren sie als Reaktion auf Stimulation vor allem TNF- $\alpha$ , sowie TGF- $\beta$  und GM-CSF und geringe Mengen von IL-2, sowie IL-4, IL-5 und IL-10 [84, 133, 135]. *In vitro* können  $\gamma\delta$ -T-Zellen das Wachstum der Parasiten inhibieren, anscheinend sind sie vor allem für die Merozoiten durch direkten Kontakt zytotoxisch [63, 254]. Diese Zytotoxizität wird über die Exozytose Granulysin enthaltender Vesikel und Perforin vermittelt [56, 69].

#### 1.6.4 Zytokine

Zytokine spielen sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem eine Rolle. Die  $T_H1$ - und die  $T_H2$ -Zellen werden anhand ihrer Zytokine unterschieden, pro-inflammatorische  $T_H1$ -Zellen produzieren vor allem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2, während anti-inflammatorische  $T_H2$ -Zellen unter anderem IL-4, IL-5, IL-10 und TGF- $\beta$  produzieren [117, 134].

Ein wichtiges Ergebnis der frühen Interaktion des angeborenen Immunsystems mit Plasmodien scheint die Produktion immunregulatorischer Zytokine wie IL-12 und IFN- $\gamma$  zu sein, die andere Zellen des angeborenen Immunsystems sowie T- und B-Zellen aktivieren [258]. IFN- $\gamma$  ist in Mausmodellen für Malaria kurz vor der höchsten Parasitämie erhöht, bleibt dann aber auch während Rekrudescenzen auf einem niedrigen Niveau [243]. Das Zytokin scheint also in der Kontrolle der höchsten Parasitämie eine Rolle zu spielen. IFN- $\gamma$  wird im Rahmen von Malaria im Menschen zuerst von NK-Zellen gebildet [18], dann von  $\gamma\delta$ -T-Zellen und schließlich auch von  $\alpha\beta$ -T-Zellen [19]. IFN- $\gamma$  steuert die Differenzierung von T-Zellen hin zu hauptsächlich  $T_H1$ -Zellen und verursacht den IgG Klassen-Switch. Außerdem induziert es die Bildung von Stickoxid,

reguliert die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und sorgt für die Aktivierung von Makrophagen [25]. IFN- $\gamma$  führt auch zur IL-12 Produktion, die wiederum über eine positive Feedback-Schleife NK-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Bildung anregt [281]. Daneben reguliert IFN- $\gamma$  das Wachstum von T<sub>H</sub>2-Zellen herunter [25]. Das richtige Zytokinegleichgewicht scheint über Pathologie oder Schutz vor Malaria zu entscheiden, wobei die pro-inflammatorischen Zytokine wie IFN- $\gamma$  früh in der Infektion schützen, beim Überwiegen zu einem späteren Zeitpunkt jedoch die Pathologie verstärkt wird [281]. Damit es nicht zu einer überschießenden Makrophagenaktivierung kommt, wird die inflammatorische Reaktion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen wie IL-4, IL-10 oder TGF- $\beta$  blockiert und die Antikörperproduktion angeregt [19].

IL-10 wird außer von T<sub>H</sub>2-Zellen auch von Monozyten und B-Zellen produziert und inhibiert bei der *P. falciparum* Malaria die proinflammatorische Zytokinproduktion [281], anscheinend durch negatives Feedback [99]. Unter anderem geschieht dies durch Inhibition der Aktivierung von NK-Zellen [176]. Höhere IL-10 Konzentration wurde bei Kindern mit schwerer Malaria, schlechterer Parasitenclearance und Hyperparasitämie gefunden [107, 145, 186].

#### **1.6.5 Modell für Immunantwort bei *P. falciparum* Malaria**

Als eine Möglichkeit, wie die verschiedenen Arme des Immunsystems als Antwort auf *P. falciparum* zusammenarbeiten, haben Urban *et al.* folgendes Modell beschrieben [258]: Dendritische Zellen werden durch infizierte Erythrozyten aktiviert, reifen und sezernieren die Zytokine IFN- $\alpha$ , IL-12, TNF- $\alpha$ . Dadurch werden NK-Zellen aktiviert, die IFN- $\gamma$  produzieren, welches wiederum das Monozyten-Makrophagen-System zur Phagozytose und NO-Bildung aktiviert. Die APC präsentieren die Parasitenantigene den T-Zellen, die sich unter dem pro-inflammatorischen Zytokineinfluss zu T<sub>H</sub>1-Zellen wandeln. Allmählich werden sie allerdings durch das akkumulierende Hämозoin paralytisiert (siehe 2.5.1.3). In der Milz adhären sie gleichzeitig über CD36 und produzieren IL-10, welches die Zytokinbalance zu einer anti-inflammatorischen Antwort verschiebt. IL-10 stimuliert aber auch B-Zellen, so dass diese das

zytophile IgG1 und IgG3 herstellen. Durch die humorale Komponente kann die Parasitämie endgültig kontrolliert werden. Da durch die Antigenvariation immer einige Parasiten der Immunantwort entkommen, beginnt der ganze Prozess dann von vorne mit den neuen Antigenen. Bei Mäusen wurde bereits gezeigt, dass T<sub>H</sub>1-Zellen die akute Parasitämie bekämpfen können, aber B-Zellen benötigt werden, um die Parasiten vollständig zu eradizieren [244].

### **1.6.6 Immunologie der Malaria in der Schwangerschaft**

#### **1.6.6.1 Allgemeine Immunologie in der Schwangerschaft**

Da die Schwangere durch den Fetus mit einem Allograft mit fremden Antigenen konfrontiert ist, müssen antigen-spezifische Immunantworten während der Schwangerschaft supprimiert werden, um den fetoplazentaren Allograft zu ermöglichen. Dies zeigt sich unter anderem in einer transienten Suppression der zellulären Immunität [179]. Auch die erhöhte Hormonproduktion von Östrogen und Cortisol in der Schwangerschaft scheint das Immunsystem durch Suppression der zellulären Immunität zu beeinflussen [163, 179, 191].

Allgemein scheinen aber in der Schwangerschaft die Mechanismen der angeborenen Immunität gegenüber der erworbenen Immunität zu überwiegen [160]. In der Plazenta sind grundsätzlich keine NK-Zellen zu finden [181, 241]. Es lässt sich aber eine Zunahme zirkulierender regulatorischer CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Schwangerschaft nachweisen, die die Aktivierung von dendritischen Zellen, CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen und B-Zellen *in vitro* inhibieren können [17, 227, 252]. Zu weiteren Mechanismen, die den fetalen Allograft ermöglichen, gehören die fehlende Expression von klassischen MHC-Klasse I Molekülen und von MHC-Klasse II Molekülen auf plazentaren Trophoblastzellen. Stattdessen wird hauptsächlich HLA-G exprimiert, welches die Aktivierung von NK-Zellen inhibiert [17, 108, 252].

Viele Hinweise aus dem Mausmodell und Untersuchungen am Menschen deuten darauf hin, dass Schwangerschaft ein T<sub>H</sub>2-Phänomen ist: Es scheint,

dass in der Schwangerschaft die zelluläre Immunantwort unterdrückt wird und die humorale Immunität überwiegt. T<sub>H</sub>1-Zytokine wie IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF und auch dadurch aktivierte NK-Zellen sind schädlich für den Fetus. T<sub>H</sub>2-Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 unterstützen dagegen die B-Zellentwicklung und IL-10 kann auch direkt T<sub>H</sub>1-Zytokinsynthese inhibieren [240, 269]. Die Entscheidung für den T<sub>H</sub>2-Weg wird also durch IL-10 und auch durch TGF- $\beta$  und Progesteron beeinflusst [30]. Möglicherweise wird die normale Entbindung unterstützt durch eine schnelle Umkehr der T<sub>H</sub>2-Zytokinbasis hin zu zellulären Mechanismen, die bei der Ablösung der Plazenta eine Rolle spielen könnten [269].

#### 1.6.6.2 Immunologie der PAM

Vor allem Primigravidae sind unter den Schwangeren in holoendemischen Gebieten anfällig für eine Infektion mit *P. falciparum*. Obwohl die lymphoproliferative Antwort auf Antigene in der Schwangerschaft allgemein geringer ausfällt [71, 201], zeigen Multigravidae bei Stimulation eine stärkere Lymphozytenproliferation und zytotoxische Aktivität von NK-Zellen als Primigravidae [28, 74, 196]. Zusätzlich ist die lymphoproliferative Reaktion plazentarer Zellen auf verschiedene Antigene geringer als die des peripheren Blutes [197]. Die Abwesenheit von NK-Zellen in der Plazenta könnte die Clearance der Parasiten negativ beeinflussen [181]. Auch im peripheren Blut ist während der Schwangerschaft die Aktivität von NK-Zellen vermindert [20]. Es gibt einen nichtopsonisierenden phagozytischen Defekt für CSA-bindende Parasiten im angeborenen Immunsystem: Sie werden zu einem geringeren Anteil als CD36-bindende Parasiten phagozytiert [221]. Diese Beobachtung trägt möglicherweise zur Akkumulation der Parasiten in der Plazenta bei.

Eine der hauptsächlichen Erklärungen der epidemiologischen Charakteristika von PAM scheint in der Produktion von Antikörpern gegen CSA-bindende Parasiten zu liegen. Im Gegensatz zu ersten Studien, die darauf hinwiesen, dass die Ausbildung von diesen Antikörpern erst nach der ersten Schwangerschaft geschehe [80], zeigen andere Studien, dass sowohl Primigravidae als

auch Multigravidae zum Geburtstermin Adhäsion-blockierende Antikörper besitzen [177]. Allerdings beginnen Multigravidae mit deren Produktion früher in der Schwangerschaft - nach nur 12 Wochen der Gestation, während es bei Primigravidae noch 8 Wochen länger dauert. Antikörper, die die Bindung zu CSA inhibieren, verleihen Schutz vor PAM [177, 242], bei Primigravidae konnte allerdings keine Korrelation zwischen CSA-bindenden Antikörpern und geringerer PAM festgestellt werden [48]. Diese Antikörper sind aber assoziiert mit einem verbessertem Ergebnis der Schwangerschaft so wie höherem Geburtsgewicht und Gestationsalter der Neugeborenen und weniger maternaler Anämie [59, 230].

Auch die Zytokinproduktion verändert sich durch PAM: Die während der Schwangerschaft vorherrschende  $T_H2$ -Zytokinproduktion wird bei placentarer Malaria zu einem  $T_H1$ -Schwerpunkt in der Plazenta verlagert, mit hauptsächlichlicher Produktion inflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 [22, 30, 72, 79]. IFN- $\gamma$  inhibiert dann die Produktion von IL-10 [30]. Chemokine, produziert von Makrophagen der Plazenta, locken mehr Immunzellen in die intervillösen Räume [237]. In der Plazenta ist TNF- $\alpha$  bei PAM erhöht [72], was einhergeht mit einem schlechtem Ergebnis für die Schwangerschaft [170, 179, 205]. Hohe IFN- $\gamma$  Konzentrationen wurden in einer Studie ebenso mit niedrigem Geburtsgewicht assoziiert [79]. Auch wenn IL-10 wichtig scheint, um die übermäßige inflammatorische Zytokinproduktion einzudämmen, ist vermehrte IL-10 Produktion bei PAM ein Risikofaktor für Frühgeburten [236].

HIV-positive Schwangere sind anfälliger für PAM (erhöhte Parasitämien peripher sowie auch placentar ebenso wie die bekannten Folgen für die Kinder), was besonders für Multigravidae gilt, die nicht die sonst übliche Immunität gegenüber PAM entwickeln [199, 232, 248, 261]. Möglicherweise beruht diese Beobachtung darauf, dass diese weiter fortgeschrittene HIV Infektionen aufweisen oder dass Primigravidae allgemein schon von PAM gefährdet sind, unabhängig vom HIV Status [109]. Zudem ist bei einer HIV-Infektion in der Schwangerschaft die humorale Antwort auf Malariaantigene beeinträchtigt, die

Auswirkung auf Multigravidae lässt sich also dadurch erklären, dass die bereits erworbenen Antikörper gegen CSA-bindende Parasiten sie nicht mehr effizient schützen [109, 175, 199].

### **1.6.7 Neonatale Immunologie von Malaria**

#### **1.6.7.1 Allgemeine Immunologie des Neugeborenen**

Beim weißen Neugeborenen finden sich mehr Leukozyten, Lymphozyten, NK-Zellen und B-Zellen als beim Erwachsenen [50, 68, 90]. Das Immunsystem des Neugeborenen scheint aber in verschiedenen Aspekten im Gegensatz zum Erwachsenen unreif. Zu dessen Erforschung wird seit Jahren Nabelschnurblut eingesetzt, da es die Entnahme größerer Blutmengen ermöglicht. Zum einen gibt es bei der Antikörperantwort im Neugeborenen quantitative und qualitative Unterschiede zum erwachsenen Immunsystem [224]. Zum anderen ist auch die zytotoxische Aktivität geringer, wofür sowohl  $\gamma\delta$ -T-Zellen als auch CD8-T-Zellen verantwortlich scheinen [14, 20, 24, 171]. Auch NK-Zellen scheinen bei Neugeborenen eine geringere Aktivität aufzuweisen [20, 24, 82]. Zudem herrscht ein Mangel an Komplementkomponenten [142]. Neonatale Monozyten und Makrophagen sprechen weniger auf Aktivatoren wie IFN- $\gamma$  oder Mikroorganismen an und produzieren weniger  $T_H1$ -Zytokine, ebenso wie CD4-T-Zellen [150].

Die CD4- und CD8-T-Zellanteile an den Lymphozyten steigen erst mit dem Alter an [68, 90]. Neonatale T-Zellen reagieren zudem auf Stimuli schwächer als Erwachsene und benötigen für eine stärkere Reaktion mehr Co-Stimulation, können dann jedoch adulte Zytokinproduktion erreichen [14]. Zum Beispiel durch Zugabe von CD28 wird die Aktivierung neonataler T-Zellen verbessert [152]. Die geringere T-Zellfunktion - besonders Produktion von  $T_H1$ -Zytokinen - ist möglicherweise durch suboptimale APC-T-Zell-Interaktion im Neugeborenen erklärbar, wozu beitragen könnte, dass im Neugeborenen hauptsächlich unreife B-Zellen als APC funktionieren [14, 152, 224]. Fetale Monozyten exprimieren

auch weniger MHC-Klasse I Moleküle [142] und T-Zellen allgemein weniger Adhäsionsmoleküle [14].

Im Neugeborenen zeigt sich mit IL-6 und IL-10 eine Neigung zur T<sub>H</sub>2-Zytokinantwort [14, 89, 142, 152, 192], welches sich wahrscheinlich durch die potentiell negativen Auswirkungen von pro-inflammatorischen Zytokinen während der Schwangerschaft erklären lässt, wie IUGR und Fehlgeburten. IFN- $\gamma$  wird vermindert produziert [142]. Möglicherweise liegt dieser verstärkten T<sub>H</sub>2-Aktivität die vermehrte Apoptose von T<sub>H</sub>1-Zellen zugrunde [14].

Als eine Funktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen hat Hayday vorgeschlagen, dass sie infektabwehrende Funktionen haben, wenn  $\alpha\beta$ -T-Zellen nicht funktionell sind, wie bei fehlenden MHC-Molekülen zur Antigenpräsentation oder bei Neugeborenen, bei welchen die  $\alpha\beta$ -T-Zellen Funktion eingeschränkt ist [92].

#### **1.6.7.2 Neonatale Immunologie und PAM**

Neugeborene sind in den ersten Monaten ihres Lebens anscheinend immun gegenüber Malaria. Dieses Phänomen wurde teilweise durch Mechanismen der natürlichen Resistenz gegen Plasmodien erklärt, die durch die Muttermilch übertragen werden: Muttermilch erhält zum einen wenig p-Aminobenzoesäure, welches die Parasiten für ihre Replikation benötigen. Außerdem unterstützt das in der Muttermilch enthaltene TGF- $\beta$  zumindest bei Mäusen den Parasitenabbau [202]. Zudem scheint das fetale Hämoglobin einen Schutz vor Malaria zu gewähren: In Zellen mit HbF ist das Parasitenwachstum signifikant verlangsamt [184, 222]. Und da die HbF-Produktion von Heterozygoten für die  $\beta$ -Thalassämie im ersten Lebensjahr langsamer zurückgeht [21], ergäbe sich damit für Säuglinge mit dieser Anlage ein Selektionsvorteil, der auch die Prävalenz der Hämoglobinopathien in malariaendemischen Gebieten erklären könnte [184]. Dass allerdings Neugeborene von Müttern, die keine klinische Immunität gegenüber Malaria aufweisen, klinisch schwer an Malaria erkranken können, spricht gegen die ausschließliche Protektion durch physiologische Faktoren bei allen Neugeborenen [111].

Ein weiterer Mechanismus, der deshalb die temporäre Resistenz von Säuglingen gegenüber *P. falciparum* in den ersten Lebensmonaten erklären könnte, ist die *in utero* Übertragung schützender maternaler Immunglobuline von Müttern, die selber klinische Immunität besitzen [39, 111, 155, 202]. Solche plasmodienspezifischen Antikörper wurden bei Neugeborenen nachgewiesen [155, 202], aber der Zusammenhang zwischen diesen Immunglobulinen und tatsächlicher Protektion konnte noch nicht konsistent nachgewiesen werden [105, 111, 202]. Während dieser ersten Monate, in der mütterliche Antikörper vorhanden sind, könnte es den Säuglingen in Gebieten mit hoher Transmission durch die ständige Malariaexposition möglich sein, eine erste eigene Immunität aufzubauen [111].

In epidemiologischen Studien gibt es für das erste Lebensjahr Hinweise aus einem holoendemischen Gebiet in Kenia darauf, dass die Antikörperantwort gegen *P. falciparum* bei Neugeborenen von Müttern mit PAM vermindert ist [26]. PAM der Mutter unter der Geburt scheint Kinder im ersten Lebensjahr (4. bis 6. Monat) empfänglicher für Malaria zu machen; eine Beobachtung, die jedoch nicht mit Antikörperkonzentrationen korreliert werden konnte [137]. Eine andere Studie hat bestätigt, dass bei Kindern dieser Mütter weniger Zeit verstreicht bis zur ersten Malaria [47, 173]. Allerdings war die Wahrscheinlichkeit für Malaria in diesem Fall bei Nachkommen von Multigravidae häufiger als bei Primigravidae. Möglicherweise erklärt die Tatsache, dass Primigravidae normalerweise schon antenatal öfter Parasitämien aufweisen, diese Beobachtung, auch wenn bei Geburt PAM nicht nachgewiesen wurde. Die inflammatorische Antwort auf diese Infektion bei den Primigravidae könnte das Immunsystem der Feten beeinflussen oder weniger  $T_{reg}$ -Zellen induzieren, die sie weniger anfällig machen. Trotzdem scheint diese Beobachtung im Gegensatz zu der Tatsache zu stehen, dass bei Kinder von Primigravidae die perinatale Mortalität am höchsten ist [173].

Da sich sowohl IgM, welches normalerweise nicht transplazentar übertragen wird, als auch für Malariaantigene sensibilisierte B-Zellen und ebenso

Plasmodienbestandteile in der PCR im Nabelschnurblut haben nachweisen lassen, scheinen viele Neugeborene schon intrauterin und nicht erst durch Kontamination mit mütterlichem Blut während der Entbindung Malariaantigen ausgesetzt gewesen zu sein. Dabei muss es sich nicht unbedingt um infizierte Erythrozyten handeln, die die Plazentaschranke überschreiten, sondern möglicherweise auch um lösliche Antigene [61, 127, 147, 280]. Die Genotypen von Parasiten, die im mütterlichen und im Nabelschnurblut gefunden werden, sind des Öfteren diskordant, was gegen eine Kontamination mit mütterlichem Blut bei der Geburt spricht [125, 249].

Zudem lässt sich als Antwort auf Stimulation neonataler T-Zellen mit Malariaantigen Zytokinproduktion nachweisen [73, 127, 148, 196], was auf *in utero* priming dieser Zellen mit Plasmodienantigenen hinweist. Bei anderen parasitischen Infektionen der Mutter wurde eine Veränderung der Zytokinproduktion der Neugeborenen [260] und bei Filarien-, Onchocerca- und Schistosomiasisinfektionen eine Neigung hin zu einer  $T_H2$ -Zytokinantwort beobachtet [64, 95, 149]. Neugeborene von Müttern mit Filarien haben, ähnlich wie der Nachwuchs von Müttern mit PAM, ein höheres Risiko für Infektionen mit Filarien [95]. Auch Neugeborene aus nichtendemischen Gebieten reagieren auf Malariaantigene mit Lymphoproliferation, allerdings in sehr viel geringerem Ausmaß als diejenigen aus endemischen Gebieten [55].

Die Ergebnisse von Stimulation neonataler Zellen mit Malariaantigenen waren bisher nicht sehr einheitlich: In einer Studie in Kamerun wurde bereits eine im Vergleich mit Erwachsenen geringere Lymphoproliferation und Zytokinproduktion (IL-4, IFN- $\gamma$ ) im Nabelschnurblut nachgewiesen [73]. In Gambia war die Lymphoproliferation auf Malariaantigene dagegen bei Neugeborenen größer als bei deren Müttern. Die Neugeborenen, die bei der Geburt PAM ausgesetzt waren, reagierten jedoch mit weniger Lymphoproliferation auf Stimulation, wobei Erstgeborene noch niedrigere Proliferationsraten aufwiesen [196]. Die Unterschiede zwischen Neugeborenen von Müttern mit oder ohne PAM bei der Geburt waren bei den beiden Studien allerdings nicht signifikant. Auf

Stimulation mit MSP-1 Antigen wurde bei einer Studie bei Neugeborenen in Kenia ein hauptsächliches T<sub>H</sub>1-Zytokinprofil mit IFN- $\gamma$ -Produktion festgestellt (36%) [127]. In einer weiteren Studie in Kenia wurden verschiedene Antigene zur Stimulation benutzt, auf die 66% der CBMCs reagierten. Hier wurden drei verschiedene Zytokinprofile bei Neugeborenen festgestellt: 38% produzierten ein T<sub>H</sub>1-Zytokinprofil (IFN- $\gamma$  und/oder IL-2), 38% ein T<sub>H</sub>2-Profil (IL-5 und/oder IL-13) und 24% eine gemischte Zytokinproduktion, während die Mütter hauptsächlich ein T<sub>H</sub>1-Zytokinprofil zeigten. Insgesamt produzierten CBMCs im Gegensatz zur vorangegangenen Studie mehr T<sub>H</sub>2-Zytokine [148]. Neugeborene von Müttern mit PAM bei der Geburt waren fast zweimal so häufige Zytokinproduzenten wie die anderen. Neugeborene von Multigravidae und Müttern, die bei der Geburt keine PAM hatten, zeigten eher ein T<sub>H</sub>2-Profil, während der Nachwuchs von Primigravidae und Müttern, die bei der Geburt PAM hatten, wiederum eher ein T<sub>H</sub>1-Profil zeigte [148]. Dazu passt, dass PAM der Mutter im Neugeborenen anscheinend auch die schon beeinträchtigte Funktion der neonatalen APC verschlimmert, was in einer Studie in Gambia zu einer reduzierten Produktion von IL-12 und damit von IFN- $\gamma$  führte [112]. In einer anderen Studie in Kamerun zeigen die Neugeborenen von PAM-positiven Müttern bei Geburt auf Stimulation mit Schizontenlysate hin allerdings eher ein T<sub>H</sub>2-Profil [12]. Das gleiche galt für Neugeborene von Primigravidae. Die Autoren schlossen daraus, dass Neugeborene von PAM-infizierten Müttern durch diese T<sub>H</sub>2-Neigung eine höhere Anfälligkeit für Malaria hätten, da eine pro-inflammatorische Antwort essentiell sei, um die Parasitämie zu verringern. Da allerdings auch zur Pathogenese immunologische Mechanismen gehören könnten, ist es möglich, dass den Neugeborenen durch die *in utero* Exposition mit einem vorbereiteten Immunsystem auch ein Vorteil entsteht.

In Gabun haben vorangehende Studien folgende Ergebnisse gebracht: Nach unspezifischer Stimulation zeigten die Mütter mit behandelter Malaria in der Schwangerschaft und ihre Neugeborenen die höchste Rate an TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  produzierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Das galt bei CBMCs auch für CD3-T-Zellen und NK-Zellen. Im Gegensatz dazu wurden bei der Gruppe mit PAM im Vergleich

mit der negativen Gruppe die pro-inflammatorischen Zytokine auf einem gleichen Niveau oder weniger exprimiert [66]. Neugeborene von Müttern mit PAM zeigten vermehrte IL-10 produzierende T- Zellen und verminderte T<sub>H</sub>1-Zytokinproduktion (IFN- $\gamma$ ) nach Stimulation mit Parasitenantigenen [35].

### 1.7 Ziel dieser Arbeit

Das Verständnis besonders der neonatalen Immunität gegen *Plasmodium falciparum* ist essentiell für die Entwicklung einer Impfung, die auch bei Schwangeren und Säuglingen angewandt werden kann. Nach einer Hypothese von Rasheed von 1993 beeinflussen maternale Infektionen in der Schwangerschaft die Entwicklung des sich entwickelnden fetalen Immunsystems [195]. Anscheinend kann frühe Exposition des unreifen fetalen Immunsystems mit exogenen Antigenen in der Schwangerschaft immunologische Toleranz induzieren, die die Anfälligkeit für Infektionen erhöhen könnte. Im Gegensatz dazu scheint späte Exposition in der Schwangerschaft Immunantworten vor der Geburt zu primen und die Reaktion auf Impfungen zu verbessern [12].

Wie genau sich diese Zusammenhänge für *P. falciparum* darstellen, ist allerdings noch nicht geklärt. In dieser Studie wurden kurz nach Entbindung monozytäre Zellen aus dem peripheren Blut der Mütter ebenso wie aus dem Nabelschnurblut unspezifisch und auch mit Malariaantigenen stimuliert. Die Zytokine in den Zellen wurden in Abhängigkeit vom Malariastatus der Mutter gemessen - ob sie bei Geburt Malaria hatte, während der Schwangerschaft gegen Malaria behandelt wurde oder während der Schwangerschaft nie Malaria gehabt hatte. Wir hofften dadurch, den Effekt von PAM und deren Behandlung auf den Feten zu verstehen. Im Speziellen untersuchten wir den Einfluss der pränatalen Exposition mit Malariaantigenen auf die neonatale Immunantwort bei simulierter erneuter Exposition mit *P. falciparum*.

Dabei wurde auch die Reaktion der mütterlichen und neonatalen Immunzellen aus der Nabelschnur auf Stimulation verglichen, um die Kapazität des Neugeborenen zur Aktivierung und Zytokinproduktion zu messen. Außer der Messung verschiedener T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zytokine, haben wir Aktivierungsmarker und Marker für NK- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen bestimmt, um ein umfassendes Bild des Einflusses mütterlicher Malaria während der Schwangerschaft zu erhalten - betreffend sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem. Da Malaria in Gabun saisonalen Schwankungen ausgesetzt ist, wurde die Expression von Zytokinen und Oberflächenmarkern zudem in Beziehung zu den verschiedenen Jahreszeiten gesetzt. So sollte eine eventuelle jahreszeitliche Beeinflussung der Aktivierung von T-Zellen verifiziert werden.

## 2 Methodik

### 2.1 Studienort

#### 2.1.1 Geographie

Die Studie wurde am Laboratoire de Recherches des Albert Schweitzer Krankenhauses in Lambaréné, Gabun durchgeführt. Die Gabunesische Republik liegt im westlichen Zentralafrika am Äquator und grenzt an Äquatorialguinea, Kamerun, die Zentralafrikanische Republik und die Republik Kongo (Abb. 2.1). Im Westen wird das Land vom atlantischen Ozean begrenzt. Dreiviertel des Landes sind mit Regenwald bedeckt, der vom Fluss Ogooué mit seinen Seitenarmen durchzogen wird. Es herrscht tropisch heißes und feuchtes Klima mit einer Durchschnittstemperatur von 27 °C bei geringen Jahreschwankungen und einer Luftfeuchtigkeit von 80 bis 90% [272]. Die hauptsächlichste Regenmenge der durchschnittlich 2500 mm Niederschlag pro Jahr (in der Hauptstadt Libreville am atlantischen Ozean) fällt während der langen Regenzeit von Januar bis Mai.



Abbildung 2.1 Karte von Gabun [10]

Etwa 180 Kilometer südöstlich von Libreville im Landesinneren liegt die Stadt Lambaréné. Direkt am und im Fluss Ogooué gelegen, ist sie Hauptstadt der Provinz Moyen-Ogooué mit etwa 15.000 Einwohner.

Bei der Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen wurde mit den Entbindungsstationen des Hôpital Albert Schweitzer und des Hôpital général zusammengearbeitet. Das Hôpital général ist das öffentliche Provinzkrankenhaus und liegt im Stadtzentrum auf der Insel im Ogooué, während das Hôpital Albert Schweitzer ein privates Krankenhaus ist, das etwa 8 km vom Stadtzentrum entfernt am nördlichen Stadtrand und direkt am Fluss liegt. Die Studienteilnehmerinnen gaben als Wohnort Lambaréné oder die nähere Umgebung an. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen und des Ethikkomitees des Albert-Schweitzer-Krankenhauses befürwortet.

### 2.1.2 Epidemiologie

Gabun hat eine Bevölkerung von etwa 1,3 Mio.; der größte Teil stammt von der Volksgruppe der Bantu ab [10]. Die durchschnittliche Lebenserwartung bei Geburt beträgt 59,2 Jahre und Malaria ist für 2,1 % aller Todesfälle in Gabun verantwortlich [4].

In der Region um Lambaréné herrscht eine hyperendemische Übertragung, Malaria wird ganzjährig übertragen. Die hauptsächlichen Vektoren *Anopheles gambiae s.s.* und *Anopheles funestus* übertragen meist *Plasmodium falciparum*, in geringeren Mengen *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* [272]. Die durchschnittliche entomologische Inokulationsrate beträgt etwa 50 infektiöse Stiche pro Jahr [239]. Diese Arbeit befasst sich nur mit *Plasmodium falciparum*.

## 2.2 Rekrutierung

### 2.2.1 Einwilligung und Anamnese

Vom November 2002 bis zum September 2003 wurden 120 Studienteilnehmerinnen und ihre Neugeborenen in den beiden Krankenhäusern direkt nach der Entbindung durch informierte Einwilligung in die Studie eingeschlossen. Dazu wurden sie über das Ziel der Studie, sowie das Vorgehen und die Risiken aufgeklärt. Aufnahmekriterium war ein Aufenthalt im Endemiegebiet während der Schwangerschaft und eine Entbindung auf vaginalem Wege. Totgeburten wurden ausgeschlossen.

Von kindlicher Seite wurde das Geschlecht, das Geburtsgewicht und die Größe erhoben. Die Schwangerschaftsanamnese betreffend wurden außer Alter und Wohnort der Mutter auch die in dem "carnet de santé" (Mutterpass) während der Schwangerschaftsvorsorge vermerkten Daten erhoben. Dazu gehörten die Blutgruppe, die Parität und Gravidität, das Datum der letzten Regelblutung - also das Schwangerschaftsalter - und der Hämoglobinwert bei den Kontrollen. Besonders wichtig war die Anamnese hinsichtlich einer möglichen Malaria, ob diese dokumentiert - also über den Dicken Tropfen diagnostiziert - und behandelt wurde. Trotz weit verbreiteter Chloroquin-resistenter *P. falciparum* Stämme wird in Lambaréné zur Malariaprophylaxe in der Schwangerschaft weiterhin meistens Chloroquin *per os* verwendet - in einer Dosis von 2 x 300 mg pro Woche. Allerdings ist die Einnahme jeweils nur für die Wochen nach einer pränatalen Vorsorgeuntersuchung gewährleistet und daher oft sehr unregelmäßig.

### 2.2.2 Probengewinnung

Auf der Entbindungsstation wurden direkt nach der Geburt der Plazenta in Heparinröhrchen etwa 15 ml Nabelschnurblut aus der Nabelschnurvene entnommen, sowie ebensoviel peripher venöses Blut der Mutter. Unter sterilen Bedingungen wurde dann von den beiden Blutproben je 1 ml Vollblut und nach

Zentrifugierung 0,5 ml Erythrozytenkonzentrat aus dem Pellet entnommen und bei -80 °C für die weitere Analyse durch PCR eingefroren (siehe 2.3.2.2).

Außerdem wurde im Kreißsaal durch einen kleinen Schnitt in der mütterlichen Seite der Plazenta (Abscherfläche) der intervillöse Raum eröffnet und Plazentablut gewonnen, welches direkt für den Dicken Tropfen genutzt wurde. Bei der plazentaren Malaria kann die Diagnose durch alleinige mikroskopische Diagnostik des peripheren Blut ohne zusätzliche direkte Plazentablutdiagnose in 20% der Fälle verfehlt werden [140].

## **2.3 Diagnostik**

### **2.3.1 Hämatologische Diagnostik**

Aus dem venösen Blut und dem Nabelschnurblut wurde je ein Blutbild mit der Cell Dyn ® Maschine erstellt, welches den Hämoglobin- und Hämatokritwert, sowie die Anzahl der Erythrozyten, der Thrombozyten und der Leukozyten mit Unterteilung in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten beinhaltete.

### **2.3.2 Gruppeneinteilung aufgrund des Malariastatus**

Die Studienteilnehmerinnen wurden in drei Gruppen eingeteilt, die durch den Malariastatus bestimmt wurden. In der ersten Gruppe waren die Fälle, bei denen weder während der Schwangerschaft noch zum Zeitpunkt der Geburt Malaria festgestellt wurde, sie wird als "negative Gruppe" bezeichnet. In die zweite Gruppe wurden die Fälle eingeteilt, die während der Schwangerschaft eine dokumentierte Malaria durchgemacht hatten und dahingehend auch behandelt wurden. Damit ist die „behandelte Gruppe“ beschrieben. Die letzte Gruppe bildeten schließlich die Fälle, bei denen zum Zeitpunkt der Geburt eine plazentare Infektion festgestellt wurde - unabhängig von einer vorherigen Erkrankung - die "Gruppe der plazentaren Malaria". Die Malariadiagnostik, die dieser Gruppeneinteilung zugrunde lag, wurde mit Hilfe zweier verschiedener Methoden durchgeführt.

### 2.3.2.1 Dicker Tropfen

Sowohl aus dem mütterlichen Blut als auch aus dem Nabelschnurblut und dem Plazentablut wurde ein Dicker Tropfen zur mikroskopischen Diagnostik angefertigt. Dabei wurde die von Kremsner *et al.* beschriebene sogenannte "Lambaréné Methode" angewandt [130, 189]: Es wurden mit einer Pipette 10 µl Blut aufgenommen, die in einem definierten Feld von 10 x 18 mm auf einem Objektträger gleichmäßig verstrichen und trocknen gelassen wurden (Abb. 2.2).



**Abbildung 2.2** Objektträger mit "Dickem Tropfen" [182]

Daraufhin wurde der Objektträger 20 Minuten in Giemsalösung gefärbt. Dazu wurde eine frische Giemsalösung aus 25 ml 0,4 %iger Giemsalösung und 75 ml Triphosphatpuffer nach Weise (pH-Wert 7,2) hergestellt und filtriert. Unter fließendem Leitungswasser wurden nach dem Ende der Färbezeit vorsichtig die überschüssigen Farbrückstände auf dem Objektträger entfernt und dieser wieder getrocknet. Danach kann das Präparat mit dem Lichtmikroskop unter Ölimmersion mit dem 100-Objektiv betrachtet werden - bei einer somit 1000-fachen Vergrößerung. Dadurch entspricht ein Gesichtsfeld ~ 1/600stel eines Mikroliters. Es wurden die asexuellen Plasmodienparasiten in mindestens 30 Gesichtsfelder ausgezählt. Nach 100 freien Gesichtsfeldern wurde das Präparat als negativ eingestuft. Bei einem positiven Befund konnte über folgende Formel, bei der die Parasitämie pro Mikroliter angegeben wird, auch eine quantitative Diagnose gestellt werden:

$$\text{Parasitenanzahl} / \text{Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder} \times 600 = \text{Parasiten}/\mu\text{l}$$

### 2.3.2.2 PCR für *P.falciparum* DNA

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) für den Nachweis von *P. falciparum* Genen kann unter optimalen Bedingungen Parasitämien geringer als 0.00002% nachweisen, was einer Sensitivität von einem Parasiten pro Kubikmillimeter oder 5 Parasiten in einer 5 µl Probe entspricht. Die Detektionsschwelle ist unter optimalen Bedingungen fünf mal niedriger als bei einem Dicken Tropfen [265]. Die PCR funktioniert nach dem Prinzip, dass die zugegebenen Primer das zu amplifizierende DNA-Stück eingrenzen. Diese Primer binden nach der Denaturierung zuerst auf den Einzelsträngen und von ihnen geht dann die DNA-Synthese aus. Das exponentiell amplifizierte Stück DNA ist dann in der Gelelektrophorese einfach nachzuweisen. Mit Hilfe dieser Methode können Plasmodieninfektionen im Nabelschnurblut festgestellt werden, auch wenn sie mikroskopisch oft nicht detektiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist allerdings auch, dass vielleicht nur Makromoleküle der Parasiten, aber nicht lebende Parasiten selbst, die Plazentaschranke überschreiten [125].

Die mikroskopische Malariadiagnostik wurde im peripheren mütterlichen und im Nabelschnurblut mit Hilfe der PCR überprüft. Dazu wurde DNA aus 200 µl des Erythrozytenkonzentrates mit Hilfe des QIAamp DNA MiniKit aufbereitet, bei deren Anwendung nach den Anweisungen des Herstellers verfahren wurde. Bei einer "nested" PCR wird das DNA-Stück in zwei Schritten eingegrenzt. Im ersten Schritt erfolgt die Amplifikation der weiteren Region, danach wird das konkrete Stück, das zwischen den beiden ersten Primern liegt, amplifiziert, um damit zuerst falsch determinierte Loci auszusondern und die Sensitivität zu erhöhen. So eine verschachtelte PCR wurde benutzt, um die Gene der spezies-spezifischen kleinen Ribosomenuntereinheit (ssrRNA) von *P. falciparum* zu detektieren [225]. Es wurde zuerst eine genus-spezifische (Primer rPLU1 und rPLU5) und dann eine spezies-spezifische PCR (Primer rFAL1 und rFAL2) durchgeführt. Die DNA wurde herstellergetreu mit dem Taq PCR Master Mix mithilfe der genannten Primer amplifiziert. Die Amplifikationen wurden nach den PCR Bedingungen durchgeführt, die Singh *et al.* beschrieben haben [225]. Danach wurden die PCR Produkte mittels Gelelektrophorese bei 5 V/cm im

Agarosegel auftrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Ist DNA von *P. falciparum* in der Probe, so wird diese ebenso weit wie die Kontrollprobe auf dem Gel laufen und kann im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Es wurden pro Probe zwei PCRs durchgeführt und bei diskrepanten Ergebnissen eine dritte Bestimmung. Bei zwei positiven Bestimmungen wurde die Probe als positiv gewertet.

#### **2.4 Isolierung der mononukleären Zellen (PBMCs)**

Das gewonnene Nabelschnur- und das peripher venöse Blut der Mutter wurden im Folgenden unter sterilen Bedingungen unter einer sterilen Werkbank verarbeitet. Der erste Schritt war die Isolation der Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) aus dem mütterlichen Blut beziehungsweise der Cord Blood Mononuclear Cells (CBMCs) aus dem Nabelschnurblut. Damit sind vor allem Lymphozyten und Monozyten gemeint [118]. Da die mononukleären Zellen des peripheren Blutes der Mutter in gleicher Weise untersucht wurden wie die Zellen des Nabelschnurblutes, werden bei der weiteren Beschreibung der Methoden nur die PBMCs erwähnt. Die Methoden gelten jedoch jeweils für beide Zelllinien. Das Blut wurde zuerst jeweils im Volumenverhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 15 ml Ficoll-Paque mit 25 ml verdünntem Blut überschichtet. Danach wurden die Röhrchen für 35 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, wobei sich durch Dichtegradientenzentrifugation zwischen der Schicht der Erythrozyten und Granulozyten unten und des Plasmas mit dem PBS oben ein trüber Lymphozytenring auf dem Ficoll bildet.

Das Plasma mit dem PBS wurde verworfen und der Lymphozytenring wurde vorsichtig abpipettiert in ein frisches Falcon-Röhrchen gegeben. Zur Reinigung von Ficoll-Rückständen, die möglicherweise mit entnommen wurden, wurden die Zellen nach Suspension in 50 ml PBS gewaschen. Nach der Zentrifugierung wurde das PBS schnell dekantiert und das Pellet resuspendiert und wiederum in 10 ml PBS aufgenommen.

Um die PBMCs zu zählen, wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau vermischt und 10 µl des Gemischs in eine "Neubauer Improved" Zählkammer gegeben. In dieser wurden unter dem Lichtmikroskop die vier großen Eckquadrate ausgezählt, wobei es sich jeweils um eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> bei einer Tiefe von 0,1 mm handelt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass mit Trypanblau angefärbte Zellen tot sind und nicht mitgezählt werden sollten. Nur Zellen mit intakter Zellmembran werden nicht von dem Farbstoff angefärbt. Die erhaltene Summe wurde durch vier geteilt, um einen Durchschnittswert zu ermitteln. Durch den Faktor 10<sup>6</sup>, in dem sowohl die Verdünnung im Medium und im Trypanblau als auch die Kammertiefe berücksichtigt wurde, erhält man bei der Multiplikation die Gesamtzahl der in der Probe von 10 ml enthaltenen Zellen.

Aus der Menge der PBMCs wurde berechnet, wieviel Lösung für welche der Stimulationen zur Verfügung stehen würden: 15 Mio. Zellen wurden für die plasmodienspezifische Stimulierung benötigt und 5-15 Mio. Zellen für die unspezifische Stimulation. Dabei standen nicht immer genug Zellen für beide Stimulationen zur Verfügung, ebenso wie auch nicht in allen Fällen gleichzeitig genug Zellen von der Mutter und dem Nabelschnurblut zur Verfügung standen. Der entsprechende Anteil an der Zelllösung wurde berechnet und diese jeweils in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach erneutem Waschen wurde das Pellet mit auf 37°C vorgewärmtem Ultra Culture Medium entsprechend der verschiedenen Stimulationen resuspendiert (siehe 2.5.2, 2.6 und 2.7). Das Medium wurde zuvor folgendermaßen präpariert: UC-Medium wurde mit L-Glutamin 2 mmol/l, Gentamicin 170 µl/ml und 2-Mercaptoethanol 3,5 µl/l versetzt und sterilfiltriert.

## **2.5 *P. falciparum*-spezifische PBMC-Stimulation**

Die plasmodienspezifische Stimulation wurde in Anlehnung an die Vorgehensweise von Behr und Dubois [23] sowie Winkler [194, 229] und Hensmann und Kwiatkowski [93] durchgeführt.

### 2.5.1 Schizontenlysat von *P.falciparum*

Das Schizontenlysat für die parasitenspezifische *in vitro* Stimulation der PBMCs über Antigene aus Schizonten von *Plasmodium falciparum* wurde am Labor des Tropeninstitutes in Tübingen hergestellt.

#### 2.5.1.1 Parasitenkulturen

Das *P. falciparum* Isolat *Cys007*, das ursprünglich von einem Kind isoliert wurde, welches mit schwerer Malaria auf der pädiatrischen Station des Albert-Schweitzer-Krankenhauses hospitalisiert war [247], wurde *in vitro* nach der von Trager und Jensen beschriebenen Methode in Kultur gehalten [250]. Die Kulturen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit dem Kulturmedium RPMI 1640 gehalten. Als komplettes Parasiten Medium (CPM) wurde RPMI Flüssigmedium mit HEPES Puffer (24 mmol/l), L-Glutamine (2 mmol/l), Gentamicin (50 µg/ml), 10% Albumax/Hypoxanthin und 5% humanem Serum versetzt. Die Albumax/Hypoxanthin-Mischung wurde wie folgt erstellt: 10,4 g RPMI 1640 Pulver wurden mit 5,97 g HEPES Puffer Salz, 2,33 g Na HCO<sub>3</sub>, 2 g Glukose und 0,2 g Hypoxanthin in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert sollte dann zwischen 7,0 und 7,5 liegen. Daraufhin wurde Albumax (5 mg/ml) hinzugegeben und 2 Stunden gerührt, bis das Pulver gelöst war. Danach wurde die Lösung sterilfiltriert und mit Gentamicin (50 µg/ml) versetzt. Das fertige Medium wurde dann bei 4°C zwischengelagert. Die Parasitenkulturen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub> inkubiert. Zur Subkultivierung wurden O<sup>+</sup> leukozytendepletierte Erythrozyten benutzt, um einen Hämatokrit von 5% zu erhalten. Die Kulturen wurden bis zum Erreichen einer 3-5%igen Parasitämie mit einer überwiegenden Schizontämie gezüchtet, was täglich durch giemsa gefärbte Ausstriche überprüft wurde. Nach Fixierung dieser Ausstriche in Methanol für eine Minute wurden sie erneut getrocknet und 20 Minuten in Giemsalösung gefärbt. Weitere Behandlung wie unter 2.3.2.1 für den Dicken Tropfen beschrieben. Die Parasitämie wurde als Anteil der infizierten Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten berechnet.

### 2.5.1.2 Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination

Die Parasitenkulturen wurden ständig mithilfe des PCR Verfahrens auf Mykoplasmen-Kontamination untersucht [256], die sich jedoch immer als negativ erwies. Dazu wurde das QIAamp DNA Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet, um aus 200 µl Erythrozyten der Kultur die DNA zu extrahieren. Diese wurde dann nach Spaepen *et al.* durch die PCR amplifiziert und mit einer positiven DNA-Kontrolle, einer negativen DNA-Kontrolle und einer Kontrolle ohne DNA per Gelelektrophorese verglichen [228].

### 2.5.1.3 Synchronisation der Parasitenkultur durch MACS

Die Magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS) kann als ein Verfahren genutzt werden, um die Plasmodienkultur zu synchronisieren [229], da die normale Reproduktion in Kultur zwar gegeben, aber die hohe Synchronisation nicht wie *in vivo* zu erreichen ist. Unter "Synchronisation" einer Kultur wird also verstanden, dass ein Stadium der Parasitenentwicklung von den übrigen getrennt wird. Durch die MACS werden die Schizonten und die späten Trophozoiten unter Ausnutzung ihrer magnetischen Eigenschaften von den jungen Ringformen separiert. Das in den späten Formen angereicherte Hämozoïn (Malariapigment) entsteht, wenn die Parasiten das Hämoglobin der Erythrozyten in ihrer Nahrungsvakuole konsumieren. Die Aminosäuren werden dabei dem Parasiten für seine Proteinproduktion zur Verfügung gestellt und das Häm oxidiert in die toxische Eisenform. Die Toxizität wird durch spontane Dimerisation mit HRP II zu einer inerten kristallinen Substanz (Hämozoïn) verhindert [78]. Dieses reichert sich im Reifungsprozess der Parasiten an und liegt besonders reichlich in den Schizonten als nichtlösliches Pigment mit magnetischen Eigenschaften vor.

Um die Schizonten von den Ringformen zu trennen, wurden 14 ml Medium von den 20 ml in den Kulturflaschen abgenommen und die Parasitenkultur in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Kulturflaschen wurden dann noch mit etwas Waschmedium (RPMI versetzt mit Gentamicin 50 µg/ml) nachgespült. Die Parasitenkultur wurden mit dem Waschmedium gewaschen, dieses dann vorsichtig abgenommen und die Erythrozyten in einem Volumenverhältnis 1:2

mit Puffermedium versetzt (Puffermedium: RPMI angereichert mit 2% Fetalem Kälberserum und Gentamicin 50 µg/ml). Der SuperMACS wurde unter der sterilen Werkbank angerichtet: Eine große MACS Separation Säule wurde in den Magneten eingespannt, unten mit einem Drei-Wege-Hahn versehen, an deren seitlichem Eingang eine 50 ml Spritze mit 50 ml Puffermedium befestigt wurde. Durch diese wurde die Säule dann langsam von unten bis eben über die Schaumstofffläche mit Medium gefüllt. An der unteren Öffnung des Drei-Wege-Hahns wurde die Nadel der Spritze angebracht und darunter ein 50 ml Falcon-Röhrchen gestellt, um die Resterythrozyten aufzufangen.

Daraufhin wurde die im Puffermedium resuspendierte Parasitenkultur portionsweise auf die Säule gegeben und der untere Hahn so weit geöffnet, dass ein tropfenweiser Durchfluss gewährleistet war. Dabei fließen die jungen Formen durch die Säule hindurch, während die Schizonten im Magnetfeld an den "beads" der Säule hängen bleiben. Die Säule wurde mit Puffermedium gewaschen, bis man eine Tropfenfarbe erreicht, die der Ausgangsfarbe des Puffermediums gleicht. Danach wurde die Säule vom Magneten genommen und die Schizonten in einem frischen Falcon-Röhrchen aufgefangen. Die Resterythrozyten wurden wieder neu in Kultur ausgesät.

Von den gewonnenen Schizonten wurde für die Parasitämiezahl ein Giemsaausstrich angefertigt, der Rest zweimal mit PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren. Die Schizontämien dieser Präparation lagen im Durchschnitt bei 43%. Nach 20 MACS Durchgängen wurden die Lysate aufgetaut, gemischt und mit PBS auf eine Konzentration von 25 Mio. parasitierte Erythrozyten/100 µl gebracht, wobei davon ausgegangen wurde, dass  $10^7$  Erythrozyten sich in einem Mikroliter befinden. Nach dreimaligem Friertauen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wärmebad wurde das Lysat dann in Aliquots abgefüllt bei -20°C zwischengelagert. Dadurch wurden die Membranen der Erythrozyten aufgebrochen und die Plasmodien-Antigene freigesetzt. Aus den gleichen Erythrozytenkonzentraten, die für die Kulturen benutzt wurden, wurden nach dieser Methode auch nichtinfizierte Kontroll-Lysate angefertigt.

### 2.5.2 Ansatz der Stimulation

Für den Ansatz der plasmodienspezifischen Stimulation wurden pro 1 ml vorgewärmtem UC-Medium nach der Isolation 2,5 Mio. PBMCs aus dem Nabelschnur- und dem mütterlichen Blut aufgenommen. In einer Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen wurden je drei Vertiefungen mit 2 ml gefüllt, also 5 Mio. PBMCs bzw. CBMCs pro Vertiefung. Dabei diente eine Vertiefung der Negativkontrolle ohne Stimulantien, eine der Kontrolle mit 100 µl parasitenfreiem Lysat und die Dritte der Stimulation mit 100 µl Schizontenlysat von *P. falciparum* Isolat *Cys007*. Dadurch ergab sich eine Ratio von 1 PMBC auf 5 parasitierte bzw. nichtinfizierte Erythrozyten. Die Stimulantien wurden jeweils gut mit den Zellen vermischt und außer zur Negativkontrolle zusätzlich der monoklonale Antikörper CD28 (2,5 µg/ml) gegeben. Dieser sollte als Co-Stimulans für die TCR-vermittelte Aktivierung der T-Zellen dienen [120, 267]. Die Kulturplatte wurde dann insgesamt 18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach sechs Stunden Inkubation wurde zu jeder Vertiefung Brefeldin A (10 µg/ml) dazugegeben. Als Metabolit des Pilzes *Penicillium brefeldianum* inhibiert es die Sekretion von Zytokinen indem es den Vesikeltransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat unterbricht. Durch die Inhibition des Proteintransports akkumulieren die Zytokine und das intrazelluläre Färbesignal bei der FACS-Analyse wird verstärkt [3].

### 2.6 Unspezifische PBMC-Stimulation

Die unspezifische Stimulation wurde in Anlehnung an die Protokolle von Winkler *et al.* [123, 274, 277] durchgeführt. Für den Ansatz der unspezifischen Stimulation wurden jeweils 5-15 Mio. PBMCs aus dem Nabelschnur- und dem mütterlichen Blut nach der Isolation in 10 ml vorgewärmtem UC-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit Belüftung überführt. Danach wurden die Stimulantien zur Kultur gegeben: Ionomycin (1,25 µM), PMA (10 ng/ml) und Brefeldin A (10 µl/ml).

Ionomycin und PMA sind polyklonale Aktivierungsagentien (Mitogene) für Leukozyten, die intrazelluläre Signalkaskaden zur Produktion von Zytokinen anstoßen. Durch diese *in vitro* Aktivierung können auch Cytokine nachgewiesen werden, die von nicht stimulierten Leukozyten nur in sehr geringen Mengen produziert werden [3]. Die Zellkulturflaschen wurden 4 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

## **2.7 Unstimulierte *ex vivo* PBMCs**

Bei einer genügend großen Zellzahl von PBMCs wurden 10 Mio. Zellen unstimuliert (*ex vivo*) fixiert. Hierzu wurde der Anteil der Lösung errechnet, der 10 Mio. Zellen enthielt. Dieser wurde nach guter Durchmischung entnommen, in PBS gewaschen und in 2 ml vorgewärmtem UC-Medium in eine Vertiefung der Zellkulturplatte gegeben. Nach der Inkubation mit den übrigen stimulierten Zellen erfolgte die Konservierung durch Fixierung wie im folgenden Abschnitt beschrieben.

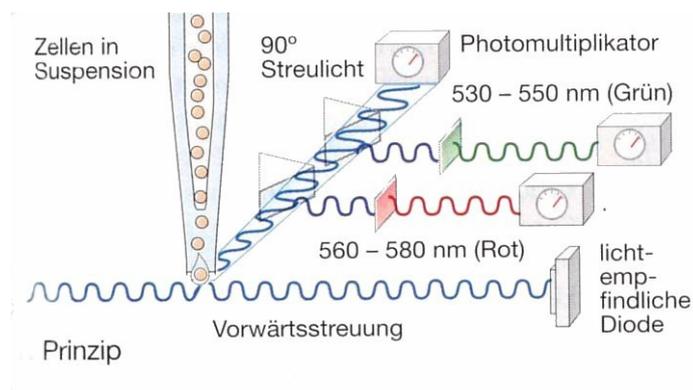
## **2.8 Zellen "ernten" und fixieren**

Nach Ende der Stimulation wurden die Kulturen fünf Minuten auf Eis gestellt, um die Stimulation vor der weiteren Verarbeitung zu unterbrechen. Die Zellsuspension wurde dann jeweils in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert, wobei die Kulturflaschen beziehungsweise die Kulturplatten zweimal mit PBS nachgespült wurden, um die möglicherweise am Plastik adhärenen PBMCs zu lösen. Die Zellen wurden dann in PBS resuspendiert - bei der plasmodien-spezifischen Stimulation und den *ex vivo* Zellen jeweils in 2 ml, bei der unspezifischen Stimulation in 5 ml. Danach wurde die gleiche Menge einer frisch hergestellten 4%igen Formaldehydlösung zugegeben und die Zellen 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Formaldehydlösung wurde jeweils aus 4 ml 37%igem Formaldehyd und 33 ml PBS hergestellt. Die fixierten Zellen

wurden wiederum zweimal mit PBS gewaschen und dann bis zur weiteren FACS-Analyse in Tübingen in HBSS resuspendiert und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Das HBSS wurde folgendermaßen präpariert: Das HBSS-Pulver wurde in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 3,0 g BSA und 1,0 g Natriumazid versetzt. Danach wurde die Mischung steril filtriert und bei 4°C zwischengelagert [277].

## 2.9 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Um die verschiedenen Subpopulationen der PBMCs und ihre Zytokinproduktion nach der Stimulation nachweisen zu können, wurde die Durchflusszytometrie mit FACS-Analyse gewählt [23, 123, 274, 277]. Bei der Fluoreszenz-aktivierten Zellseparation handelt es sich um eine "high throughput"-Methode, bei der die zu untersuchenden Zellen mit mehreren fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt werden können und dann einzeln durch eine schnelle Vorbeiführung an einem Laser identifiziert werden (Abb. 2.3). Ohne schwierige Zellseparierungstechniken können die Zellen dadurch auf ganz bestimmte Zellpopulationen untersucht werden.



**Abbildung 2.3** FACS-Prinzip [40]

Im Einzelnen verläuft die Untersuchung folgendermaßen: Die Zellen werden durch eine vibrierende Fließkammer in Einzelzellsuspension gebracht und in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet [275]. Sie werden von

diesem luftgekühlten Argonionenlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und daraufhin wird sowohl die Streulichtemission als auch die Fluoreszenz detektiert. Wenn ein Lichtstrahl auf eine Zelle trifft, spiegeln sich deren physikalische Eigenschaften (wie Querschnittsfläche, Membranstruktur und intrazelluläre Bestandteile) in der erzeugten Lichtstreuung. Der einfallende Lichtstrahl wird vor allem vorwärts (FSC) und seitwärts (SSC) gestreut. FSC ist ein Maß für die Zellgröße, SSC für die intrazelluläre Granularität und die äußere Form. Durch diese beiden Parameter lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen wie Lymphozyten und Monozyten unterscheiden [193].

Fluoreszenz ist die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung. Die fluoreszierenden Verbindungen, die an die Antikörper gekoppelt sind, absorbieren Lichtenergie in je einem bestimmtem Wellenlängenbereich, was die Elektronen auf ein höheres Energieniveau hebt. Beim Rücksprung des Elektrons zum Grundniveau emittiert es ein Photon. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die fluoreszierenden Farbstoffe, die an die monoklonalen Antikörper gebunden sind, waren Fluorescein Isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP). Sie haben jeweils verschiedene Emissionswellenlängen [193].

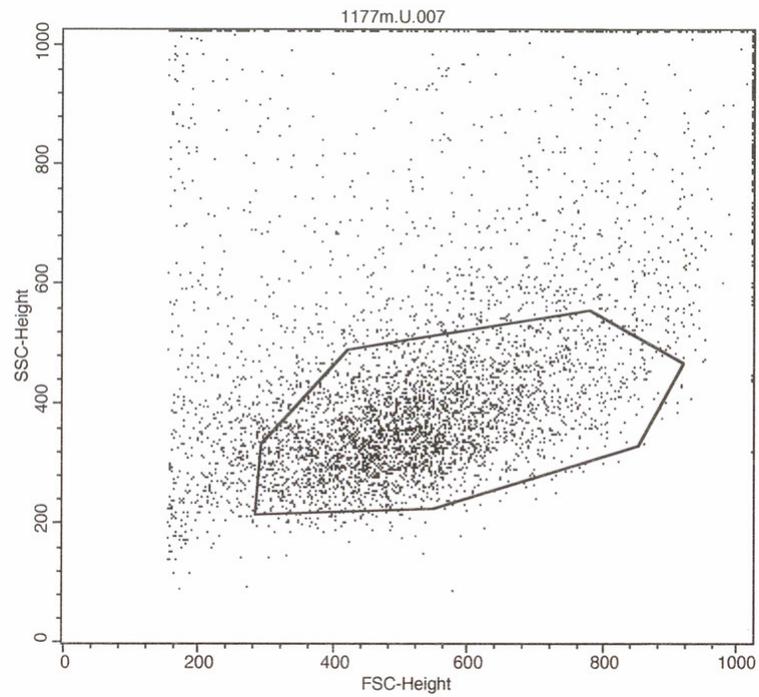
Die gemessene Intensität der jeweiligen Fluoreszenz spiegelt die Anzahl der Bindungsstellen des Antigens - und damit die Häufigkeit seiner Expression - wieder. Es können sowohl Oberflächenantigene als auch intrazelluläre Antigene markiert werden, nachdem die Zellen permeabilisiert wurden [210]. Somit können durch die Streulichtanalyse und die Antigenfärbung verschiedene zelluläre Charakteristika gleichzeitig untersucht werden. Im Detektionsteil des Optischen Systems konvertieren dann Photodetektoren die optischen Signale in elektrische Impulse. Nach der Digitalisierung der Daten werden sie durch den Computer in einem Punkthistogramm dargestellt, in dem jeder dargestellte Punkt dem Messwert von mindestens einer Zelle entspricht [193].

### 2.9.1 Färbung

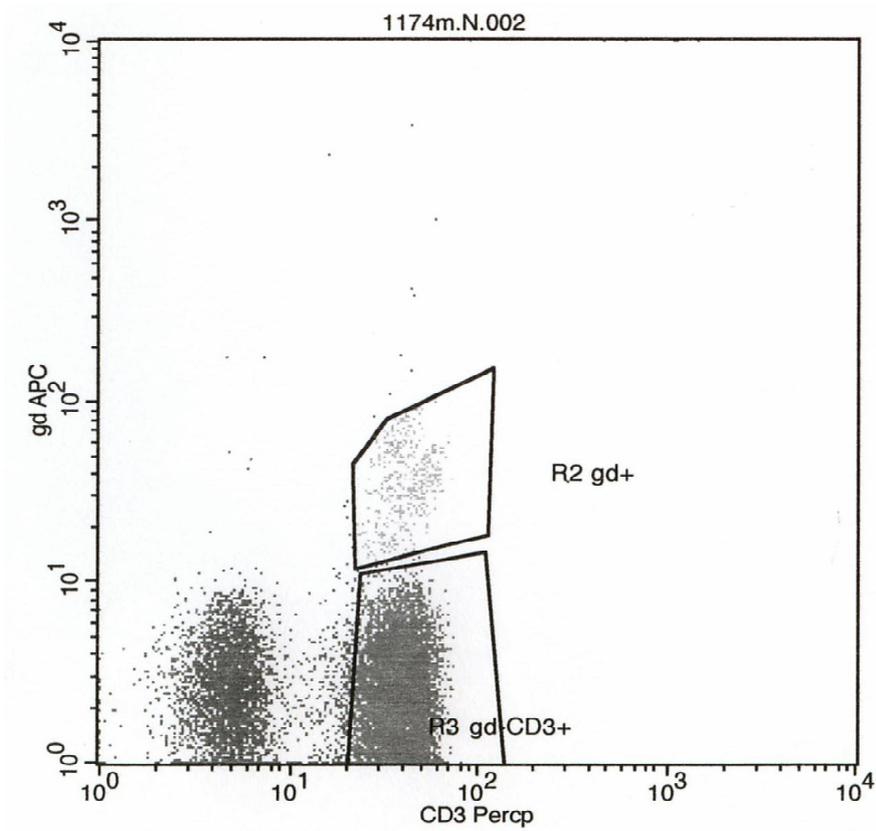
Die weiteren Arbeitsschritte wurden nicht mehr unter sterilen Bedingungen durchgeführt, da die Zellen bereits fixiert waren. Die strukturelle Integrität ist damit auch gewährleistet. Das übliche Vorgehen sieht eine Permeabilisierung der Zellen mit dem Detergenz Saponin vor, damit die fluoreszenzmarkierten Antikörper für intrazelluläre Strukturen auch in die Zellen eindringen können. Der dazu benötigte Saponinpuffer wurde aus 10 g Saponin und 23,8 g HEPES hergestellt, die auf 100 ml mit PBS aufgefüllt wurden. Diese Stammlösung wurde dann steril filtriert und vor jeder Färbung frisch 1:100 mit PBS verdünnt. Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen. Die Oberflächenantikörper zum Färben wurden nach Herstellerangaben verdünnt und mit den Zellen inkubiert. Danach wurde mit Saponinpuffer gewaschen und die in Saponinpuffer verdünnten intrazellulären Färbungen (2 µg/ml) jeweils in einem Volumen von 50 µl zu den 200 000 Zellen gegeben und 30 Minuten inkubiert. Es wurden vierfache Färbungen mit FITC-, PE-, APC- und PerCP-markierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Danach erneutes Waschen mit Saponinpuffer und PBS.

### 2.9.2 Analyse

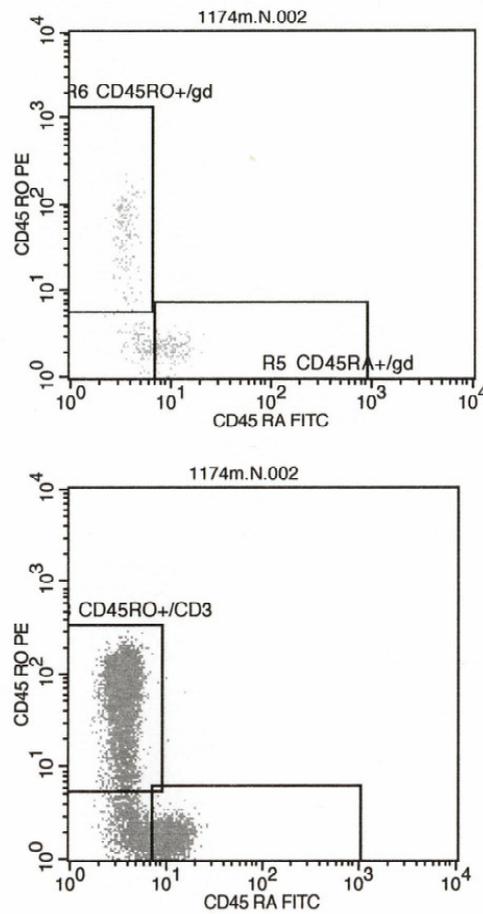
Die Analyse der Zellen wurde mit dem FACSCalibur Flow Cytometer vorgenommen unter Zuhilfenahme der cell quest Software. In dem Punktdiagramm, das sich aus der Analyse der FSC-Höhe und der SSC-Höhe ergab (Abb. 2.4), wurde die erwünschte Zellpopulation der Lymphozyten mithilfe eines Vergleichs mit den Antikörper-Isotypen aus allen gemessenen Ereignissen durch ein Fenster eingegrenzt (Gating). Bis zu  $2 \times 10^5$  Zellen wurden gezählt. Die markierten Zellen wurden dann in einem zweiten Diagramm dargestellt, das die Differenzierung der APC-markierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen und die PerCP-markierten CD3-positiven Zellen zuließ (Abb. 2.5). Über in das Histogramm eingelegte Flächen wurde in dieser Population wiederum ein Fenster eingegrenzt. Daraufhin wurden jeweils die mit PE- und FITC-markierten Farbstoffen gefärbten Zellen innerhalb dieser beiden Zellpopulationen dargestellt (Abb. 2.6). Da nicht alle neonatalen NK-Zellen CD56 exprimieren, wurden zum Eingrenzen der Fenster bei der FITC CD3- and CD94+ benutzt [24, 31].



**Abbildung 2.4** FACS-Histogramm: Punktdiagramm aus FSC- und SCC-Höhe



**Abbildung 2.5** Punktdiagramm der eingegrenzten Zellen markiert mit APC und PerCP



**Abbildung 2.6** Markierung der oben angezeigten Zellen mit CD45RO und CD45RA

Eine Übersicht über die verschiedenen durchgeführten Färbungen gibt Tabelle 2.1.

**Tabelle 2.1** Durchgeführte Färbungen der verschiedenen stimulierten Zellpopulationen für aufgeführte Antigene mittels fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper

Stimulation	Zellpopulation	gefärbte Antigene
<i>plasmodienspezifisch</i>	CD3	IFN $\gamma$ , IL13, Perforin, Granzym B
	$\gamma\delta$	IFN $\gamma$ , IL 13, Perforin, Granzym B
<i>Unspezifisch</i>	CD3	IFN $\gamma$ , IL 13, Perforin, Granzym B CD45RO/RA, IL5, HLA DR, IL10
	$\gamma\delta$	IFN $\gamma$ , IL 13, Perforin, Granzym B CD45RO/RA, IL5, HLA DR, IL10
	CD3- CD94+	Perforin, Granzym B

<i>Ex vivo</i>	CD3	Perforin, Granzym B CD45RO/RA, CD25, HLA DR
	$\gamma\delta$	Perforin, Granzym B CD45RO/RA, CD25, HLA DR
	CD3- CD94+	Perforin, Granzym B

## 2.10 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Durchflusszytometriemessungen wurden als absolute Zahl der gemessenen Ereignisse und als Anteil der zytokinproduzierenden Zellen an den verschiedenen Zellpopulationen in Excel eingegeben und dort mit den klinischen Daten für die Auswertung kombiniert. Für die Auswertung betreffend des Malariastatus wurden von den rekrutierten Müttern im Nachhinein die Fälle ausgeschlossen, welche in den Tagen vor oder unter der Geburt mit Chinin behandelt wurden und bei denen anamnestisch eine nicht im Mutterpass dokumentierte und behandelte Malaria angegeben wurde, falls sie ansonsten in die negative Gruppe eingestuft geworden wären.

Bezüglich der Gruppeneinteilung anhand der Malariadiagnostik galten folgende Grundsätze: Gametozyten in der mikroskopischen Malariadiagnostik führten zum Ausschluss. In der negativen Kategorie sollte die plazentare mikroskopische Diagnose mit der peripheren mikroskopischen Diagnose sowie mit den Ergebnissen der PCR übereinstimmen. Falls das nicht gegeben war, wurden sie ausgeschlossen, wie bei Fällen mit alleiniger peripherer Malariadiagnostik oder einem positiven Ergebnis für das Nabelschnurblut bei negativem Ergebnis bei der mikroskopischen Diagnose des plazentaren Blutes. Bei diesen Konstellationen konnte nicht sicher von einer plazentaren Infektion ausgegangen werden. Das gleiche Vorgehen galt auch für die Gruppe der in der Schwangerschaft behandelten Mütter, die zum Zeitpunkt der Geburt keine Malaria nachweisen sollten. Für die Gruppe mit der plazentaren Malaria war die

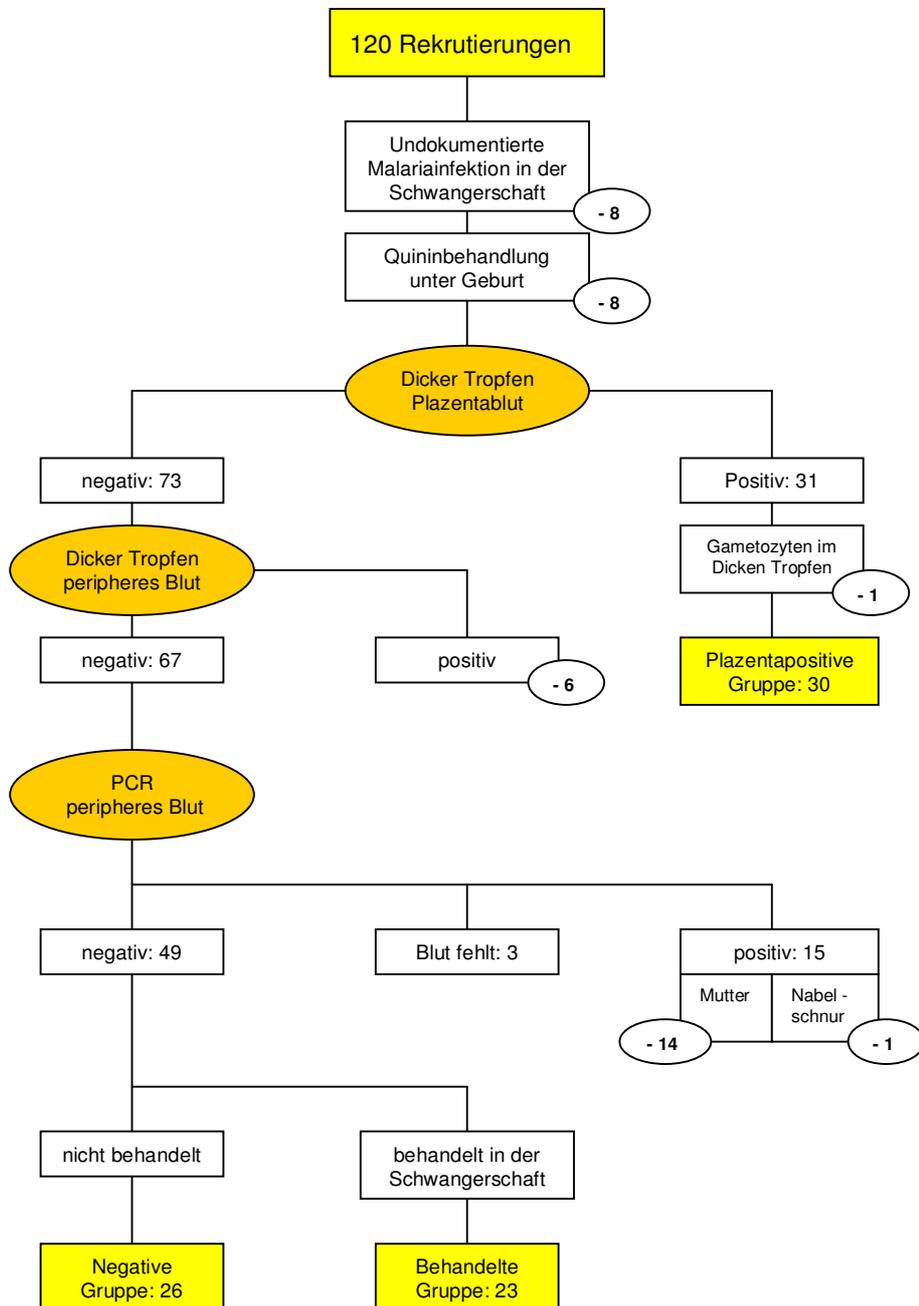
positive Diagnose des plazentaren Blutes über den Dicken Tropfen Grundlage. Für das plazentare Kompartiment gab es keine Diagnosebestätigung per PCR. Submikroskopische Infektionen wurden also nicht berücksichtigt, da submikroskopische *P. falciparum* Infektionen unter der Schwangerschaft und bei Geburt bisher widersprüchliche Bedeutung im Hinblick auf Inflammation, Anämie und niedriges Geburtsgewicht des Kindes zeigten [13, 168, 211].

Für die statistische Analyse der Durchflusszytometrie wurde bei den CD3-T-Zellen eine Mindestzahl von 2000 gemessenen Ereignissen und bei den  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine Mindestzahl von 100 veranschlagt. Proben mit geringerer Zellzahl wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Zur statistischen Analyse wurde die Software statview verwandt. Dabei wurden für den Vergleich der unverbundenen Messreihen nichtparametrische Tests benutzt. Bei zwei zu beurteilenden Messreihen wurde der Mann-Whitney U-Test eingesetzt, der für nicht normalverteilte stetige Parameter anwendbar ist. Bei mehr als zwei zu vergleichenden unverbundenen Messreihen stetiger Parameter wurde der Kruskal-Wallis-Test verwandt. Um die Unabhängigkeit zwei nominaler Variablen zu testen, wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Ein p-Wert  $< 0,05$  galt jeweils als signifikant, ein p-Wert  $< 0,1$  wurde als Trend gewertet. In den Boxplots sind durch das Quadrat jeweils der Median mit den beiden Quartilen beschrieben, während durch die davon abgehenden Linien die 10. und die 90. Perzentile veranschaulicht werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Gruppeneinteilung nach Malariadiagnostik



**Abbildung 3.1** Gruppeneinteilung nach Anwenden der Ausschlusskriterien

Insgesamt wurden 120 Frauen im Zeitraum vom November 2002 bis September 2003 für diese Studie rekrutiert und 41 dieser Fälle im Nachhinein für die Analysen im Zusammenhang mit dem Malariastatus ausgeschlossen. Das

geschah aus den unter 2.10 angegebenen Gründen, wie in Abbildung 3.1 dargestellt. Bei der Diagnostik mithilfe des Dicken Tropfens wurden im peripheren Blut der Mütter Parasitämien zwischen 60 und 111.600 Parasiten/ $\mu$ l festgestellt, im plazentaren Blut lagen die Werte zwischen 19 und 120.000 Parasiten/ $\mu$ l. Der Median lag im peripheren Blut bei 1.200 Parasiten/ $\mu$ l, im plazentaren Blut bei 600 Parasiten/ $\mu$ l. In keinem Fall wurde eine positive mikroskopische Malariadiagnostik im Nabelschnurblut gestellt.

Damit haben insgesamt 79 Studienteilnehmerinnen und 83 Neugeborene an der Studie teilgenommen, da es vier Zwillingsgeburten gab. Es nahmen 49 Multigravidae und 30 Primigravidae an der Studie teil. Die Unterteilung in die drei Gruppen fand statt, wie unter 2.3.2 und 2.10 beschrieben. Daraus ergab sich folgende Verteilung in Tabelle 3.1.

**Tabelle 3.1** Gruppeneinteilung nach Malariastatus

<b>Gruppe</b>		<b>Primigravidae</b>	<b>Multigravidae</b>
Negativ	26	8	18
Behandelt	23	8	15
Plazentare Infektion	30	14	16

### 3.2 Klinische Daten der Studienpopulation

Die Auflistung der klinischen Daten der Studienpopulation erfolgt in Tabelle 3.2.

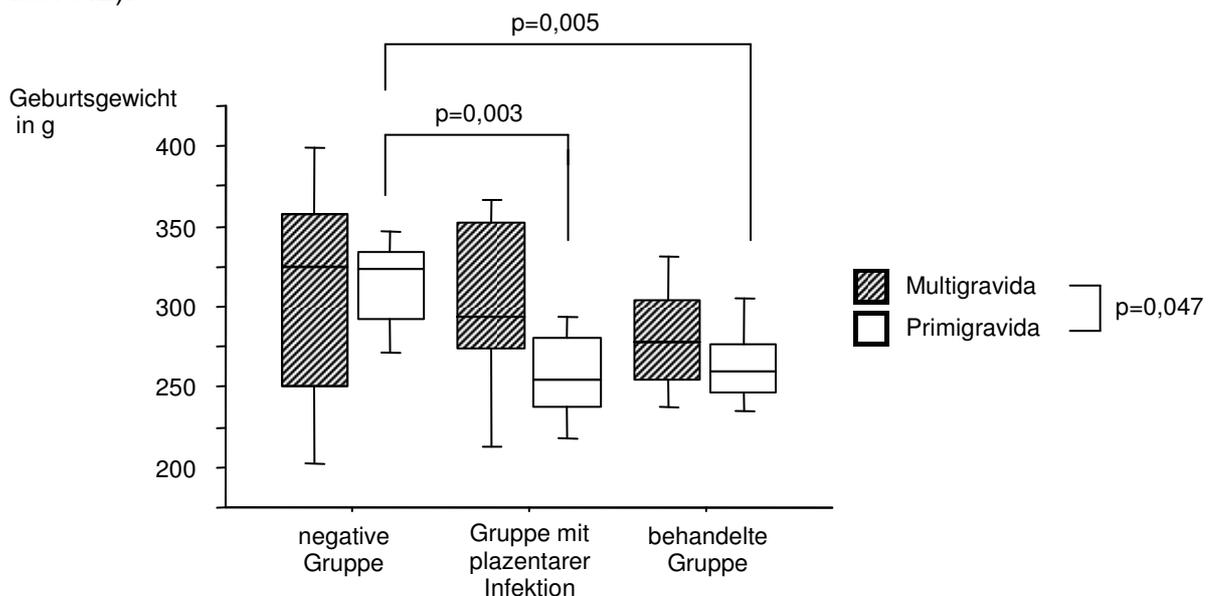
**Tabelle 3.2** Beschreibung der Studienpopulation

	<i>Einheit</i>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
Alter	Jahre	23,7	15	44
Gravidität	Anzahl	2	1	11
Schwangerschaftsdauer	Woche	38	28	42
Geburtsgewicht	Gramm	2860	1800	4400
Hb-Wert (Mütter)	g/dl	10,5	5,7	15,2
Hb-Wert (Nabelschnur)	g/dl	13,6	9,7	17,5
Lymphozyten (Mütter)	%	18,4	5	40
Lymphozyten (Nabelschnur)	%	43,5	23	83

Dabei zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit des Malariastatus von der Gravidität, der Schwangerschaftsdauer oder der Blutgruppe. Von den 75 Fällen, in denen die Blutgruppen bekannt war, hatten 41 Studienteilnehmerinnen die Blutgruppe 0+. Jeweils 16 Frauen hatten die Blutgruppen A+ und B+. AB+ und 0- waren je einmal vertreten. Der durchschnittliche mütterliche Hämoglobinwert bei den Primigravidae der behandelten Gruppe lag signifikant höher als in der Gruppe mit plazentarer Infektion ( $p=0,017$ ).

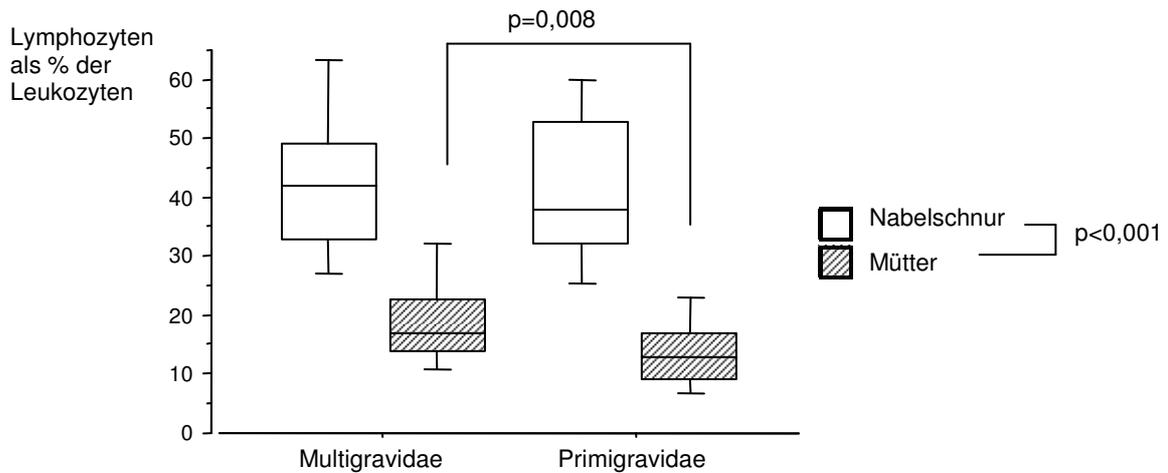
### 3.2.1 Vergleich von Multigravidae und Primigravidae

Im Vergleich von Multigravidae und Primigravidae stellten sich einige bekannte Beziehungen dar. Das Einlingsgeburtsgewicht der Neugeborenen der Primigravidae lag zum Beispiel signifikant unter dem der Multigravidae ( $p=0,047$ ) (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2** Geburtsgewicht nach Malariastatus, unterteilt in Multi- und Primigravidae

Bei den Primigravidae zeigte sich - auch im Gegensatz zu den Multigravidae - eine signifikante Erhöhung des Gewichts in der negativen Gruppe im Vergleich mit der Gruppe der plazentaren Infektion ( $p=0,003$ ) und mit der behandelten Gruppe ( $p=0,005$ ). Die Hb-Werte lagen bei den Primigravidae signifikant über denen der Multigravidae ( $p=0,027$ ). Die mütterlichen Lymphozyten betreffend zeigte sich bei den Multigravidae im Vergleich mit den Primigravidae eine signifikante Erhöhung der Zahlen ( $p=0,008$ ) (Abb. 3.3).

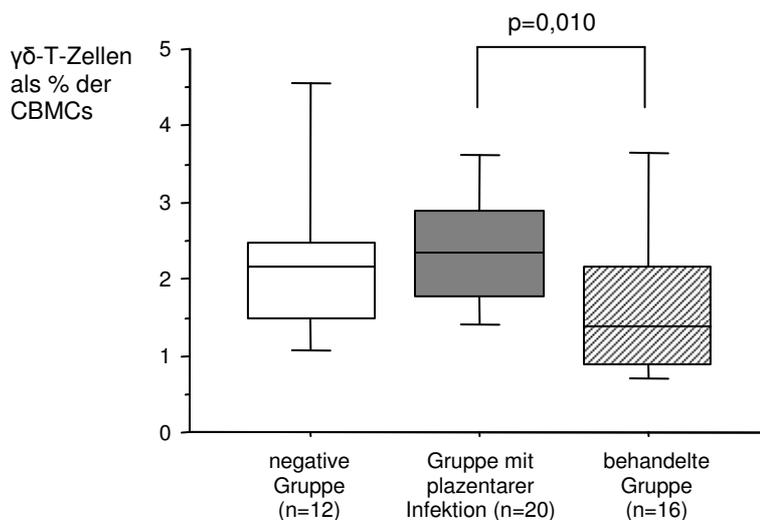


**Abbildung 3.3** Lymphozytenwerte von Müttern und Nabelschnurblut in Abhängigkeit von der Parität

In Bezug zum Malariastatus konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

### 3.2.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Nach der unspezifischen Stimulation fand sich ein Unterschied im Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Gesamtzahl der CBMCs je nach Malariastatus - signifikant mehr  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der plazentainfizierten als in der behandelten Gruppe ( $p=0,010$ ) (Abb 3.4).



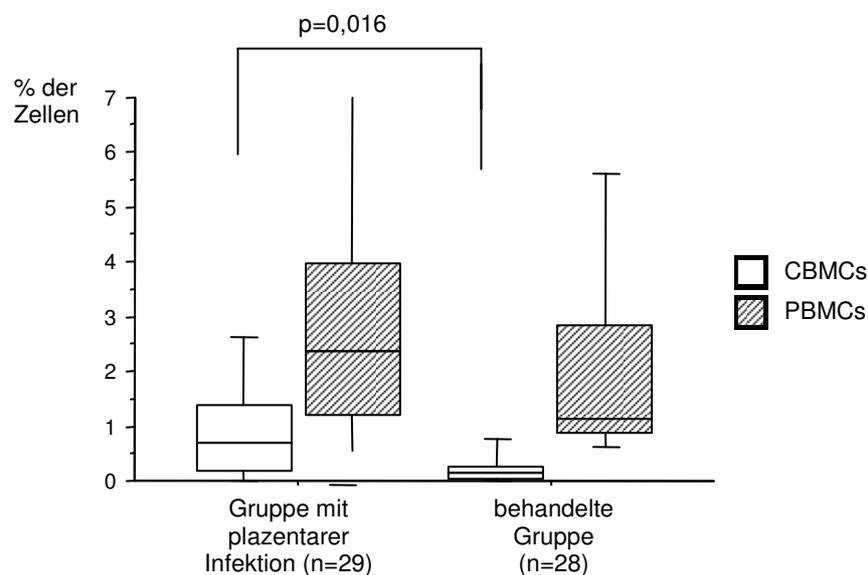
**Abbildung 3.4**  $\gamma\delta$ -T-Zellen als Anteil der CBMCs in Abhängigkeit vom Malariastatus nach unspezifischer Stimulation

### 3.3 Oberflächenmarker und Zytokinmessungen nach Stimulation

Aufgrund der teilweise zu geringen Zellzahl konnten nicht von jeder Probe alle Stimulationen des mütterlichen Blutes und des Nabelschnurblutes durchgeführt werden. Deshalb finden sich bei den verschiedenen Stimulationen unterschiedliche Fallzahlen sowohl von mütterlichen PBMCs als auch CBMCs des Nabelschnurblutes. Die Fallzahlen waren zu gering, als das eine gepaarte Analyse der für Zytokine positiven PBMCs mit den jeweiligen CBMCs möglich gewesen wäre. Soweit es nicht Erwähnung gefunden hat, konnte keine Beziehung zwischen der Expression der verschiedenen Zytokine und Oberflächenmoleküle und dem Malariastatus der unterschiedlichen Gruppen hergestellt werden. Und es wurde auch kein Unterschied zwischen Primi- und Multigravidae gefunden.

#### 3.3.1 HLA-DR

HLA-DR gilt als später Aktivierungsmarker [65]. *Ex vivo* wurde kein Zusammenhang des Malariastatus mit der Expression von HLA-DR festgestellt.

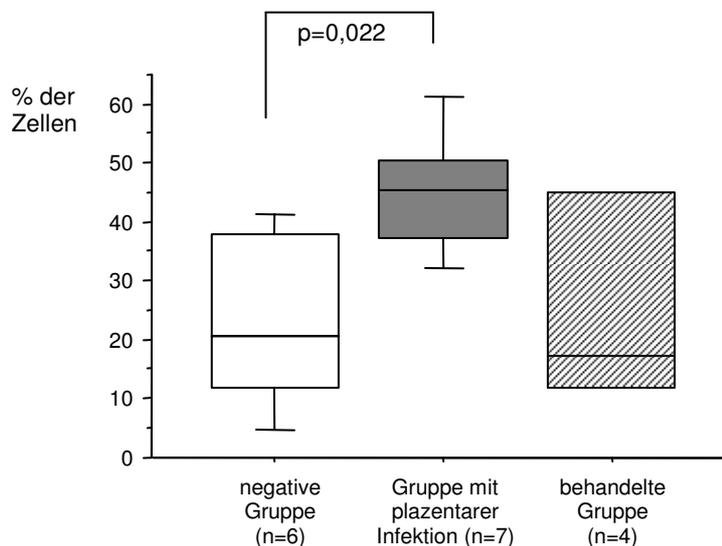


**Abbildung 3.5** HLA-DR Expression auf  $\gamma\delta$ -T-Zellen der behandelten Gruppe und der Gruppe mit plazentarer Malaria nach unspezifischer Stimulation (Die 90. Perzentile der HLA-DR exprimierenden PBMCs in der infizierten Gruppe liegt bei 18 % aller PBMCs - nicht dargestellt.)

Nach der unspezifischen Stimulation (Abb. 3.5) wurde HLA-DR auf den  $\gamma\delta$ -T-Zellen der CBMCs in der Gruppe mit plazentarer Malaria signifikant häufiger exprimiert als auf den Zellen der behandelten Gruppe ( $p=0,016$ ).

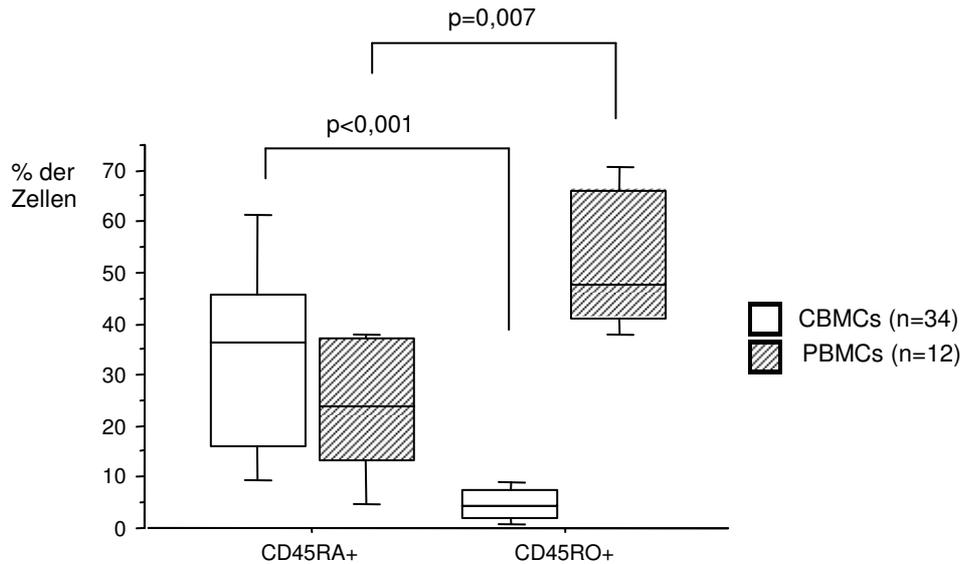
### 3.3.2 CD45

CD45 ist ein Aktivierungsmarker für T-Zellen. Die Isoform CD45RA stellt die Untergruppe der naiven T-Zellen dar, während aktivierte T-Gedächtniszellen CD45RO exprimieren [115]. Im Bezug auf den Malariastatus unterschieden sich *ex vivo* nur die naive Isoform der CD3-T-Zellen (Abb. 3.6): Auf den CBMCs exprimierte die Gruppe mit der plazentaren Malaria signifikant mehr CD45RA als die negative Gruppe ( $p=0,022$ ).



**Abbildung 3.6** CD45RA auf CD3-T-Zellen der CBMCs in Abhängigkeit vom Malariastatus *ex vivo*

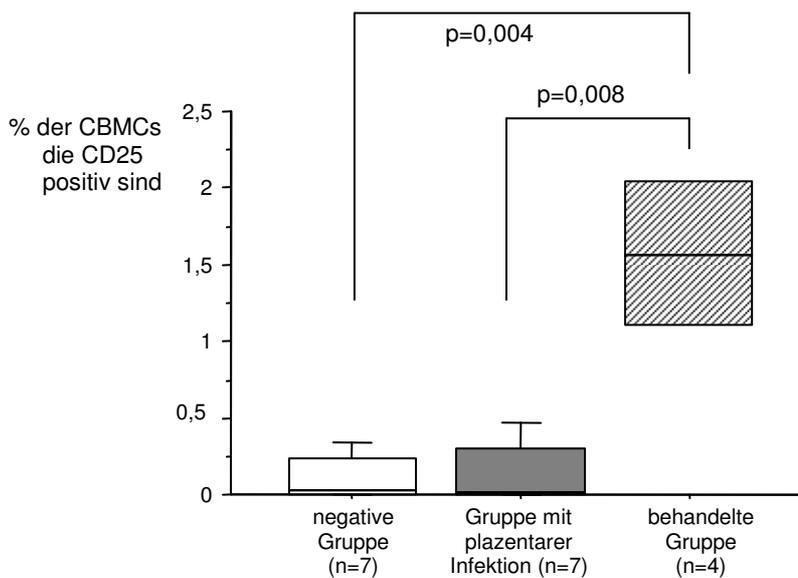
Es gab auch signifikante Unterschiede beim direkten Vergleich der Isoformen CD45RA und CD45RO auf den CD3-T-Zellen (Abb. 3.7) : Auf PBMCs wurde die aktivierte Form häufiger als die naive Isoform exprimiert ( $p=0,007$ ), während auf CBMCs das gegenteilige Verhältnis zu finden war ( $p<0,001$ ). Aufgeteilt nach den verschiedenen Malariagruppen waren diese Unterschiede für CD3<sup>+</sup> CBMCs bei allen drei Gruppen signifikant (negative Gruppe  $p=0,037$ , behandelte Gruppe  $p=0,021$ , plazentare Infektionsgruppe  $p=0,004$ ), während bei den Müttern nur in der negativen Gruppe genug Proben für eine signifikante Aussage vorhanden waren ( $p=0,021$ ).



**Abbildung 3.7** Isoformen CD45RA und CD45RO exprimiert auf CD3-T-Zellen

### 3.3.3 CD25

CD25 ist ein Aktivierungsmarker. Außerdem wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen als regulatorische T-Zellen in den CBMCs identifiziert, die zur Immunsuppression nach Malariaantigenkontakt *in utero* beitragen [34]. In unseren Untersuchungen wurden bei CD3<sup>+</sup> CBMCs der in der Schwangerschaft behandelten Gruppe *ex vivo* eine signifikant größere Menge an Zellen gefunden, die CD25 exprimierten (Abb. 3.8) - sowohl gegenüber der negativen Gruppe (p=0,004) als auch gegenüber der Gruppe mit plazentarer Malaria (p=0,008).



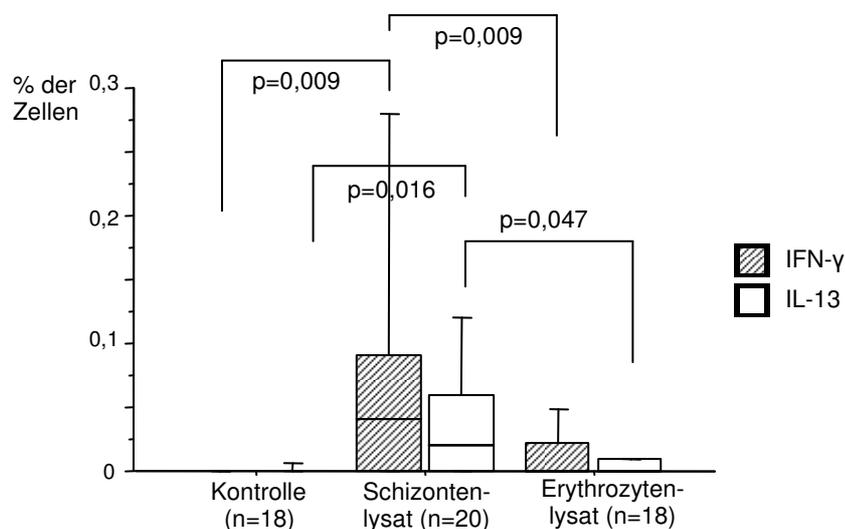
**Abbildung 3.8** CD25 exprimiert auf CD3<sup>+</sup> CBMCs unterteilt nach Malariastatus

### 3.3.4 IL-10 und IL-5

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin und IL-5 gehört zu den  $T_H1$ -Zytokinen. Bei beiden konnten nach der unspezifischen Stimulation keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Zytokinexpression und dem Malariastatus eruiert werden.

### 3.3.5 IFN- $\gamma$ und IL-13

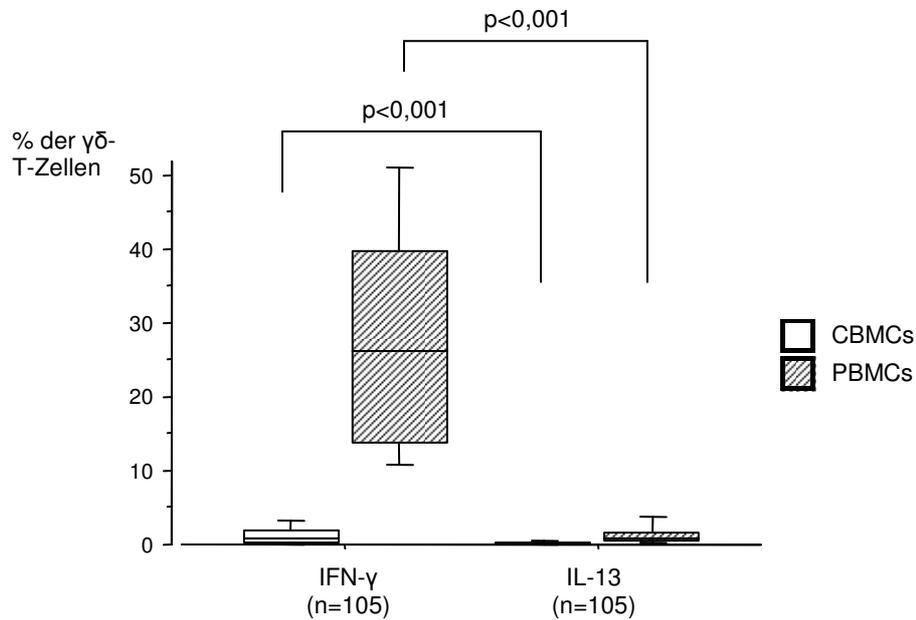
IFN- $\gamma$  und IL-13 sind Zytokine, die als repräsentativ für die  $T_H1$ -Zytokine (IFN- $\gamma$ ) und die  $T_H2$ -Zytokine (IL-13) gelten können. Nach der spezifischen Stimulation wurden diese Zytokine allgemein nur in einer sehr geringen Prozentzahl exprimiert (unter 1 %). Nach Stimulation mit Schizontenlysate zeigte von den  $CD3^+$  PMBCs nur die Gruppe mit plazentarer Malaria wie zu erwarten signifikant mehr für IFN- $\gamma$  und IL-13 positive Zellen im Vergleich mit dem Erythrozytenlysate und der Kontrolle (jeweils  $p=0,009$  bei IFN- $\gamma$ , bei IL-13  $p=0,047$  im Vergleich zum Erythrozytenlysate und  $p=0,016$  im Vergleich zur Kontrolle) (Abb. 3.9).



**Abbildung 3.9** IFN- $\gamma$  und IL-13 positive  $CD3^+$  PMBCs der Gruppe mit plazentarer Infektion nach den verschiedenen Kontrollstimulationen

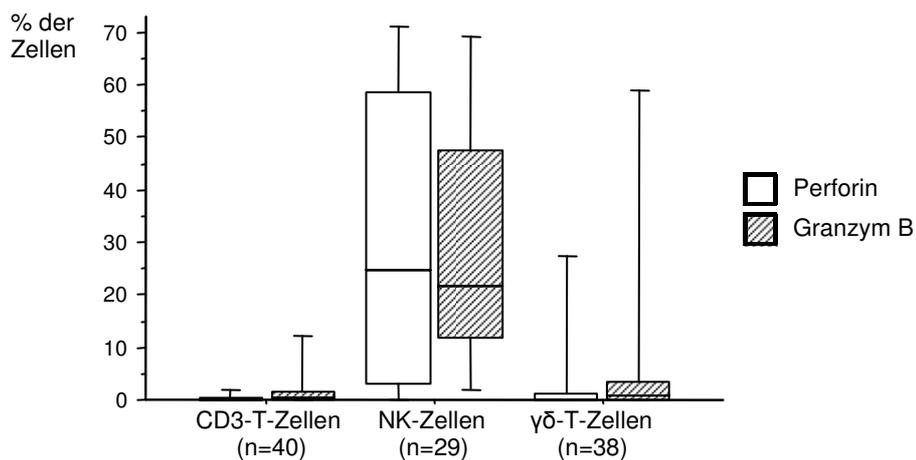
Von CBMCs standen oft nicht genug Proben für eine statistisch signifikante Aussage zur Verfügung. Bezüglich des Malariastatus wurde kein Zusammenhang gefunden. Zur Auswertung wurde von der zytokinexprimierenden Zellzahl nach Stimulation die Zellzahl nach Kontrolle mit Erythrozytenlysate abgezogen.

Nach unspezifischer Stimulation wurde von CD3-T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowohl des mütterlichen Bluts als auch des Nabelschnurbluts signifikant mehr IFN- $\gamma$  exprimiert als IL-13 (jeweils  $p < 0,001$ ) (Abb. 3.10).



**Abbildung 3.10** IFN- $\gamma$  und IL-13 Expression von  $\gamma\delta$ -T-Zellen der PBMCs und CBMCs nach unspezifischer Stimulation

### 3.3.6 Perforin und Granzym B



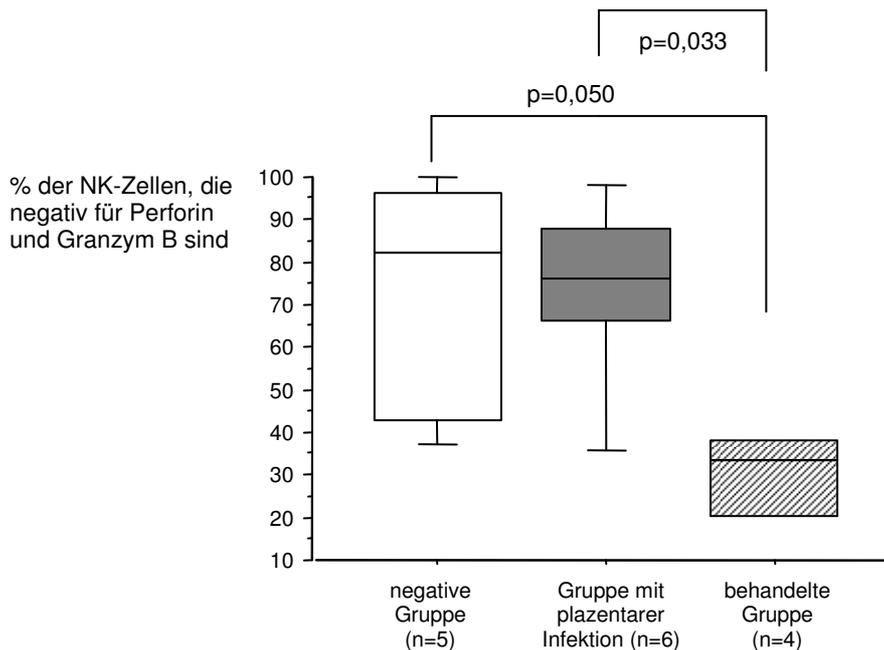
**Abbildung 3.11** Perforin- und Granzym B-positive NK-Zellen, CD3- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen *ex vivo*

Perforin und Granzym B sind in den lytischen Granula zytotoxischer T-Zellen und von NK-Zellen (festgelegt als CD3<sup>-</sup>CD94<sup>+</sup>) enthalten und bewirken

zusammen Zellyse. NK-Zellen exprimierten mehr Perforin und Granzym B als die CD3-T-Zellen und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen (jeweils  $p < 0,001$ ) (Abb. 3.11).

Grundsätzlich wurde *ex vivo* jeweils bei mehr Zellen Granzym B nachgewiesen als Perforin, dieses galt sowohl für CD3-T-Zellen ( $p = 0,042$ ) als auch für  $\gamma\delta$ -T-Zellen ( $p = 0,059$ ) und für CBMCs und PBMCs gleichermaßen. Bei NK-Zellen war diese Beziehung nur bei PBMCs signifikant ( $p = 0,041$ ). Im Übrigen konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Malariastatus nachgewiesen werden.

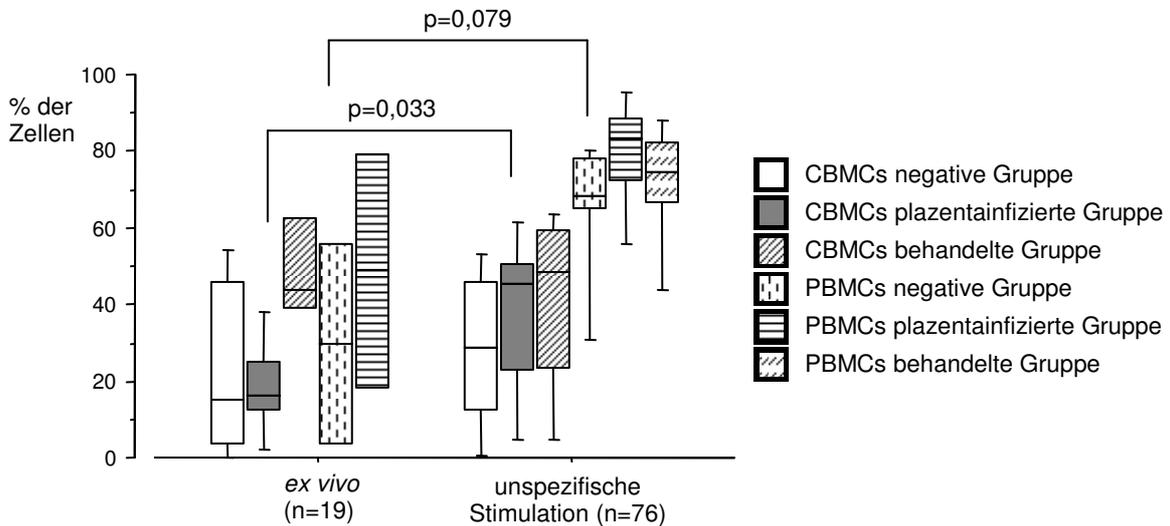
Beim Vergleich, wie viele Zellen eine oder beide Substanzen aufzeigten, fanden sich hauptsächlich Zellen, die sowohl für Granzym B als auch Perforin negativ waren. Von den NK-Zellen des Nabelschnurblutes gab es *ex vivo* Hinweise auf mehr für beide Substanzen negative Zellen in der negativen ( $p = 0,050$ ) und der plazentapositiven Gruppe ( $p = 0,033$ ) als in der behandelten Gruppe (Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12** Perforin- und Granzym B-negative NK-Zellen der CBMCs *ex vivo*

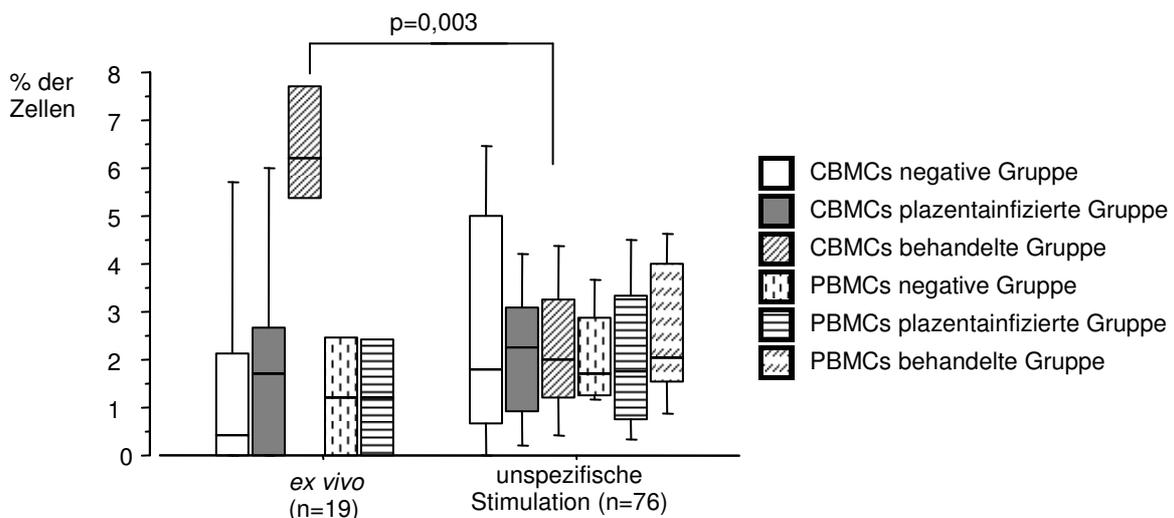
Im Rahmen der spezifischen Stimulation gab es nach Stimulation mit Schizontenlysat und Erythrozytenlysat kaum einen Unterschied beim Nachweis von zytotoxischen Substanzen in den Zellen, die Stimulation konnte also nicht ausgewertet werden.

Im Vergleich mit den Zellen *ex vivo* wurde in zwei Untergruppen der NK-Zellen nach unspezifischer Stimulation mehr Granzym B nachgewiesen (Abb. 3.13): Bei mütterlichen NK-Zellen in der negativen Gruppe ( $p=0,079$ ) und neonatalen NK-Zellen in der Gruppe mit placentarer Infektion ( $p=0,033$ ).



**Abbildung 3.13** Granzym B-positive NK-Zellen *ex vivo* und nach unspezifischer Stimulation

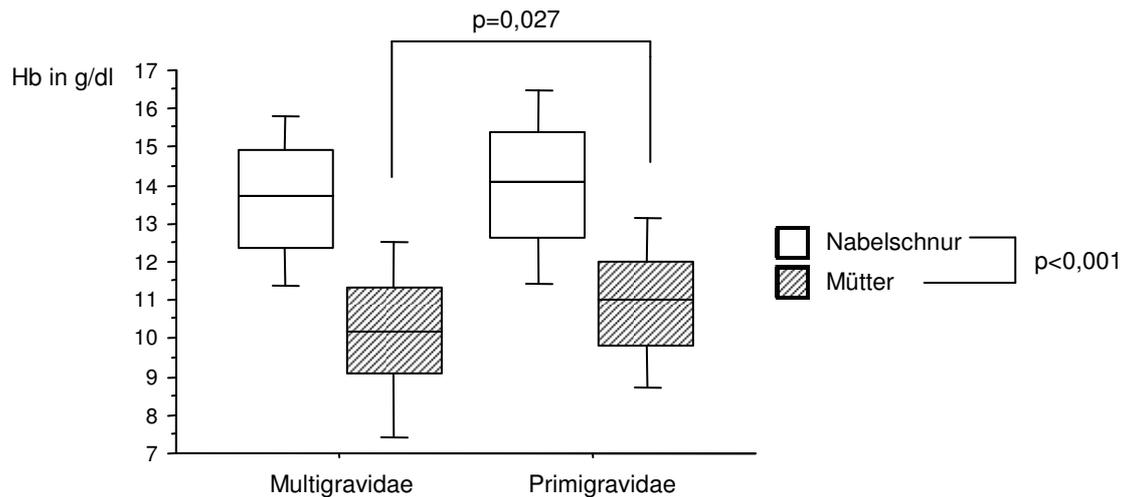
Die Perforinpositivität betreffend lagen in der behandelten Gruppe der CBMCs die Zellen *ex vivo* signifikant vor denen nach unspezifischer Stimulation ( $p=0,003$ ) (Abb. 3.14). In den übrigen Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied.



**Abbildung 3.14** Perforin-positive NK-Zellen *ex vivo* und nach unspezifischer Stimulation

### 3.4 Vergleich von PBMCs und CBMCs

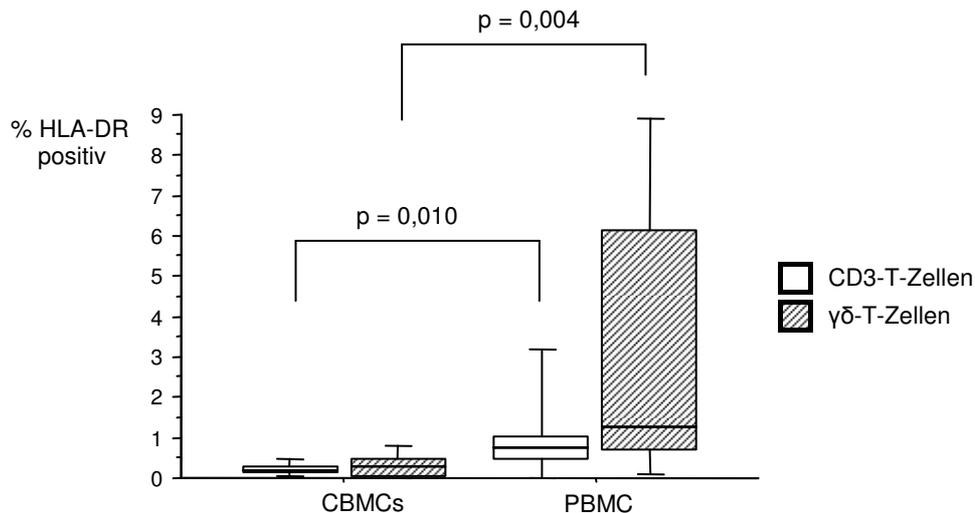
Erwartungsgemäß waren die Hämoglobinwerte beim Nabelschnurblut in allen drei Gruppen und sowohl bei Primi- als auch bei Multigravidae im Vergleich zum mütterlichen Blut signifikant erhöht (jeweils  $p < 0,001$ ) (Abb. 3.15).



**Abbildung 3.15** Hämoglobinwerte von Müttern und Nabelschnurblut

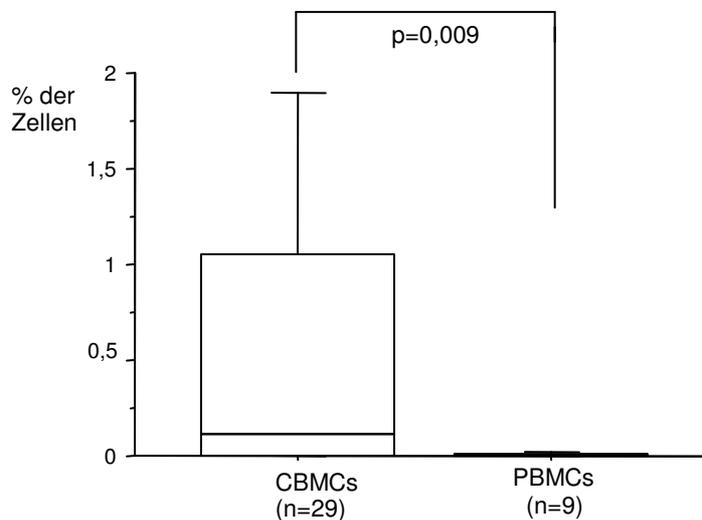
Auch die Lymphozytenwerte des Nabelschnurblutes waren im Vergleich zum mütterlichen Blut signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ) (Abb 3.3). PBMCs zeigten durchgehend eine höhere Prozentzahl an  $\gamma\delta$ -T-Zellen als CBMCs, aber dieser Zusammenhang war nur nach der plasmodienspezifischen Stimulation in der behandelten Gruppe ( $p = 0,014$ ) und in der Gruppe mit plazentarer Infektion ( $p < 0,001$ ) signifikant.

Beim Vergleich der Zytokine und Zelloberflächenmarker von  $CD3^+$  PBMCs und CBMCs wurde eine fast durchgehend konsistente Beobachtung gemacht: Sowohl bei den Zellen *ex vivo* als auch nach den verschiedenen Stimulationen bildeten die mütterlichen PBMCs signifikant mehr Zytokine und exprimierten mehr Oberflächenmarker als die CBMCs des Nabelschnurblutes. Als Beispiel soll ein Boxplot der Expression des Oberflächenmarkers HLA-DR auf PBMCs und CBMCs *ex vivo* dienen (Abb. 3.16).



**Abbildung 3.16** Expression von HLA-DR auf PBMCs und CBMCs *ex vivo*

Außerdem findet sich eine Übersicht der weiteren signifikanten Ergebnisse in diesem Vergleich in Tabelle 3.3. Nur bei CD45RA auf den CD3-T-Zellen *ex vivo* und bei CD25 wurde die gegenteilige Beobachtung gemacht (Abb. 3.17). CD25 wurde signifikant häufiger von CD3-T-Zellen der CBMCs als der PBMCs exprimiert ( $p=0,009$ ).



**Abbildung 3.17** CD25 exprimiert auf CD3-T-Zellen von PBMCs und CBMCs

Außerdem war die Perforin- und Granzym B-Expression der NK-Zellen der PBMCs und CBMCs nicht signifikant unterschiedlich - mit Ausnahme von Granzym B, welches nach unspezifischer Stimulation signifikant häufiger von den mütterlichen NK-Zellen exprimiert wurde (Tab. 3.3).

**Tabelle 3.3 Höhere Expression von Zytokinen und Oberflächenmarkern auf PBMCs im Vergleich zu CBMCs**  
(angegeben sind Median und Interquartil in Prozent der Gesamtzellen)

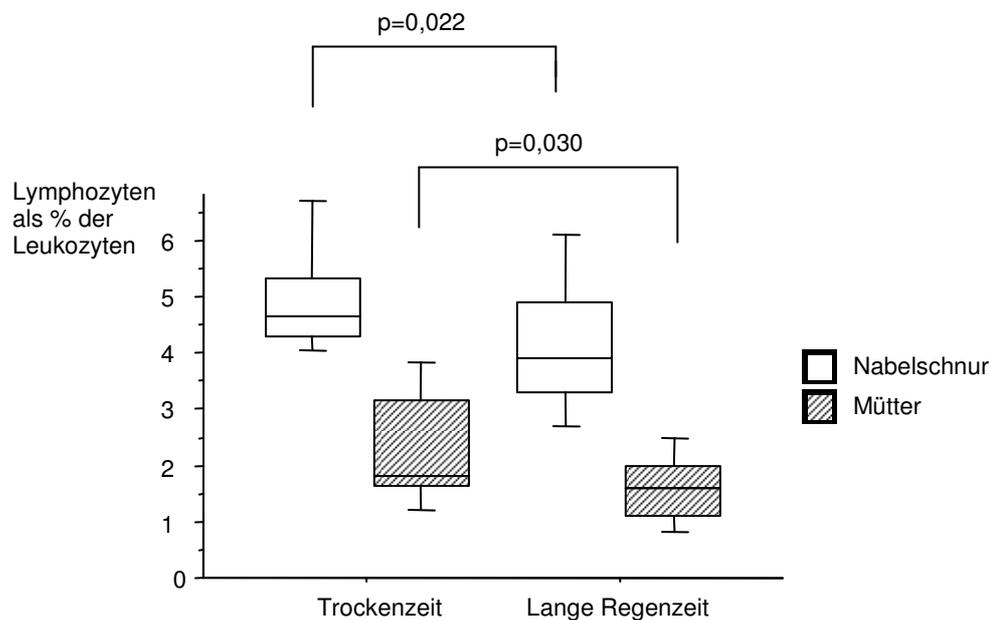
	CD3-T-Zellen				γδ-T-Zellen				NK-Zellen			
	PBMC	CBMC	n	p	PBMC	CBMC	N	p	PBMC	CBMC	n	p
<b>Zellen ex vivo</b>												
HLA-DR	0,7% - 0,5	0,2% - 0,2	41	0,010	1,3% - 5,4	0,3% - 0,4	34	0,004				
CD45RA	<b>19,7% - 17,7</b>	<b>30,1% - 26,3</b>	<b>39</b>	<b>0,140</b>	50,6% - 50,6	29,9% - 13,2	37	0,029				
CD45RO	47,7% - 22,8	4,21% - 4,8	39	<0,001	21,7% - 30,4	18,8% - 9,1	37	<b>0,356</b>				
Granzym	11,4% - 16,6	0,2% - 0,4	40	<0,001	60,6% - 43,9	0,4% - 1,2	38	<0,001	55,8% - 59,4	20,7% - 31,4	29	<b>0,248</b>
Perforin	0,6% - 6,3	0,1% - 0,2	40	0,010	14,2% - 33,1	0,1% - 0,4	38	0,005	24,2% - 34,6	30,1% - 53,1	29	<b>0,453</b>
<b>Plasmodienspezifische Stimulation</b>												
IFN-γ	0,07% - 0,15	0,0% - 0,0	44	<0,001								
IL-13	0,00% - 0,02	0,0% - 0,003	44	0,037								
<b>Unspezifische Stimulation</b>												
IFN-γ	17,2% - 10,4	0,1% - 0,2	113	<0,001	26,2% - 26,2	0,9% - 1,7	105	<0,001				
IL-13	2,5% - 1,7	0,02% - 0,03	113	<0,001	0,7% - 1,2	0,05% - 0,2	105	<0,001				
IL-10 *	0,2% - 0,4	0,01% - 0,02	107	<0,001	0,0% - 0,01	0,0% - 0,0	107	0,044				
IL-5	0,1% - 0,3	0,0% - 0,0	110	<0,001	0,2% - 0,5	0,0% - 0,01	110	<0,001				
HLA-DR	0,8% - 0,6	0,2% - 0,3	110	<0,001	1,4% - 1,8	0,2% - 0,6	105	<0,001	1,7% - 2,8	0,06% - 0,3	96	<0,001
CD45RA	20,5% - 21,3	15,8% - 24,0	113	<b>0,301</b>	32,2% - 32,7	17,7% - 16,8	110	<0,001				
CD45RO	37,2% - 17,6	3,2% - 3,7	113	<0,001	25,3% - 22,1	18,0% - 12,9	110	0,014				
Granzym	7,4% - 6,8	0,3% - 0,5	121	<0,001	32,0% - 16,5	0,4% - 1,0	114	<0,001	74,4% - 17,0	34,6% - 38,7	100	<0,001
Perforin	0,4% - 0,7	0,1% - 0,2	121	<0,001	5,9% - 12,7	0,2% - 0,5	114	<0,001	18,7% - 22,1	19,7% - 27,2	100	<b>0,605</b>

**dick gedruckt** – statistisch nicht signifikant bzw. umgekehrtes Verhältnis

\* in diesem Fall CD3-T-Zellen ohne γδ-T-Zellen

### 3.5 Zusammenhang zwischen Jahreszeit und Zytokinproduktion

Die Lymphozytenanzahl betreffend wurde ein Zusammenhang mit den Jahreszeiten festgestellt (Abb. 3.18). Bei Müttern, die in der Trockenzeit entbunden haben, fanden sich sowohl im mütterlichen als auch im Nabelschnurblut signifikant mehr Lymphozyten als Anteil der Leukozyten als bei dem entsprechenden Blut von Müttern, deren Entbindungszeitpunkt in der langen Regenzeit lag ( $p=0,030$  bzw.  $p=0,022$ ).



**Abbildung 3.18** Lymphozytenwerte in Abhängigkeit von der Jahreszeit

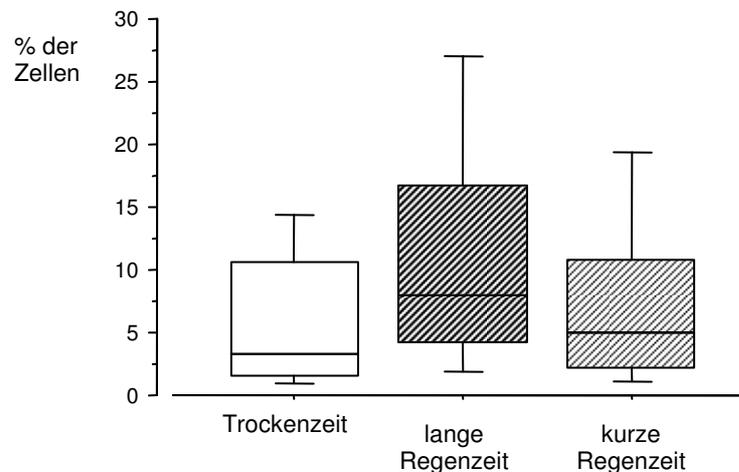
Die Fälle, in denen ein signifikanter Unterschied oder ein Trend in der Zytokinproduktion in Abhängigkeit von der Jahreszeit gefunden werden konnte, sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Bis auf wenige Ausnahmen konnte nach den verschiedenen Stimulationen eine höhere Expression in der langen Regenzeit gegenüber der kurzen Regenzeit und der Trockenzeit sowie eine höhere Expression in der kurzen Regenzeit gegenüber der Trockenzeit ausgemacht werden - unabhängig vom Malariastatus (Lange Regenzeit > Kurze Regenzeit > Trockenzeit). Oft gab es bei den PBMCs nicht genug Proben für eine signifikante Aussage.

**Tabelle 3.4** Expression von Zytokinen und Oberflächenmarkern in Abhängigkeit von der Jahreszeit, wobei T für Trockenzeit, LR für Lange Regenzeit und KR für Kurze Regenzeit steht

(**dick gedruckt** sind nicht dem üblichen Muster folgende Zusammenhänge)

<b>ex vivo</b>					
CD25	CD3	CBMCs	n=29	p<0,001	<b>T &gt; LR</b>
	γδ	CBMCs	n=28	p<0,001	<b>T &gt; LR</b>
<b>unspezifische Stimulation</b>					
HLA-DR	CD3	CBMCs	n=66	p=0,001	<b>KR &gt; LR &gt; T</b>
	CD3	PBMCs	n=34	p=0,033	LR > T
	CD3	PBMCs	n=19	p=0,008	KR > T
CD45RO	CD3	CBMCs	n=67	p<0,001	LR > KR > T
CD45RA	CD3	CBMCs	n=54	p<0,001	LR > T
	CD3	CBMCs	n=54	p<0,001	LR > KR
	γδ	CBMCs	n=54	p<0,001	LR > KR
	γδ	CBMCs	n=26	p=0,003	<b>T &gt; KR</b>
	γδ	PBMCs	n=34	p=0,004	<b>T &gt; LR</b>
	γδ	PBMCs	n=17	p=0,012	<b>T &gt; KR</b>
IFN-γ	CD3	CBMCs	n=67	p<0,001	<b>LR &gt; T &gt; KR</b>
	γδ	CBMCs	n=48	p<0,001	LR > KR
	γδ	CBMCs	n=25	p<0,001	<b>T &gt; KR</b>
IL-13	CD3	CBMCs	n=55	p=0,002	LR > T
	CD3	CBMCs	n=54	p=0,014	LR > KR
IL-10	CD3	CBMCs	n=22	p=0,005	LR > T
	CD3	CBMCs	n=42	p=0,033	LR > KR
	CD3	PBMCs	n=38	p=0,017	LR > T
	γδ	PBMCs	n=22	p=0,038	LR > T
IL-5	CD3	PBMCs	n=34	p=0,004	LR > T

Als Beispiel soll die CD45RO-Expression auf CD3-T-Zellen der CBMCs nach unspezifischer Stimulation dargestellt werden (p<0,001) (Abb. 3.19).



**Abbildung 3.19** CD45RO-Expression auf CD3-T-Zellen von CBMCs nach unspezifischer Stimulation in Bezug zur Jahreszeit

### 3.6 Zusammenfassung

Abschließend lassen sich die Ergebnisse in drei Bereiche zusammenfassen: In Bezug auf den Malariastatus konnten bei der Zytokinexpression und den Oberflächenmarkern nach Stimulation nur vereinzelt statistisch signifikante Aussagen gemacht werden. In den meisten Fällen waren die Zellzahlen zu gering, um so einen Zusammenhang zwischen dem Malariastatus und der Expression der verschiedenen Marker herzustellen. Besonders bei der spezifischen Stimulation gab es nur sehr wenige Zellen für die Auswertung und allgemein nur eine geringe Immunreaktion der T-Zellen. Auch im Nabelschnurblut waren nicht immer genug Zellen für eine adäquate Messung.

Des Weiteren konnte die hauptsächlichliche konsistente Beobachtung beim Vergleich der Reaktion der PBMCs und der CBMCs auf die verschiedenen Stimulationen gemacht werden. Bei den mütterlichen PBMCs war die Zytokinproduktion und die Expression von Oberflächenmarker generell im Vergleich zum Nabelschnurblut signifikant erhöht. Eine Ausnahme gab es nur bei den NK-Zellen.

Unabhängig vom Malariastatus wurde auch ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Zytokinproduktion und der Jahreszeit beobachtet. In der langen Regenzeit zeigten die T-Zellen allgemein nach den verschiedenen Stimulationen eine stärkere Aktivierungsreaktion als in der kurzen Regenzeit und hier wiederum mehr als in der Trockenzeit.

## 4 Diskussion

### 4.1 Klinische Aussagen und Hämatologie

Das Geburtsgewicht der Neugeborenen der Primigravidae lag erwartungsgemäß unter dem der Multigravidae und ebenso zu erwarten war der Befund, dass innerhalb der Primigravidae die Neugeborenen der negativen Gruppe ein höheres Geburtsgewicht hatten, als die Gruppen, die in der Schwangerschaft oder unter der Geburt eine *P. falciparum* Infektion hatten [87].

Der Zusammenhang zwischen der Blutgruppe 0 und einem erhöhten Risiko für plazentare Malaria bei Primigravidae sowie einem reduzierten Risiko für Multigravidae, wie von Senga, Loscertales und Brabin sowohl für Gebiete mit saisonaler als auch mit ganzjähriger Malariaübertragung vorbeschrieben [144, 220], konnte nicht bestätigt werden. Es mögen aber die zu geringen Fallzahlen in unserem Fall die Erklärung dafür liefern.

Den Hämoglobinwert betreffend war bei den Neugeborenen kein Zusammenhang mit dem mütterlichen Malariastatus festzustellen, wie auch von Abrams *et al.* bereits berichtet; Malaria der Mutter während der Schwangerschaft scheint also keine negativen Auswirkungen auf den Hämoglobinwert beim Neugeborenen zu haben. Allgemein war jedoch wie erwartet der Hb-Wert im Nabelschnurblut insgesamt höher als bei den Müttern [11]. Bei den Primigravidae hatten die Mütter mit behandelter Malaria in der Schwangerschaft nach der Geburt höhere Hb-Werte aufzuweisen als die Mütter, die zum Geburtszeitpunkt infiziert waren; eine Beobachtung, die bestätigt, dass Hb-Werte sich wieder verbessern können, wenn *P. falciparum* Malaria in der Schwangerschaft behandelt wird. Insgesamt waren die Hb-Werte der Primigravidae signifikant höher als die der Multigravidae. McGregor beobachtete schon 1984, dass Primigravidae, die keine Malaria hatten, höhere Hb-Werte hatten als Multigravidae [155]. Sukzessive Schwangerschaften scheinen also den postpartalen Hämoglobinwert unabhängig von Malaria zu erniedrigen.

Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen betreffend wurden nach der spezifischen Stimulation sowohl bei den PBMCs als auch bei den CBMCs signifikant mehr Zellen in der Gruppe mit plazentarer Infektion unter der Geburt als in der negativen Gruppe nachgewiesen, was bestätigt, dass diese Zellen durch Malaria induziert werden. Obwohl auch bekannt ist, dass Individuen nach wiederholten *P. falciparum* Infektionen in endemischen Gebieten effizientere Immunmechanismen entwickeln und  $\gamma\delta$ -T-Zellen herunterregulieren können [281] - eine Beobachtung, die vielleicht nicht auf Schwangere zutrifft.

Nach der unspezifischen Stimulation der CBMCs fanden sich mehr  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der plazentapositiven Gruppe als in der behandelten Gruppe. Die Behandlung der Mutter in der Schwangerschaft scheint also bei den Neugeborenen zu keiner erhöhten  $\gamma\delta$ -T-Zellproduktion zu führen. Das widerspricht den vorherigen Ergebnissen dieser Gruppe, in der die behandelte Gruppe signifikant mehr Zellen nachwies [66] und spricht eher für eine Abschwächung der unspezifischen neonatalen Immunantwort nach behandelter Malaria in der Schwangerschaft. Allerdings konnte der HIV-Status der Mütter nicht erfasst werden. Der Einfluss von einer HIV-Infektion auf die Immunantwort auf *P. falciparum* ist bekannt (siehe 1.6.2.1 und 1.6.6.2) [199, 206]. Die Zytokinantwort von PBMCs, die mit Plasmodienantigenen stimuliert wurden, ist auch bei AIDS-Patienten erhalten [165], aber es finden sich innerhalb der PBMCs bei einer aktiven HIV-1-Infektion weniger V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2-Zellen [43].

## 4.2 Expression spezifischer Oberflächenmarker und Zytokine

### 4.2.1 Allgemeines

Durch die geringen Zellzahlen konnten selbst einige Aussagen, die durch einen prinzipiell gleichen Versuchsaufbau in dem gleichen Forschungslabor gemacht wurden, nicht bestätigt werden. Ein Beispiel sei die im vorigen Abschnitt genannte Inkonsistenz der Ergebnisse die  $\gamma\delta$ -T-Zellen betreffend. Auch bekannte Unterschiede in der Reaktion von Primigravidae und Multigravidae waren kaum

reproduzierbar. Daher ist anzunehmen, dass fehlende Bestätigungen vorheriger Aussagen und fehlende signifikante Ergebnisse nicht unbedingt bedeuten, dass es keine Unterschiede gibt, sondern dass die Zahlen möglicherweise zu gering für eine Aussage waren.

Besonders nach der Stimulation mit Schizontenlysat war das der Fall. Mehrere Veröffentlichungen belegen, dass PBMCs schneller und intensiver durch lebende infizierte Erythrozyten stimuliert werden als durch Schizontenlysat [18, 93], aber das Aufrechterhalten einer *P. falciparum* Kultur in Gabun ist mit erhöhten logistischen Schwierigkeiten verbunden. Es wäre zudem eine Zellanalyse mithilfe der Durchflusszytometrie vor Ort anzustreben, da das Fixieren der Zellen und der nachfolgende Transport möglicherweise einen Verlust an Zellen bedingen. Allerdings ist auch die Instandhaltung eines FACS-Gerätes in Gabun aus logistischen Gründen mit weit größeren Schwierigkeiten verbunden als in Deutschland.

Einige Faktoren konnten in der Studie nicht erfasst werden, könnten aber eine Auswirkung auf die Zytokinproduktion haben. Um alle Faktoren mit einzu-beziehen, müsste eine weit größere Probenzahl analysiert werden. Außer dem HIV-Status der Mütter gehören zu diesen Faktoren Co-Infektionen mit anderen - besonders parasitären - Infektionskrankheiten, wie gastrointestinalen Wurmerkrankungen. Es ist bekannt, dass Infektionen mit Helminthen eine  $T_H2$ -Antwort hervorrufen [106]. Auch das Vorhandensein von HbS könnte eine Rolle spielen [138], konnte aber nicht erfasst werden.

#### **4.2.2 HLA-DR**

Der späte Aktivierungsmarker HLA-DR zeigte in seiner Expression allgemein keinen Zusammenhang mit dem Malariastatus und auch nach unspezifischer Stimulation gab es im Vergleich mit den *ex vivo* Zellen keine signifikanten Unterschiede - die Stimulation hat also die Expression von HLA-DR nicht verändert. Bei den Neugeborenen der Mütter mit PAM ist eine geringere Lymphoproliferation und pro-inflammatorische Zytokinproduktion als Reaktion

auf erneuten Kontakt mit Malariaantigenen bekannt [112, 196]. Dass sich in dieser Arbeit auf den neonatalen  $\gamma\delta$ -T-Zellen nach PAM und unspezifischer Stimulation jedoch mehr HLA-DR nachweisen ließ als auf den Zellen in der behandelten Gruppe, scheint also einen Widerspruch darzustellen zu der Beobachtung, dass die Zellen der behandelten Gruppe in einer vorangegangenen Studie in diesem Vergleich mehr  $T_H1$ -Zytokine aufwiesen [66]. HLA-DR wurde in dieser Studie allerdings nicht untersucht und da es sich um einen Aktivierungsmarker handelt, ist nachzuvollziehen, dass dieser bei einer akuten Infektion leichter erneut exprimiert wird als nach einer schon länger zurückliegenden Infektion in der Schwangerschaft. Die Immunsuppression bei PAM wird auch nicht obligat durch HLA-DR widergespiegelt.

#### 4.2.3 CD45

Auf den *ex vivo* CD3-T-Zellen des Nabelschnurblutes fand sich in der Gruppe mit placentarer Infektion mehr naives CD45RA als in der negativen Gruppe, was eine verminderte Aktivierung des fetalen Immunsystems bei placentarer Malaria der Mutter unterstreicht. Im Nabelschnurblut wurde insgesamt in allen drei Gruppen mehr des naiven Isotyps CD45RA als CD45RO gefunden - ebenso wie Juretic *et al.* es bei europäischen Neugeborenen beobachtet haben, allerdings mit jeweils höheren Prozentzahlen [124]. Unabhängig von der Malariainfektion der Mütter scheinen die Neugeborenen im Hinblick auf CD45 ihrer Lymphozyten keine starke Aktivierung aufzuweisen. Auch Hannel *et al.* bestätigen 91% CD94RA<sup>+</sup> CD4-T-Zellen bei weißen Neugeborenen, mit zunehmendem Alter fallen diese Anteile ab; Erwachsene zeigen mehr CD45RO<sup>+</sup> CD4-T-Zellen [50, 90]. Bei den Müttern wurde dementsprechend in dieser Studie auch das gegenteilige Verhältnis zum Nabelschnurblut festgestellt. Juretic *et al.* fanden jedoch nach Geburt auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen von Müttern mehr CD45RA, allerdings gab es dabei bei CD4<sup>+</sup> Zellen kaum einen Unterschied zwischen den Isoformen, bei CD8<sup>+</sup> Zellen jedoch deutlich mehr CD45RA. Dies wurde in Zusammenhang gesehen mit der Stresssituation bei Wehentätigkeit und der immunologischen sowie hormonellen Umstellung bei der Geburt. Die Diskrepanz zu unseren Beobachtungen lässt sich vielleicht

dadurch erklären, dass es sich um eine andere Population handelt und dass Schwangere in Afrika oft vermehrt parasitischen Infektionen ausgesetzt sind, die allgemein zu einer Aktivierung der Lymphozyten führen könnten, sowie Afrikaner allgemein auch mehr Zytokine produzieren als Europäer [273].

#### 4.2.4 CD25

Nach unspezifischer Stimulation wurde von Engelmann *et al.* in Gabun gezeigt, dass in der behandelten Gruppe am meisten CD25<sup>+</sup> T-Zellen unter den CD3-T-Zellen und den  $\gamma\delta$ -T-Zellen nachzuweisen waren [66]. Das stimmt mit unseren Ergebnissen *ex vivo* überein, dass die CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Gesamtheit der CD3<sup>+</sup> CBMCs in der Gruppe der behandelten Mütter im Vergleich mit den anderen Gruppen überwogen. Von Brustoski *et al.* wurde beschrieben, dass sich nach spezifischer Stimulation in dieser Gruppe erhöhte Anzahlen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in den CBMCs nachweisen ließen [34]. In der Studie wurde gezeigt, dass die *in utero* Immunsuppression bei PAM der Mutter durch IL-10 von regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>R</sub>1-Zellen) über verminderte IFN- $\gamma$ -Produktion der CD8-T-Zellen vermittelt wird, welche die Aktivierung der T-Zellen normalerweise anregt. Bei den Daten unserer Arbeit fällt auf, dass CD25 als einer der einzigen Marker allgemein mehr auf den CBMCs als auf PBMCs exprimiert wird. Diese Diskrepanz kann sich also dadurch erklären, dass unter anderem durch den erhöhten Anteil an CD25<sup>+</sup> T-Zellen die anderen neonatalen Marker im Vergleich zur Mutter supprimiert werden. Diese Immunsuppression wurde zuvor trotz erhöhter Aktivierungsmarker der CBMCs nach Stimulation auch in der behandelten Gruppe nachgewiesen [34].

#### 4.2.5 IFN- $\gamma$ und IL-13

IFN- $\gamma$  und IL-13 können als Repräsentanten der T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Zytokine behandelt werden. Im Vorfeld gab es viele - teils auch widersprüchliche - Aussagen zum Einfluss der PAM auf die neonatale Zytokinproduktion (siehe 1.6.7.2). Weder nach Stimulation mit Plasmodien noch nach unspezifischer Stimulation konnten in dieser Studie signifikante Unterschiede in der Menge dieser Zytokine im Zusammenhang mit dem Malariastatus festgestellt werden.

Unabhängig vom Malariastatus überwogen nach unspezifischer Stimulation bei Müttern ebenso wie bei Neugeborenen im direkten Vergleich der Zytokine die IFN- $\gamma$ -positiven Zellen. Allgemein scheinen diese Ergebnisse zu bestätigen, dass sowohl das mütterliche als auch das neonatale Immunsystem auf Stimulation mit pro-inflammatorischer Zytokinproduktion reagieren können.

#### 4.2.6 Perforin und Granzym B

Die zytotoxischen Substanzen Perforin und Granzym B vermitteln die lytische Funktion von NK-Zellen, CD8- und  $\gamma\delta$ -T-Zellen [56, 117, 153]. Die Produktion von Granzymen im erythrozytären Stadium der Malaria spiegelt die Aktivierung von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen wieder [94]. Auch in NK-Zellen des Nabelschnurblutes wurde Perforin nachgewiesen [24]. Nach Stimulation von NK-Zellen mit plasmodieninfizierten Erythrozyten wurden bereits Perforin und Granzym A nachgewiesen, allerdings mit großen interindividuellen Unterschieden [128]. Beide Substanzen finden sich auch bei CD4-T-Zellen [24, 42].

In der behandelten Gruppe der NK-Zellen des Nabelschnurblutes gab es *ex vivo* weniger für beide zytotoxischen Substanzen negative Zellen als in der negativen und plazentapositiven Gruppe. Nach Behandlung von Malaria in der Schwangerschaft scheint die zytotoxische Reaktion der neonatalen NK-Zellen gegenüber den anderen Gruppen zunächst also gestärkt. Die Neugeborenen von behandelten Müttern reagierten in anderen Studien auf unspezifische und spezifische Stimulation pro-inflammatorisch [426, 427, 443], nach der unspezifischen Stimulation zeigt sich hier jedoch in der behandelten Gruppe bei den Neugeborenen ein verminderter Perforinnachweis. Möglicherweise ist aber der Einfluss einer vorangehenden Behandlung in der Schwangerschaft auf die Produktion inflammatorischer Zytokine nicht gleichbedeutend mit dem Einfluss auf die Produktion zytotoxischer Substanzen. Es gibt Hinweise dafür, dass malarianaive NK-Zellen entweder mit einer zytotoxischen Reaktion oder mit IFN- $\gamma$ -Produktion auf Stimulation reagieren [128]. Auch der Einfluss von PAM bei Geburt auf die Anzahl von T-Zellen mit zytotoxischen Substanzen scheint gegenläufig des Einflusses von PAM auf die Produktion inflammatorischer

Zytokine. Bei PAM unter Geburt sind neonatale T-Zellen in ihrer Reaktion auf erneute Stimulation eher geschwächt (siehe 4.2.2), nach unspezifischer Simulation waren hier jedoch signifikant mehr Zellen positiv für Granzym B als *ex vivo*. Es könnte also postuliert werden, dass eine behandelte Malaria tropica in der Schwangerschaft die allgemeine zytotoxische Reaktion stärkt, bei erneutem Antigenkontakt dieselbe Reaktion jedoch eher schwächer ausfällt. Möglicherweise liegt das daran, dass die Speicher für zytotoxische Substanzen unter einer Infektion zunächst aufgefüllt werden (sowohl bei PAM als auch nach Behandlung), bei erneuter Stimulation werden sie dann jedoch ausgeschüttet, so dass nach einigen Stunden weniger Perforin nachweisbar ist. Allerdings wurde bei PAM nach Stimulation vermehrt Granzym ausgeschüttet. Möglicherweise reagieren Perforin und Granzym aber nicht immer simultan. Da diese Beobachtungen jedoch nicht in allen Untergruppen und bei beiden zytotoxischen Substanzen konsistent waren, müssten Studien mit größeren Fallzahlen und Zellzahlen bei der spezifischen Stimulation geplant werden.

### 4.3 Unterschiede im mütterlichen und neonatalen Immunsystem

Wie zu erwarten war, wurde bei den Lymphozyten im Nabelschnurblut *ex vivo* ein signifikant höherer Anteil als im mütterlichen Blut gemessen [41]. Bei allen die Aktivierung des Immunsystems widerspiegelnden Substanzen wurde jedoch eine deutlich höhere Expression auf den mütterlichen CD3<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$ -T-Zellen der PBMCs als auf den entsprechenden CBMCs gefunden und das traf konsistent für alle Stimulationen zu, wie der Tabelle 3.3 zu entnehmen ist. Die beiden dort aufgeführten Ausnahmen CD25 und CD45RA stellen immunsupprimierende bzw. naive Oberflächenmarker dar.

Mehrere Autoren haben bereits in verschiedenen Zusammenhängen und nach unterschiedlichen Stimulationen diese Beobachtung gemacht: Allgemein findet sich wenig HLA-DR bei Neugeborenen, der Marker steigt mit dem Alter wohl durch die vermehrte Antigeneinwirkung an [90]. In Israel wurde im Nabelschnur-

blut eine geringere Lymphoproliferation auf unspezifische Stimulation als bei den Müttern beschrieben [62]. Der gleiche Zusammenhang trifft auch für pro- ebenso wie für anti-inflammatorische Zytokine von T-Zellen und NK-Zellen zu [46]. Nach unspezifischer Stimulation wurden Zytokine in verschiedenen Studien gemessen und jeweils signifikant weniger Zytokine im Nabelschnurblut gefunden: IFN- $\gamma$  auf CD4-T-Zellen in Italien [129], IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-2 in Belgien [212], ebenso wie in Californien [53] und IFN- $\gamma$ , IL-1 und TNF- $\alpha$  in Australien - hier zeigte sich jedoch für HLA-DR, IL-6 und IL-10 kein Unterschied zwischen Nabelschnur- und adultem Blut [89, 102]. Das bestätigte sich für IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 in einer italienischen Studie [129]. Durch verbesserte Co-Stimulation können auch neonatale Zellen adulte Zytokinmengen produzieren, diese Kapazität fehlt ihnen also nicht intrinsisch [14, 44]. Eine mögliche Erklärung betrifft nach Adkins *et al.* die vermehrten T-Gedächtniszellen, die sich in adulten PBMCs befinden und die Zytokinproduktion verstärken könnten [15]. Die cAMP Hypothese vermutet dagegen, dass die unterschiedliche Zytokinproduktion bei Neugeborenen (mehr IL-6 und IL-10 als Erwachsene, aber weniger IFN- $\gamma$  und TNF) auf den vermehrten intrazellulären Gehalt von cAMP in Monozyten und APCs zurückzuführen ist [142].

Diese Ergebnisse gelten jedoch für Populationen in westlichen Industrieländern. In unserer afrikanischen Population in Gabun konnten die Beobachtungen aus Australien und Italien nicht bestätigt werden. Hier fand sich auch bei HLA-DR, IL-5 und IL-13 (und teilweise bei IL-10) bei den CD3-T-Zellen und den  $\gamma\delta$ -T-Zellen der Neugeborenen eine signifikant geringere Expression. Tsegaye *et al.* haben bereits auf die unterschiedliche Distribution von Lymphozytenuntergruppen in verschiedenen Populationen (Europäer, Westafrikaner und Ostafrikaner) hingewiesen [255] und erwachsene Äthiopier haben signifikant weniger CD4-T-Zellen als Holländer. Bei Neugeborenen sind die Zahlen jedoch gleich. Tsegaye *et al.* schlossen deshalb, dass sich Unterschiede im Immunsystem der Afrikaner durch die Umwelteinwirkung ausbilden [255]. Wilfing *et al.* konnte auch unterschiedliche Zytokinproduktion nachweisen [273]: Afrikaner produzierten allgemein mehr Zytokine als Europäer und im

Besonderen mehr der  $T_H2$ -Zytokine IL-4 und IL-13, was sich durch die vermehrte Konfrontation mit parasitären Infektionen erklärt. Aufgrund dieser Beobachtungen können Studienergebnisse auch innerhalb Afrikas nicht automatisch auf andere Populationen übertragen werden. Der höhere Infektionsdruck im Vergleich mit westlichen Ländern dürfte auch unseren abweichenden Beobachtungen zugrunde liegen.

In Bezug auf *P. falciparum* (siehe 1.6.7.2) wurden noch widersprüchliche Beobachtungen zur Lymphoproliferation und Zytokinproduktion gemacht [73, 127, 148, 196]. Zwei Studien benutzten nur mikroskopische Malariadiagnostik und keine PCR. Es ist also möglich, dass falsche Einstufungen in die jeweiligen Kategorien die Ergebnisse verfälscht haben [73, 196]. Nach Vollblutstimulation von Nabelschnurblut mit Lipopolysacchariden in Belgien konnten im Plasma ähnliche Zytokinmengen wie bei Erwachsenen gemessen werden [219]. Es könnte also postuliert werden, dass die Lymphozytose bei Neugeborenen die mangelnde Zytokinproduktion der einzelnen Zellen zu kompensieren scheint, so dass im Endeffekt im Vollblut ähnliche Zytokinmengen nachzuweisen sind. Ein Modell der Vollblutstimulation trägt eher den komplexen Interaktionen im Immunsystem Rechnung - ohne sie jedoch genau beschreiben zu können. Im Vergleich mit adulten Patienten wurde in Gabun bei Kindern mit akuter *P. falciparum* Malaria nachgewiesen, dass diese mehr zytokinproduzierende T-Zellen (anti- und pro-inflammatorisch: IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13) aufweisen. Nabelschnurblut wurde hier jedoch nicht untersucht [276].

Man muss zudem auch festhalten, dass nur bei wenigen Studien (in Israel [62], Gambia [196] und Kenia [148]) wie in dieser Arbeit der Vergleich zwischen Nabelschnurblut und mütterlichem Blut statt allgemein adulten PMBCs durchgeführt wurde. Schwangere zeigen gegenüber anderen Erwachsenen bereits eine verminderte Zytotoxizität [24] und während der Schwangerschaft und der Geburt sind veränderte Lymphozytenpopulationen und Zytokinprofile bekannt [14] (siehe 1.6.6.1). Durch Vergleich mit den Müttern lag in dieser

Studie bei beiden Probandengruppen die gleiche veränderte physiologische Umgebung zum Beispiel durch Cortisol und Östrogen vor.

Wir können also für die spezifische untersuchte Population in Gabun postulieren, dass die Neugeborenen gegenüber den Müttern funktionell unreife CD3-T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen. Möglicherweise kompensiert die signifikant erhöhte Menge der Nabelschnurlymphozyten genau diese Tatsache. Auch wenn es viele Hinweise auf ein priming mit *P. falciparum in utero* gibt (siehe 1.6.7.2), kann davon ausgegangen werden, dass der Kontakt, den der Fetus mit Plasmodienantigenen hat, sehr viel geringer ist als der der Mutter. Nur lösliche Antigene und möglicherweise erythrozytäre Formen können in den fetalen Kreislauf gelangen, nicht aber z.B. die Leberformen. Zudem wird die Konzentration an Antigenen dort sehr viel geringer sein. Das könnte Teil der Erklärung sein, warum die neonatalen Zellen auf die Stimulation zumindest mit Malariaantigenen weniger stark reagieren als die Mütter.

Zur Expression der zytotoxischen Substanzen Granzym B und Perforin gibt es in diesem Zusammenhang noch kaum Daten. NK-Zellen allgemein betreffend konnte in Israel kein signifikanter Unterschied in der Aktivität von mütterlichen und neonatalen Zellen festgestellt werden, während in Frankreich Perforin *ex vivo* in Nabelschnur-NK-Zellen in geringerem Maße als bei Erwachsenen nachgewiesen wurde [24], ebenso wie auch in den USA [20] und in Italien [82] Nabelschnur-NK-Zellen eine geringere Aktivität aufwiesen. Bei den CD3-T-Zellen allgemein und bei den  $\gamma\delta$ -T-Zellen zeigte sich in unserer Arbeit eine vermehrte Expression beider Substanzen auf den mütterlichen Zellen im Vergleich zu den Nabelschnurzellen. Bei den NK-Zellen konnte allerdings nur nach unspezifischer Stimulation für Granzym B die gleiche Aussage gemacht werden, ansonsten gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen PBMCs und CBMCs. Dalle *et al.* zeigten hingegen in Kanada, dass NK-Zellen des Nabelschnurblutes nach unspezifischer Stimulation mehr Perforin und Granzym B als erwachsene Vergleichszellen bildeten [52]. Dabei handelte es sich jedoch um reine NK-Zellen, nicht um CBMCs; die physiologischen Gegebenheiten

wurden also nicht abgebildet. Die spontane zytotoxische Aktivität dieser Nabelschnur-NK-Zellen in der Gesamtheit der CBMCs war auch erniedrigt. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen in westlichen Industrieländern werden Perforin und Granzym B *ex vivo* in mütterlichen und neonatalen Zellen in Gabun in ähnlichen Anteilen exprimiert. Für diese Population kann also postuliert werden, dass ihre NK-Zellen des angeborenen Immunsystems nicht funktionell unreif sind, während die  $\gamma\delta$ -T-Zellen als Zellen des erworbenen Immunsystems jedoch funktionell unreif erscheinen.

#### 4.4 Einfluss der Jahreszeit auf das Immunsystem

Auch die Jahreszeit scheint einen Einfluss auf die Lymphozyten zu haben, da bei den Müttern, die in der Trockenzeit ihre Kinder zur Welt brachten, ebenso wie in deren Nabelschnurblut signifikant mehr Zellen gemessen wurden als in der langen Regenzeit. Das könnte durch die vermehrten Malariainfektionen in der Regenzeit und die assoziierte Lymphopenie erklärt werden. Die Lymphozytenzahlen waren allerdings nicht korreliert mit dem Malariastatus der jeweiligen Mütter, aber andere in der Regenzeit vermehrt prävalente Krankheiten könnten ebenfalls eine Rolle spielen. Lisse *et al.* haben bei Kindern in Guinea-Bissau ebenfalls einen höheren Lymphozytenanteil an Leukozyten in der Trockenzeit festgestellt, sowie erhöhte absolute CD4-T-Zellen [143]. Wir zeigen, dass sich dieser jahreszeitliche Einfluss schon bei Neugeborenen feststellen lässt.

Zum Einfluss der Jahreszeit wurde kein Zusammenhang mit dem Malariastatus festgestellt, der aufgrund der Mückenverteilung bei den unterschiedlichen Niederschlagsmengen erwartet worden wäre. Trotzdem fand sich eine signifikant unterschiedliche Zytokinproduktion in den verschiedenen Jahreszeiten, wobei nach den Stimulationen eine höhere Expression in der langen Regenzeit als in der kurzen Regenzeit und hier wiederum mehr als in der Trockenzeit beobachtet wurde. Damit ist die Zytokinproduktion gegensätzlich

zur Lymphozytenanzahl. Die erhöhte Prävalenz von Malaria in der Regenzeit kann als Erklärung hierfür herangezogen werden. Die vermehrten Infektionen scheinen eine Aktivierung der mütterlichen sowie der neonatalen T-Zellen mit sich zu bringen, unabhängig von der Anzahl der Lymphozyten.

Neben diesen Erklärungen, die die unterschiedliche Immunfunktion mit der Prävalenz von *P. falciparum* in Zusammenhang bringen, scheint es jedoch auch einen grundlegenden Zusammenhang zwischen Jahreszeiten und immunologischer Funktion zu geben, der noch nicht ursächlich verstanden ist. Vorangegangene Studien haben außer zirkadianer Schwankungen auch saisonale Veränderungen verschiedener Vorgänge des Immunsystems beobachtet [91, 141]. In Belgien zeigten die meisten PBMCs betreffenden Variablen wie Leukozytenuntergruppen und Zytokinproduktion bei gesunden Probanden einen saisonalen Rhythmus [146]. In Finnland scheint IFN- $\gamma$  im Sommer weniger produziert zu werden [126] und bei Gesunden im tasmanischen Winter wurde mehr IFN- $\gamma$  und im Sommer mehr IL-10 nachgewiesen [234]. Auch am Extrembeispiel des antarktischen Winters konnte gezeigt werden, dass Exposition von gesunden Individuen zu einer T<sub>H</sub>1-Zytokinreaktion führt [223]. Wie dieser jahreszeitliche Effekt vermittelt wird, ist nicht klar. Auch in den Tropen gibt es Hinweise auf ein saisonal unterschiedlich reagierendes Immunsystem: Im Hochland Kenias wurden saisonale Unterschiede bei der Zytokinproduktion nach Stimulation von PBMCs mit *P. falciparum* LSA 1 festgestellt - in der Regenzeit wurde mehr IL-10 und TNF- $\alpha$  gemessen als in der Trockenzeit. Bei IFN- $\gamma$  fand sich dieser Unterschied jedoch nicht [122]. Grundlegend decken sich diese Ergebnisse der verstärkten Zytokinproduktion in der Regenzeit aus dem kenianischen Hochland mit unseren im gabunesischen Regenwald.

Diese Zusammenhänge zwischen Jahreszeit und Funktion des Immunsystems verdienen weitere Beachtung in zukünftigen Studien. Es ist zudem anzuregen, dass in Zukunft die Jahreszeit bei der Auswertung in Betracht gezogen wird.

## 4.5 Ausblick

Auch wenn aufgrund methodischer Schwierigkeiten nur wenige Beobachtungen in Bezug auf den Malariastatus der Mütter signifikant waren, bestätigen diese doch eher, dass neonatale Zellen nach Malaria-Behandlung der Mutter in der Schwangerschaft bei einer erneuten Exposition besser gewappnet sind, während akute PAM bei Geburt das Immunsystem supprimiert. Die Behandlung in der Schwangerschaft scheint bei den Müttern zu einer Art Priming zu führen, die bei den Neugeborenen zu einer erhöhten Immunreaktion führt. Das unterstreicht noch einmal die Bedeutung von Maßnahmen der öffentlichen Gesundheitsvorsorge wie die Intermittierende Präventive Behandlung gegen Malaria in der Schwangerschaft (IPT) und das Screening von Schwangeren auf Malaria.

Es wäre auch interessant, ob der Zeitpunkt der Infektion je nach fetaler Entwicklungsphase unterschiedliche Auswirkungen auf das Immunsystem der Neugeborenen haben könnte und wie sich eine nicht behandelte Infektion in der Schwangerschaft auswirkt. Um den verschiedenen Variablen (Geschlecht des Kindes, HIV-Status, andere Infektionserkrankungen, Wohngebiete, Jahreszeit, Zeitpunkt der mütterlichen Infektion) Rechnung zu tragen, bräuchte man für so eine erneute Studie eine deutlich größere Population. In dem Fall wäre auch eine gepaarte Analyse möglich.

## 5 Zusammenfassung

*P. falciparum* ist der Erreger der weltweit bedeutendsten Tropenkrankheit Malaria tropica, von der besonders Kinder und Schwangere betroffen sind. Die klinische Immunität für Malaria, die Personen im Endemiegebiet langsam entwickeln, schützt Frauen in der Schwangerschaft nicht mehr, da die Sequestration der parasitierten Erythrozyten an CSA in der Plazenta stattfindet. Die Beeinflussung der Neugeborenen durch diese plazentare Infektion der Mütter war Thema dieser Arbeit. Die PBMCs von drei Gruppen von Müttern (ohne Malariainfektion in der Schwangerschaft, mit plazentarer Infektion bei Geburt und mit behandelter Malariainfektion in der Schwangerschaft) und die CBMCs ihrer Neugeborenen wurden auf Oberflächenmarker und die Zytokinproduktion *ex vivo* und nach unspezifischer bzw. spezifischer Stimulation mit Schizontenlysat hin untersucht.

Trotz nur geringer Zellzahlen in einigen Versuchen konnte allgemein bestätigt werden, dass die Neugeborenen von Frauen mit PAM bei Geburt eine geringere Aktivierung der T-Zellen und Zytokinproduktion aufweisen, während Neugeborene nach Behandlung der Mütter verstärkt auf erneute Stimulation reagieren. In der Zytokinexpression zeigte sich zudem ein jahreszeitlicher Zusammenhang, der möglicherweise mit dem erhöhten Infektionsdruck in Afrika korreliert ist. In der Regenzeit konnte sowohl bei Müttern als auch bei den Neugeborenen eine geringere Lymphozytenzahl als in der Trockenzeit nachgewiesen werden, aber verstärkte Aktivierung der T-Zellen, sowie vermehrte Zytokinproduktion.

Konsistent zeigte sich eine funktionelle Unreife der neonatalen CD3-T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zu den mütterlichen. Im Gegensatz dazu war die Expression der zytotoxischen Substanzen Perforin und Granzym B auf den NK-Zellen des Nabelschnurblutes vergleichbar mit der Expression auf adulten Zellen, so dass im zentralafrikanischen Kontext von einer funktionellen Reife der neonatalen NK-Zellen ausgegangen werden kann.

## 6 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization: Management of severe malaria: A practical handbook. Geneva, 2000.
2. World Health Organization - Roll Back Malaria: Economic costs of malaria. Geneva, 2001.
3. BD PharMingen: Intracellular Flow Cytometry - Applied Reagents and Techniques. San Diego, 2001.
4. World Health Organization: The World Health Report. Geneva, 2002.
5. World Health Organization, United Nations Children's Fund: The Africa Malaria Report 2003. Geneva, 2003.
6. World Health Organization: The World Health Report 2003. Geneva, 2003.
7. United Nations Children's Fund: Malaria - A major cause of child death and poverty in Africa. New York, 2004.
8. World Health Organization, United Nations Children's Fund: World Malaria Report. Geneva, 2005.
9. World Health Organization: Fact sheet No. 94 Malaria. Geneva, 2007.
10. Central Intelligence Agency: The World Factbook - Gabon. <http://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/gb.html>, 2007. Zugriff am 11.8.2007.
11. Abrams ET, Kwiek JJ, Mwapasa V, Kamwendo DD, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME, Rogerson SJ, Meshnick SR: Malaria during pregnancy and foetal haematological status in Blantyre, Malawi. *Malar J* 2005, 4:39.
12. Achidi EA, Anchang JK, Minang JT, Ahmadou MJ, Troye-Blomberg M: Studies on Plasmodium falciparum isotypic antibodies and numbers of IL-4 and IFN-gamma secreting cells in paired maternal cord blood from South West Cameroon. *Int J Infect Dis* 2005, 9:159-169.
13. Adegnika AA, Verweij JJ, Agnandji ST, Chai SK, Breitling LP, Ramharter M, Frolich M, Issifou S, Kreamsner PG, Yazdanbakhsh M: Microscopic and sub-microscopic Plasmodium falciparum infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. *Am J Trop Med Hyg* 2006, 75:798-803.
14. Adkins B: T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today* 1999, 20:330-335.

15. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S: Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 2004, 4:553-564.
16. Allison AC: Polymorphism and natural selection in human populations. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1964, 29:137-149.
17. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG: Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J Mol Med* 2005, 83:88-96.
18. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM: Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 2002, 169:2956-2963.
19. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM: The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 2003, 133:145-152.
20. Baley JE, Schacter BZ: Mechanisms of diminished natural killer cell activity in pregnant women and neonates. *J Immunol* 1985, 134:3042-3048.
21. Beaven GH, Ellis MJ, White JC: Studies on human foetal haemoglobin. III. The hereditary haemoglobinopathies and thalassaemias. *Br J Haematol* 1961, 7:169-186.
22. Beeson JG, Duffy PE: The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, 297:187-227.
23. Behr C, Dubois P: Preferential expansion of V gamma 9 V delta 2 T cells following stimulation of peripheral blood lymphocytes with extracts of *Plasmodium falciparum*. *Int Immunol* 1992, 4:361-366.
24. Berthou C, Legros-Maida S, Soulie A, Wagnier A, Guillet J, Rabian C, Gluckman E, Sasportes M: Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes. *Blood* 1995, 85:1540-1546.
25. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC: Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997, 15:749-795.
26. Bonner PC, Zhou Z, Mirel LB, Ayisi JG, Shi YP, van Eijk AM, Otieno JA, Nahlen BL, Steketee RW, Udhayakumar V: Placental malaria diminishes development of antibody responses to *Plasmodium falciparum* epitopes in infants residing in an area of western Kenya where *P. falciparum* is endemic. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, 12:375-379.
27. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P: Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 1990, 172:1633-1641.

28. Bouyou-Akotet MK, Issifou S, Meye JF, Kombila M, Ngou-Milama E, Luty AJ, Kremsner PG, Mavoungou E: Depressed natural killer cell cytotoxicity against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes during first pregnancies. *Clin Infect Dis* 2004, 38:342-347.
29. Brabin BJ: An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ* 1983, 61:1005-1016.
30. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R, Fletcher KA, Owens S, D'Alessandro U, Nosten F, Fischer PR, Ordi J: The sick placenta-the role of malaria. *Placenta* 2004, 25:359-378.
31. Bradstock KF, Luxford C, Grimsley PG: Functional and phenotypic assessment of neonatal human leucocytes expressing natural killer cell-associated antigens. *Immunol Cell Biol* 1993, 71 ( Pt 6):535-542.
32. Brasseur P, Agrapart M, Ballet JJ, Druilhe P, Warrell MJ, Tharavanij S: Impaired cell-mediated immunity in *Plasmodium falciparum*-infected patients with high-parasitemia and cerebral malaria. *Clin Immunol Immunopathol* 1983, 27:38-50.
33. Bray RS, Anderson MJ: *Falciparum* malaria and pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979, 73:427-431.
34. Brustoski K, Moller U, Kramer M, Hartgers FC, Kremsner PG, Krzych U, Luty AJ: Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis* 2006, 193:146-154.
35. Brustoski K, Moller U, Kramer M, Petelski A, Brenner S, Palmer DR, Bongartz M, Kremsner PG, Luty AJ, Krzych U: IFN-gamma and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Immunol* 2005, 174:1738-1745.
36. Buffet PA, Gamain B, Scheidig C, Baruch D, Smith JD, Hernandez-Rivas R, Pouvelle B, Oishi S, Fujii N, Fusai T, Parzy D, Miller LH, Gysin J, Scherf A: *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:12743-12748.
37. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Marsh K: Antibody recognition of *Plasmodium falciparum* erythrocyte surface antigens in Kenya: evidence for rare and prevalent variants. *Infect Immun* 1999, 67:733-739.
38. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K: Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 1998, 4:358-360.

39. Bull PC, Marsh K: The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. Trends Microbiol 2002, 10:55-58.
40. Burmester G-R, Pezzutto A: *Taschenatlas der Immunologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1998.
41. Campbell AC, Waller C, Wood J, Aynsley-Green A, Yu V: Lymphocyte subpopulations in the blood of newborn infants. Clin Exp Immunol 1974, 18:469-482.
42. Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding CV, Silver RF, Boom WH: CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. J Immunol 2001, 167:2734-2742.
43. Chen ZW, Letvin NL: Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2 T cells: a new paradigm. Trends Immunol 2003, 24:213-219.
44. Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M: Neonatal (cord blood) T cells can competently raise type 1 and 2 immune responses upon polyclonal activation. Cell Immunol 2000, 205:110-119.
45. Cohen S, McGregor IA, Carrington S: Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature 1961, 192:733-737.
46. Cohen SB, Perez-Cruz I, Fallen P, Gluckman E, Madrigal JA: Analysis of the cytokine production by cord and adult blood. Hum Immunol 1999, 60:331-336.
47. Cot M, Le Hesran JY, Staalsoe T, Fievet N, Hviid L, Deloron P: Maternally transmitted antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum: relation to child susceptibility to malaria. Am J Epidemiol 2003, 157:203-209.
48. Cox SE, Staalsoe T, Arthur P, Bulmer JN, Hviid L, Yeboah-Antwi K, Kirkwood BR, Riley EM: Rapid acquisition of isolate-specific antibodies to chondroitin sulfate A-adherent plasmodium falciparum isolates in Ghanaian primigravidae. Infect Immun 2005, 73:2841-2847.
49. Craig A, Scherf A: Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. Mol Biochem Parasitol 2001, 115:129-143.
50. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Fusilli S, Zendoli F, Carotenuto M: Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. Haematologica 1998, 83:197-203.

51. D'Ombra MC, Hansen DS, Simpson KM, Schofield L: gammadelta-T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN-gamma response to Plasmodium falciparum malaria. *Eur J Immunol* 2007, 37:1864-1873.
52. Dalle JH, Menezes J, Wagner E, Blagdon M, Champagne J, Champagne MA, Duval M: Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res* 2005, 57:649-655.
53. De Rosa SC, Andrus JP, Perfetto SP, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M: Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J Immunol* 2004, 172:1637-1645.
54. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, Newman RD: Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 2007, 7:93-104.
55. Desowitz RS: Prenatal immune priming in malaria: antigen-specific blastogenesis of cord blood lymphocytes from neonates born in a setting of holoendemic malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1988, 82:121-125.
56. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournie JJ, Krensky AM, Bonneville M, Peyrat MA, Caccamo N, Sireci G, Salerno A: Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis* 2001, 184:1082-1085.
57. Donati D, Zhang LP, Chene A, Chen Q, Flick K, Nystrom M, Wahlgren M, Bejarano MT: Identification of a polyclonal B-cell activator in Plasmodium falciparum. *Infect Immun* 2004, 72:5412-5418.
58. Doolan DL, Hoffman SL: IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the Plasmodium yoelii model. *J Immunol* 1999, 163:884-892.
59. Duffy PE, Fried M: Antibodies that inhibit Plasmodium falciparum adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns. *Infect Immun* 2003, 71:6620-6623.
60. Duffy PE, Fried M: Malaria in the pregnant woman. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, 295:169-200.
61. Egwunyenga OA, Ajayi JA, Duhlińska-Popova DD: Transplacental passage of Plasmodium falciparum and seroevaluation of newborns in northern Nigeria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997, 28:741-745.

62. Eissenthal A, Hassner A, Shenav M, Baron S, Lifschitz-Mercer B: Phenotype and function of lymphocytes from the neonatal umbilical cord compared to paired maternal peripheral blood cells isolated during delivery. *Exp Mol Pathol* 2003, 75:45-52.
63. Elloso MM, van der Heyde HC, vande Waa JA, Manning DD, Weidanz WP: Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells. *J Immunol* 1994, 153:1187-1194.
64. Elson LH, Days A, Calvopina M, Paredes W, Araujo E, Guderian RH, Bradley JE, Nutman TB: In utero exposure to *Onchocerca volvulus*: relationship to subsequent infection intensity and cellular immune responsiveness. *Infect Immun* 1996, 64:5061-5065.
65. Engelmann I, Moeller U, Santamaria A, Kremsner PG, Luty AJ: Differing activation status and immune effector molecule expression profiles of neonatal and maternal lymphocytes in an African population. *Immunology* 2006, 119:515-521.
66. Engelmann I, Santamaria A, Kremsner PG, Luty AJ: Activation status of cord blood gamma delta T cells reflects in utero exposure to *Plasmodium falciparum* antigen. *J Infect Dis* 2005, 191:1612-1622.
67. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH: The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol* 2005, 21:75-80.
68. Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, Hannel I, Hulstaert F, Hamilton C, Mackinnon H, Stokes LT, Munhyeshuli V, Vanlangendonck F, .: Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1992, 120:216-222.
69. Farouk SE, Mincheva-Nilsson L, Krensky AM, Dieli F, Troye-Blomberg M: Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *Eur J Immunol* 2004, 34:2248-2256.
70. Fell AH, Currier J, Good MF: Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth in vitro by CD4+ and CD8+ T cells from non-exposed donors. *Parasite Immunol* 1994, 16:579-586.
71. Fievet N, Cot M, Chougnet C, Maubert B, Bickii J, Dubois B, Le Hesran JY, Frobert Y, Migot F, Romain F, .: Malaria and pregnancy in Cameroonian primigravidae: humoral and cellular immune responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1995, 53:612-617.
72. Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, Chaouat G: *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *J Infect Dis* 2001, 183:1530-1534.

73. Fievet N, Ringwald P, Bickii J, Dubois B, Maubert B, Le Hesran JY, Cot M, Deloron P: Malaria cellular immune responses in neonates from Cameroon. *Parasite Immunol* 1996, 18:483-490.
74. Fievet N, Tami G, Maubert B, Moussa M, Shaw IK, Cot M, Holder AA, Chaouat G, Deloron P: Cellular immune response to *Plasmodium falciparum* after pregnancy is related to previous placental infection and parity. *Malar J* 2002, 1:16.
75. Fischer PR: Congenital malaria: an African survey. *Clin Pediatr (Phila)* 1997, 36:411-413.
76. Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F, Nehrbass U, Wellems TE, Scherf A: Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* 2000, 407:1018-1022.
77. French N, Nakiyingi J, Lugada E, Watera C, Whitworth JA, Gilks CF: Increasing rates of malarial fever with deteriorating immune status in HIV-1-infected Ugandan adults. *AIDS* 2001, 15:899-906.
78. Fried M, Duffy PE: Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 1996, 272:1502-1504.
79. Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE: Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. *J Immunol* 1998, 160:2523-2530.
80. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE: Maternal antibodies block malaria. *Nature* 1998, 395:851-852.
81. Friedman MJ: Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, 75:1994-1997.
82. Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G, Chirico G: Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol Neonate* 2003, 84:297-303.
83. Good MF, Doolan DL: Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol* 1999, 11:412-419.
84. Goodier MR, Lundqvist C, Hammarstrom ML, Troye-Blomberg M, Langhorne J: Cytokine profiles for human V gamma 9+ T cells stimulated by *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol* 1995, 17:413-423.

85. Greenberg AE, Nsa W, Ryder RW, Medi M, Nzeza M, Kitadi N, Baangi M, Malanda N, Davachi F, Hassig SE: Plasmodium Falciparum malaria and perinatally acquired human immunodeficiency virus type 1 infection in Kinshasa, Zaire. A prospective, longitudinal cohort study of 587 children. *N Engl J Med* 1991, 325:105-109.
86. Grimwade K, French N, Mbatha DD, Zungu DD, Dedicoat M, Gilks CF: HIV infection as a cofactor for severe falciparum malaria in adults living in a region of unstable malaria transmission in South Africa. *AIDS* 2004, 18:547-554.
87. Guyatt HL, Snow RW: Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Rev* 2004, 17:760-9, table.
88. Haldane JBS: Disease and Evolution. *Ric Sci Suppl* 1949, 19:68-75.
89. Han P, Hodge G: Intracellular cytokine production and cytokine receptor interaction of cord mononuclear cells: relevance to cord blood transplantation. *Br J Haematol* 1999, 107:450-457.
90. Hannel I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyere M: Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today* 1992, 13:215, 218.
91. Haus E, Smolensky MH: Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int* 1999, 16:581-622.
92. Hayday AC: [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000, 18:975-1026.
93. Hensmann M, Kwiatkowski D: Cellular basis of early cytokine response to Plasmodium falciparum. *Infect Immun* 2001, 69:2364-2371.
94. Hermsen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loe C, van Deuren M, van der Meer JW, van Mierlo GJ, Eling WM, Hack CE, Sauerwein RW: Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental Plasmodium falciparum infections. *Clin Exp Immunol* 2003, 132:467-472.
95. Hightower AW, Lammie PJ, Eberhard ML: Maternal filarial infection - a persistent risk factor for microfilaremia in offspring? *Parasitol Today* 1993, 9:418-421.
96. Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM: Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991, 352:595-600.

97. Hill AV, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gao XM, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend AR, .: Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992, 360:434-439.
98. Hirunpetcharat C, Good MF: Deletion of Plasmodium berghei-specific CD4+ T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:1715-1720.
99. Ho M, Schollaardt T, Snape S, Looareesuwan S, Suntharasamai P, White NJ: Endogenous interleukin-10 modulates proinflammatory response in Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* 1998, 178:520-525.
100. Ho M, Webster HK, Looareesuwan S, Supanaranond W, Phillips RE, Chanthavanich P, Warrell DA: Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to Plasmodium falciparum. *J Infect Dis* 1986, 153:763-771.
101. Ho M, Webster HK, Tongtawe P, Pattanapanyasat K, Weidanz WP: Increased gamma delta T cells in acute Plasmodium falciparum malaria. *Immunol Lett* 1990, 25:139-141.
102. Hodge S, Hodge G, Flower R, Han P: Cord blood leucocyte expression of functionally significant molecules involved in the regulation of cellular immunity. *Scand J Immunol* 2001, 53:72-78.
103. Hoffman SL, Oster CN, Plowe CV, Woollett GR, Beier JC, Chulay JD, Wirtz RA, Hollingdale MR, Mugambi M: Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. *Science* 1987, 237:639-642.
104. Hogh B: Clinical and parasitological studies on immunity to Plasmodium falciparum malaria in children. *Scand J Infect Dis Suppl* 1996, 102:1-53.
105. Hogh B, Marbiah NT, Burghaus PA, Andersen PK: Relationship between maternally derived anti-Plasmodium falciparum antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, west Africa, in which malaria is highly endemic. *Infect Immun* 1995, 63:4034-4038.
106. Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J: Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 2008, 118:1311-1321.
107. Hugosson E, Montgomery SM, Premji Z, Troye-Blomberg M, Bjorkman A: Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of Plasmodium falciparum parasites. *Parasite Immunol* 2004, 26:111-117.
108. Hunt JS: Immunobiology of pregnancy. *Curr Opin Immunol* 1992, 4:591-596.

109. Hviid L: The immuno-epidemiology of pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria: a variant surface antigen-specific perspective. *Parasite Immunol* 2004, 26:477-486.
110. Hviid L, Kurtzhals JA, Adabayeri V, Loizon S, Kemp K, Goka BQ, Lim A, Mercereau-Puijalon O, Akanmori BD, Behr C: Perturbation and proinflammatory type activation of V delta 1(+) gamma delta T cells in African children with Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* 2001, 69:3190-3196.
111. Hviid L, Staalsoe T: Malaria immunity in infants: a special case of a general phenomenon? *Trends Parasitol* 2004, 20:66-72.
112. Ismaili J, van der SM, Holland MJ, Sambou I, Keita S, Allsopp C, Ota MO, McAdam KP, Pinder M: Plasmodium falciparum infection of the placenta affects newborn immune responses. *Clin Exp Immunol* 2003, 133:414-421.
113. Janeway CA, Travers A, Walport M, Shlomchik M: Die adaptive Immunität gegenüber Infektionen. In *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag; 2002:409-453.
114. Janeway CA, Travers A, Walport M, Shlomchik M: Die angeborene Immunität. In *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag; 2002:37-93.
115. Janeway CA, Travers A, Walport M, Shlomchik M: Die CD-Antigene. In *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag; 2002:707-724.
116. Janeway CA, Travers A, Walport M, Shlomchik M: Die Entstehung von Lymphozyten-Antigenrezeptoren. In *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag; 2002:131-163.
117. Janeway CA, Travers A, Walport M, Shlomchik M: Die T-Zell-vermittelte Immunität. In *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag; 2002:317-363.
118. Janeway CA, Travers A, Walport M, Shlomchik M: Die Werkzeuge des Immunologen. In *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag; 2002:657-702.
119. Janeway CA, Travers A, Walport M, Shlomchik M: Grundbegriffe der Immunologie. In *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag; 2002:1-36.
120. Janeway CA, Travers A, Walport M, Shlomchik M: Signalgebung durch Rezeptoren des Immunsystems. In *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag; 2002:201-238.
121. Jeffery GM: Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of Plasmodium. *Bull World Health Organ* 1966, 35:873-882.

122. John CC, Sumba PO, Ouma JH, Nahlen BL, King CL, Kazura JW: Cytokine responses to Plasmodium falciparum liver-stage antigen 1 vary in rainy and dry seasons in highland Kenya. *Infect Immun* 2000, 68:5198-5204.
123. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993, 159:197-207.
124. Juretic E, Gagro A, Vukelic V, Petroveckii M: Maternal and neonatal lymphocyte subpopulations at delivery and 3 days postpartum: increased coexpression of CD45 isoforms. *Am J Reprod Immunol* 2004, 52:1-7.
125. Kassberger F, Birkenmaier A, Khattab A, Kremsner PG, Klinkert MQ: PCR typing of Plasmodium falciparum in matched peripheral, placental and umbilical cord blood. *Parasitol Res* 2002, 88:1073-1079.
126. Katila H, Cantell K, Appelberg B, Rimon R: Is there a seasonal variation in the interferon-producing capacity of healthy subjects? *J Interferon Res* 1993, 13:233-234.
127. King CL, Malhotra I, Wamachi A, Kioko J, Mungai P, Wahab SA, Koech D, Zimmerman P, Ouma J, Kazura JW: Acquired immune responses to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in the human fetus. *J Immunol* 2002, 168:356-364.
128. Korbel DS, Newman KC, Almeida CR, Davis DM, Riley EM: Heterogeneous human NK cell responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol* 2005, 175:7466-7473.
129. Krampera M, Tavecchia L, Benedetti F, Nadali G, Pizzolo G: Intracellular cytokine profile of cord blood T-, and NK- cells and monocytes. *Haematologica* 2000, 85:675-679.
130. Kremsner PG, Zotter GM, Feldmeier H, Graninger W, Rocha RM, Wiedermann G: A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated falciparum malaria in Acre, Brazil. *J Infect Dis* 1988, 158:1368-1371.
131. Kwiatkowski D: Genetic susceptibility to malaria getting complex. *Curr Opin Genet Dev* 2000, 10:320-324.
132. Lang W: Malaria. In *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. W.B.Saunders Company; 1996:7-33.
133. Langhorne J: gammadelta T cells in malaria infections. *Parasitol Today* 1996, 12:200-203.

134. Langhorne J, Gillard S, Simon B, Slade S, Eichmann K: Frequencies of CD4+ T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. *Int Immunol* 1989, 1:416-424.
135. Langhorne J, Morris-Jones S, Casabo LG, Goodier M: The response of gamma delta T cells in malaria infections: a hypothesis. *Res Immunol* 1994, 145:429-436.
136. Larkin GL, Thuma PE: Congenital malaria in a hyperendemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1991, 45:587-592.
137. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyeme M, Boudin C, Deloron P: Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol* 1997, 146:826-831.
138. Le Hesran JY, Personne I, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyeme M, Boudin C, Cot M, Deloron P: Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* infection and immune responses in infants with or without the sickle cell trait. *Int J Epidemiol* 1999, 28:793-798.
139. Leech JH, Barnwell JW, Miller LH, Howard RJ: Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med* 1984, 159:1567-1575.
140. Leke RF, Djokam RR, Mbu R, Leke RJ, Fogako J, Megnekou R, Metenou S, Sama G, Zhou Y, Cadigan T, Parra M, Taylor DW: Detection of the *Plasmodium falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women: implications for diagnosing placental malaria. *J Clin Microbiol* 1999, 37:2992-2996.
141. Levi FA, Canon C, Touitou Y, Reinberg A, Mathe G: Seasonal modulation of the circadian time structure of circulating T and natural killer lymphocyte subsets from healthy subjects. *J Clin Invest* 1988, 81:407-413.
142. Levy O: Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007, 7:379-390.
143. Lisse IM, Aaby P, Whittle H, Jensen H, Engelmann M, Christensen LB: T-lymphocyte subsets in West African children: impact of age, sex, and season. *J Pediatr* 1997, 130:77-85.
144. Loscertales MP, Brabin BJ: ABO phenotypes and malaria related outcomes in mothers and babies in The Gambia: a role for histo-blood groups in placental malaria? *Malar J* 2006, 5:72.

145. Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Weinberg JB, Kreamsner PG: Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2000, 68:3909-3915.
146. Maes M, Stevens W, Scharpe S, Bosmans E, De Meyer F, D'Hondt P, Peeters D, Thompson P, Cosyns P, De Clerck L, .: Seasonal variation in peripheral blood leukocyte subsets and in serum interleukin-6, and soluble interleukin-2 and -6 receptor concentrations in normal volunteers. *Experientia* 1994, 50:821-829.
147. Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Kwiek JJ, Meshnick SR, King CL: Umbilical cord-blood infections with *Plasmodium falciparum* malaria are acquired antenatally in Kenya. *J Infect Dis* 2006, 194:176-183.
148. Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Ouma J, Sharma S, Kazura JW, King CL: Distinct Th1- and Th2-Type prenatal cytokine responses to *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion ligands. *Infect Immun* 2005, 73:3462-3470.
149. Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, Kazura JW, King CL: Helminth- and *Bacillus Calmette-Guerin*-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis. *J Immunol* 1999, 162:6843-6848.
150. Marodi L: Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol* 2006, 118:137-144.
151. Marsh K, Howard RJ: Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. *Science* 1986, 231:150-153.
152. Marshall-Clarke S, Reen D, Tasker L, Hassan J: Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol Today* 2000, 21:35-41.
153. Mavoungou E, Luty AJ, Kreamsner PG: Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. *Eur Cytokine Netw* 2003, 14:134-142.
154. McCormick MC: The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med* 1985, 312:82-90.
155. McGregor IA: Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 1984, 33:517-525.
156. McGregor IA: Thoughts on malaria in pregnancy with consideration of some factors which influence remedial strategies. *Parassitologia* 1987, 29:153-163.

157. McGregor IA, Gilles HM, Walters JH, Davies AH, Pearson FA: Effects of heavy and repeated malarial infections on Gambian infants and children; effects of erythrocytic parasitization. *Br Med J* 1956, 2:686-692.
158. McGregor IA, Wilson ME, Billewicz WZ: 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* 1983, 77:232-244.
159. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D: Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994, 371:508-510.
160. Meeusen EN, Bischof RJ, Lee CS: Comparative T-cell responses during pregnancy in large animals and humans. *Am J Reprod Immunol* 2001, 46:169-179.
161. Menard R: Medicine: knockout malaria vaccine? *Nature* 2005, 433:113-114.
162. Menendez C: Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. *Parasitol Today* 1995, 11:178-183.
163. Menendez C: Malaria during pregnancy. *Curr Mol Med* 2006, 6:269-273.
164. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, Font F, Alonso PL: The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* 2000, 181:1740-1745.
165. Migot F, Ouedraogo JB, Diallo J, Zampan H, Dubois B, Scott-Finnigan T, Sanou PT, Deloron P: Selected *P. falciparum* specific immune responses are maintained in AIDS adults in Burkina Faso. *Parasite Immunol* 1996, 18:333-339.
166. Miller LH, Good MF, Milon G: Malaria pathogenesis. *Science* 1994, 264:1878-1883.
167. Miller LH, Smith JD: Motherhood and malaria. *Nat Med* 1998, 4:1244-1245.
168. Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C, Thompson WN, Bienzle U: Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health* 2000, 5:167-173.
169. Mohan K, Moulin P, Stevenson MM: Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J Immunol* 1997, 159:4990-4998.

170. Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, Meshnick SR: Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis* 1999, 180:1987-1993.
171. Morita CT, Parker CM, Brenner MB, Band H: TCR usage and functional capabilities of human gamma delta T cells at birth. *J Immunol* 1994, 153:3979-3988.
172. Mshana RN, Boulandi J, Mayombo J, Mendome G: In vitro lymphoproliferative responses to malaria antigens: a prospective study of residents of a holoendemic area with perennial malaria transmission. *Parasite Immunol* 1993, 15:35-45.
173. Mutabingwa TK, Bolla MC, Li JL, Domingo GJ, Li X, Fried M, Duffy PE: Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. *PLoS Med* 2005, 2:e407.
174. Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockenhouse CF, Davidson EA, Gowda DC: Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med* 2000, 192:1563-1576.
175. Ned RM, Moore JM, Chaisavaneeyakorn S, Udhayakumar V: Modulation of immune responses during HIV-malaria co-infection in pregnancy. *Trends Parasitol* 2005, 21:284-291.
176. Newman KC, Riley EM: Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 2007, 7:279-291.
177. O'Neil-Dunne I, Achur RN, Agbor-Enoh ST, Valiyaveetil M, Naik RS, Ockenhouse CF, Zhou A, Megnekou R, Leke R, Taylor DW, Gowda DC: Gravidity-dependent production of antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy. *Infect Immun* 2001, 69:7487-7492.
178. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, Filgueira MC, Tartar A, Druilhe P: Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood* 1994, 84:1594-1602.
179. Okoko BJ, Enwere G, Ota MO: The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis. *Acta Trop* 2003, 87:193-205.

180. Orago AS, Facer CA: Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. *Clin Exp Immunol* 1991, 86:22-29.
181. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacin A, Kahigwa E, Ferrer B, Cardesa A, Alonso PL: Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J Infect Dis* 2001, 183:1100-1107.
182. Oyakhirome, S: The Lambaréné Method of Thick Blood Smear. GlaxoSmithkline / Malaria Vaccine Initiative, Slides Reading Meeting, Brussels, 2006.
183. Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ: Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. *Nature* 1978, 274:701-703.
184. Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ, Smith DH, GILLES HM: Fetal haemoglobin and malaria. *Lancet* 1976, 1:1269-1272.
185. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S: Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002, 14:123-128.
186. Perkins DJ, Weinberg JB, Kremsner PG: Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis* 2000, 182:988-992.
187. Perraut R, Diatta B, Marrama L, Garraud O, Jambou R, Longacre S, Krishnegowda G, Dieye A, Gowda DC: Differential antibody responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol anchors in patients with cerebral and mild malaria. *Microbes Infect* 2005, 7:682-687.
188. Perrin LH, Mackey LJ, Miescher PA: The hematology of malaria in man. *Semin Hematol* 1982, 19:70-82.
189. Planche T, Krishna S, Kombila M, Engel K, Faucher JF, Ngou-Milama E, Kremsner PG: Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65:599-602.
190. Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, Anderson K, Mahakunkijcharoen Y, Martin LB, Wilson D, Elliott S, Elliott S, Eisen DP, Weinberg JB, Saul A, Good MF: Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 2002, 360:610-617.
191. Pope RM: Immunoregulatory mechanisms present in the maternal circulation during pregnancy. *Baillieres Clin Rheumatol* 1990, 4:33-52.

192. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG: Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998, 160:4730-4737.
193. Raffael A, Nebe CTh, Valet G: Grundlagen der Durchflusszytometrie. In *Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Edited by Schmitz G, Rothe G. Stuttgart, New York: Schattauer; 1994:3-49.
194. Ramharter M, Willheim M, Winkler H, Wahl K, Lagler H, Graninger W, Winkler S: Cytokine profile of Plasmodium falciparum-specific T cells in non-immune malaria patients. *Parasite Immunol* 2003, 25:211-219.
195. Rasheed FN: Maternal infections influence infection susceptibility in childhood. *Med Hypotheses* 1994, 42:76-80.
196. Rasheed FN, Bulmer JN, De Francisco A, Jawla MF, Jakobsen PH, Jepson A, Greenwood BM: Relationships between maternal malaria and malarial immune responses in mothers and neonates. *Parasite Immunol* 1995, 17:1-10.
197. Rasheed FN, Bulmer JN, Dunn DT, Menendez C, Jawla MF, Jepson A, Jakobsen PH, Greenwood BM: Suppressed peripheral and placental blood lymphoproliferative responses in first pregnancies: relevance to malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1993, 48:154-160.
198. Reeder JC, Cowman AF, Davern KM, Beeson JG, Thompson JK, Rogerson SJ, Brown GV: 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* 1999, 96:5198-5202.
199. Renia L, Potter SM: Co-infection of malaria with HIV: an immunological perspective. *Parasite Immunol* 2006, 28:589-595.
200. Riley EM: Is T-cell priming required for initiation of pathology in malaria infections? *Immunol Today* 1999, 20:228-233.
201. Riley EM, Schneider G, Sambou I, Greenwood BM: Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant Gambian women. *Am J Trop Med Hyg* 1989, 40:141-144.
202. Riley EM, Wagner GE, Akanmori BD, Koram KA: Do maternally acquired antibodies protect infants from malaria infection? *Parasite Immunol* 2001, 23:51-59.
203. Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L: Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol* 2006, 28:35-49.

204. Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches R, Nash G, Marsh K, Newbold CI: Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* 1992, 357:689-692.
205. Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, Abrams ET, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME: Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun* 2003, 71:267-270.
206. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW: Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis* 2007, 7:105-117.
207. Roussilhon C, Agrapart M, Guglielmi P, Bensussan A, Brasseur P, Ballet JJ: Human TcR gamma delta+ lymphocyte response on primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *Clin Exp Immunol* 1994, 95:91-97.
208. Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N, .: Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 1995, 376:246-249.
209. Rzepczyk CM, Anderson K, Stamatiou S, Townsend E, Allworth A, McCormack J, Whitby M: Gamma delta T cells: their immunobiology and role in malaria infections. *Int J Parasitol* 1997, 27:191-200.
210. Sander B, Cardell S, Moller G, Moller E: Differential regulation of lymphokine production in mitogen-stimulated murine spleen cells. *Eur J Immunol* 1991, 21:1887-1892.
211. Saute F, Menendez C, Mayor A, Aponte J, Gomez-Olive X, Dgedge M, Alonso P: Malaria in pregnancy in rural Mozambique: the role of parity, submicroscopic and multiple *Plasmodium falciparum* infections. *Trop Med Int Health* 2002, 7:19-28.
212. Sautois B, Fillet G, Beguin Y: Comparative cytokine production by in vitro stimulated mononucleated cells from cord blood and adult blood. *Exp Hematol* 1997, 25:103-108.
213. Schleiermacher D, Le Hesran JY, Ndiaye JL, Perraut R, Gaye A, Mercereau-Puijalon O: Hidden *Plasmodium falciparum* parasites in human infections: different genotype distribution in the peripheral circulation and in the placenta. *Infect Genet Evol* 2002, 2:97-105.
214. Schleiermacher D, Mercereau-Puijalon O: PCR Genotypisierung von *Plasmodium falciparum* in der Schwangerschaft. *Chemother J* 2002, 11:130-136.

215. Schmieg J, Gonzalez-Aseguinolaza G, Tsuji M: The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Microbes Infect* 2003, 5:499-506.
216. Schofield L, Grau GE: Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2005, 5:722-735.
217. Schofield L, Mueller I: Clinical immunity to malaria. *Curr Mol Med* 2006, 6:205-221.
218. Scott P, Trinchieri G: The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol* 1995, 7:34-40.
219. Seghaye MC, Heyl W, Grabitz RG, Schumacher K, von Bernuth G, Rath W, Duchateau J: The production of pro- and anti-inflammatory cytokines in neonates assessed by stimulated whole cord blood culture and by plasma levels at birth. *Biol Neonate* 1998, 73:220-227.
220. Senga E, Loscertales MP, Makwakwa KE, Liomba GN, Dzamalala C, Kazembe PN, Brabin BJ: ABO blood group phenotypes influence parity specific immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Malawian women. *Malar J* 2007, 6:102.
221. Serghides L, Patel SN, Ayi K, Kain KC: Placental chondroitin sulfate A-binding malarial isolates evade innate phagocytic clearance. *J Infect Dis* 2006, 194:133-139.
222. Shear HL, Grinberg L, Gilman J, Fabry ME, Stamatoyannopoulos G, Goldberg DE, Nagel RL: Transgenic mice expressing human fetal globin are protected from malaria by a novel mechanism. *Blood* 1998, 92:2520-2526.
223. Shirai T, Magara KK, Motohashi S, Yamashita M, Kimura M, Suwazomo Y, Nogawa K, Kuriyama T, Taniguchi M, Nakayama T: TH1-biased immunity induced by exposure to Antarctic winter. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 111:1353-1360.
224. Siegrist CA: Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* 2001, 19:3331-3346.
225. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA: A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60:687-692.
226. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH: Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 1995, 82:101-110.

227. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT: Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004, 112:38-43.
228. Spaepen M, Angulo AF, Marynen P, Cassiman JJ: Detection of bacterial and mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 1992, 78:89-94.
229. Staalsoe T, Giha HA, Dodoo D, Theander TG, Hviid L: Detection of antibodies to variant antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by flow cytometry. *Cytometry* 1999, 35:329-336.
230. Staalsoe T, Shulman CE, Bulmer JN, Kawuondo K, Marsh K, Hviid L: Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet* 2004, 363:283-289.
231. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C: The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 64:28-35.
232. Steketee RW, Wirima JJ, Bloland PB, Chilima B, Mermin JH, Chitsulo L, Breman JG: Impairment of a pregnant woman's acquired ability to limit Plasmodium falciparum by infection with human immunodeficiency virus type-1. *Am J Trop Med Hyg* 1996, 55:42-49.
233. Stevenson MM, Riley EM: Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004, 4:169-180.
234. Stewart N, Taylor B, Ponsonby AL, Pittas F, van dM, I, Woods G, Walters H: The effect of season on cytokine expression in multiple sclerosis and healthy subjects. *J Neuroimmunol* 2007, 188:181-186.
235. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TE: The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell* 1995, 82:89-100.
236. Suguitan AL, Jr., Cadigan TJ, Nguyen TA, Zhou A, Leke RJ, Metenou S, Thuita L, Megnekou R, Fogako J, Leke RG, Taylor DW: Malaria-associated cytokine changes in the placenta of women with pre-term deliveries in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 2003, 69:574-581.
237. Suguitan AL, Jr., Leke RG, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, Fogako J, Megnekou R, Taylor DW: Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* 2003, 188:1074-1082.

238. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Harlow SD, James SA, Meshnick SR: Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi. *J Infect Dis* 1999, 179:1580-1583.
239. Sylla EH, Kun JF, Kremsner PG: Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, 94:652-656.
240. Szekeres-Bartho J: Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002, 21:471-495.
241. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Miko E, Polgar B, Palkovics T: The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. *Semin Immunol* 2001, 13:229-233.
242. Taylor DW, Zhou A, Marsillio LE, Thuita LW, Leke EB, Branch O, Gowda DC, Long C, Leke RF: Antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A and to the C terminus of merozoite surface protein 1 correlate with reduced placental malaria in Cameroonian women. *Infect Immun* 2004, 72:1603-1607.
243. Taylor-Robinson AW: Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol Today* 1995, 11:334-342.
244. Taylor-Robinson AW: Immunoregulation of malarial infection: balancing the vices and virtues. *Int J Parasitol* 1998, 28:135-148.
245. Taylor-Robinson AW, Phillips RS: Functional characterization of protective CD4+ T-cell clones reactive to the murine malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Immunology* 1992, 77:99-105.
246. Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY: The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science* 1993, 260:1931-1934.
247. Tebo AE, Kremsner PG, Piper KP, Luty AJ: Low antibody responses to variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* are associated with severe malaria and increased susceptibility to malaria attacks in Gabonese children. *Am J Trop Med Hyg* 2002, 67:597-603.
248. ter Kuile FO, Parise ME, Verhoeff FH, Udhayakumar V, Newman RD, van Eijk AM, Rogerson SJ, Steketee RW: The burden of co-infection with human immunodeficiency virus type 1 and malaria in pregnant women in sub-saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2004, 71:41-54.
249. Tobian AA, Mehlotra RK, Malhotra I, Wamachi A, Mungai P, Koech D, Ouma J, Zimmerman P, King CL: Frequent umbilical cord-blood and maternal-blood infections with *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, and *P. ovale* in Kenya. *J Infect Dis* 2000, 182:558-563.

250. Trager W, Jensen JB: Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, 193:673-675.
251. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P, .: The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 1994, 51:123-137.
252. Trowsdale J, Betz AG: Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol* 2006, 7:241-246.
253. Troye-Blomberg M: Human T-cell responses to blood stage antigens in *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Lett* 1994, 41:103-107.
254. Troye-Blomberg M, Worku S, Tangteerawatana P, Jamshaid R, Soderstrom K, Elghazali G, Moretta L, Hammarstrom M, Mincheva-Nilsson L: Human gamma delta T cells that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the *Plasmodium falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. *Scand J Immunol* 1999, 50:642-650.
255. Tsegaye A, Wolday D, Otto S, Petros B, Assefa T, Alebachew T, Hailu E, Adugna F, Measho W, Dorigo W, Fontanet AL, van Baarle D, Miedema F: Immunophenotyping of blood lymphocytes at birth, during childhood, and during adulthood in HIV-1-uninfected Ethiopians. *Clin Immunol* 2003, 109:338-346.
256. Turrini F, Giribaldi G, Valente E, Arese P: Mycoplasma contamination of *Plasmodium* cultures--a case of parasite parasitism. *Parasitol Today* 1997, 13:367-368.
257. Udeinya IJ, Schmidt JA, Aikawa M, Miller LH, Green I: *Falciparum* malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. *Science* 1981, 213:555-557.
258. Urban BC, Ing R, Stevenson MM: Early interactions between blood-stage *plasmodium* parasites and the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, 297:25-70.
259. van Geertruyden JP, Thomas F, Erhart A, D'Alessandro U: The contribution of malaria in pregnancy to perinatal mortality. *Am J Trop Med Hyg* 2004, 71:35-40.
260. Vekemans J, Truyens C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, Rodriguez P, Alonso-Vega C, Carlier Y: Maternal *Trypanosoma cruzi* infection upregulates capacity of uninfected neonate cells To produce pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect Immun* 2000, 68:5430-5434.

261. Verhoeff FH, Brabin BJ, Hart CA, Chimsuku L, Kazembe P, Broadhead RL: Increased prevalence of malaria in HIV-infected pregnant women and its implications for malaria control. *Trop Med Int Health* 1999, 4:5-12.
262. Villar J, Belizan JM: The relative contribution of prematurity and fetal growth retardation to low birth weight in developing and developed societies. *Am J Obstet Gynecol* 1982, 143:793-798.
263. Walker-Abbey A, Djokam RR, Eno A, Leke RF, Titanji VP, Fogako J, Sama G, Thuita LH, Beardslee E, Snounou G, Zhou A, Taylor DW: Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 2005, 72:229-235.
264. Walter PR, Garin Y, Blot P: Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol* 1982, 109:330-342.
265. Warell DA, Gilles HM: *Essential Malariology*. Arnold; 2002.
266. Warsame M, Wernsdorfer WH, Perlmann H, Lebbad M, Ericsson O, Matola YG, Troye-Blomberg M, Perlmann P, Berzins K: A malariometric survey in a rural community in the Muheza district, Tanzania: age profiles in the development of humoral immune responses. *Acta Trop* 1997, 68:239-253.
267. Watanabe H, Weerasinghe A, Miyaji C, Sekikawa H, Toyabe S, Mannor MK, Morshed SR, Halder RC, Kobayashi J, Toma H, Sato Y, Iwai K, Matsuoka H, Abo T: Expansion of unconventional T cells with natural killer markers in malaria patients. *Parasitol Int* 2003, 52:61-70.
268. Waterfall M, Black A, Riley E: Gammadelta+ T cells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites. *Infect Immun* 1998, 66:2393-2398.
269. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993, 14:353-356.
270. White NJ: Malaria. In *Manson's Tropical Diseases*. Elsevier Science Limited; 2003:1205-1278.
271. Whitworth J, Morgan D, Quigley M, Smith A, Mayanja B, Eotu H, Omoding N, Okongo M, Malamba S, Ojwiya A: Effect of HIV-1 and increasing immunosuppression on malaria parasitaemia and clinical episodes in adults in rural Uganda: a cohort study. *Lancet* 2000, 356:1051-1056.
272. Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer WH: Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Trop Med Parasitol* 1995, 46:77-82.

273. Wilfing A, Winkler S, Schrottbauer K, Willheim M, Baier K, Aichelburg A, Muller T, Graninger W, Kremsner PG: African-European differences in the capacity of T-cell cytokine production. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65:504-509.
274. Willheim M, Ebner C, Baier K, Kern W, Schrottbauer K, Thien R, Kraft D, Breiteneder H, Reinisch W, Scheiner O: Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 100:348-355.
275. Williams N: Malaria hideout found in new mothers. *Science* 1996, 272:1416-1417.
276. Winkler S, Willheim M, Baier K, Graninger W, Kremsner PG: Frequency of cytokine-producing CD4-CD8- peripheral blood mononuclear cells in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur Cytokine Netw* 1999, 10:155-160.
277. Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A, Graninger W, Kremsner PG: Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 1998, 66:6040-6044.
278. Wyler DJ: The spleen in malaria. *Ciba Found Symp* 1983, 94:98-116.
279. Wyler DJ: *Plasmodium* and *Babesia*. In *Infectious Diseases*. W.B.Saunders Company; 1998:2407-2416.
280. Xi G, Leke RG, Thuita LW, Zhou A, Leke RJ, Mbu R, Taylor DW: Congenital exposure to *Plasmodium falciparum* antigens: prevalence and antigenic specificity of in utero-produced antimalarial immunoglobulin M antibodies. *Infect Immun* 2003, 71:1242-1246.
281. Yazdani SS, Mukherjee P, Chauhan VS, Chitnis CE: Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. *Curr Mol Med* 2006, 6:187-203.

## 7 Anhang

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Lebendes Material

Plasmodienstamm <i>Cys007</i>	Isoliert in Lambaréné
Humanes Serum	Blutbank, UKT
Leukozytendepletierte Erythrozyten 0+	Blutbank, UKT

#### 7.1.2 Chemikalien, Lösungen, Nährmedien, Puffer, Reagenzien, Gase

##### Parasiten-Kultur

RPMI 1640	Sigma
Hepes Puffer 1M	Sigma
L-Glutamin 200mM	Gibco
Gentamicin 50 mg/ml	Life Technologies
AlbuMAX ®	Life Technologies
RPMI 1640 Pulver	Sigma
Hepes Puffer Salz Pulver	Sigma
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma
Glukose	Sigma
Hypoxanthin Pulver	Sigma
Fetales Kälberserum	Sigma
Gas (5% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub> , 90% N <sub>2</sub> )	Hans Mast

##### Giemsafärbung

Methanol	Merck
Accustain ® GIEMSA Stain pH 6,9	Sigma
Titrisol ® Triphosphatpuffer pH 7,2	Merck

##### PBMC-Isolation und Kultur

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 9,6g/l	Sigma
Ficoll-Paque ® Plus	Amerham Biosciences
Trypan Blue Solution (0, 4 %)	Sigma Aldrich Chemie
UltraCulture Medium 500 ml	Bio Whittaker
2-Mercaptoethanol	Merck
CO <sub>2</sub>	Gaboa

**Stimulantien**

Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma
Ionomycin	Sigma
Brefeldin A	Sigma
Dimethyl Sulphoxide C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Sigma
95%iger Alkohol	Merck

**Zellfixierung**

Formaldehydlösung min. 37%	Merck
Hanks' Balanced Salt Solution	Sigma
Sodium Azide NaN <sub>3</sub>	Sigma
Bovine Serum Albumin 0, 3%	Serva

**PCR**

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen
Primer	Operon
Agarose	Sigma
TBE-Puffer	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma

**Intrazelluläre Färbung**

Saponin	Sigma
---------	-------

**7.1.3 Monoklonale Antikörper und Isotyp Kontrollen**

APC Mouse IgG1 Isotype Control	BD PharMingen
APC Rat IgG2a Isotype Control	BD PharMingen
FITC Mouse IgG1 Isotype Control	BD PharMingen
FITC Mouse IgG2a Isotype Control	BD PharMingen
FITC Mouse IgG2b Isotype Control	BD PharMingen
PE Mouse IgG1 Isotype Control	BD PharMingen
PE Mouse IgG2b Isotype Control	BD PharMingen
PE Rat IgG1 Isotype Control	BD PharMingen
PE Rat IgG2a Isotype Control	BD PharMingen
PerCP Mouse IgG1 Isotype Control	BD PharMingen

Purified mouse anti-human CD28 mAb	BD PharMingen
APC-anti-TCR $\gamma\delta$ mAb	BD PharMingen
APC-anti-CD94 mAb	BD PharMingen
FITC-anti-HLA-DR mAb	BD PharMingen
FITC-anti-IFN $\gamma$ mAb	BD PharMingen
FITC-anti-CD45RA mAb	BD PharMingen
FITC-anti-Perforin mAb	BD PharMingen
PE-anti-IL5 mAb	BD PharMingen
PE-anti-IL10 mAb	BD PharMingen
PE-anti-IL13 mAb	BD PharMingen
PE-anti-CD25 mAb	Caltag
PE-anti-CD45RO mAb	BD PharMingen
PE-anti-GranzymeB mAb	Caltag
PerCP-anti-CD3 mAb	BD PharMingen

#### 7.1.4 Verbrauchsmaterial

Cellstar ® PP-Röhrchen 15 ml	Greiner bio-one
Combitips ® 2,5 ml	Eppendorf
Cryo-Röhrchen 2 ml	Carl Roth
Falcon ® 50 ml konische Röhrchen, PP	Becton Dickinson
Filtrierpapiere	Macherey-Nagel
Indikatorband 1222 für Dampfsterilisation	3M Comply
Objektträger	R.Langenbrinck
Stripetten 1ml - 5 ml - 10 ml - 25 ml Costar ®	Corning
Pipettenspitzen blau	Sarstedt
Pipettenspitzen gelb	Greiner
Reaktionsgefäße 1,5 ml – 0,5 ml	Eppendorf
Safeskin Satin Plus – Latex Handschuhe	Kimberly-Clark
Stericup™ - vakuumbetriebene Filtrationssysteme	Millipore

#### Schizontenlysatherstellung

Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Carl Roth
MACS ® Separation Columns D	Miltenyi Biotec
Injectomat ®-Spritze 50 ml	Fresenius-Kabi

**Blutabnahme**

Alkohol Swabs	Norpak
S-Monovette ® 9 ml Ammonium-Heparin NH <sub>4</sub>	Sarstedt
S-Monovette ®-Kanüle 20 G	Sarstedt
Butterfly ®	Venisystems
Multi-Adapter für S-Monovette ®	Sarstedt
Cutfix ® Surgical Disposable Scalpel	Braun Aesculap

**Stimulation**

Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Integra Biosciences
12 well Zellkulturplatte	Corning

**7.1.5 Geräte****Tropeninstitut Tübingen**

Autoklav	LTE
Elektrophorese Dokumentation	Kodak
FACSCalibur™ Flow Cytometer	Becton Dickinson
Inkubator	Biosafe
Kühlschrank	Bosch
Laminar Flow Hood	Heraeus
Lichtmikroskop Laborlux S	Leitz
Multipette ®	Eppendorf
PCR Gelkammer	BioRad
Pipetman P ®	Gilson
Pipettierhilfe accu-jet ®	Brand
Präzisionswaage	Mettler
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
Reference ® Pipetten	Eppendorf
Schüttler	Vortex
SuperMACS™ II Separator	Miltenyi BioTec
Thermozykler	BioRad
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Liebherr
Tiefkühltruhe (-80 °C)	Revco
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge CR422	Jouan
Mikroliterzentrifuge Biofuge ® pico	Heraeus

**Laboratoire de Recherches Lambaréné**

Autoklav	Melag
Cell-Dyn ® 3000	Abbott Laboratories
Inkubator	Haereus Instruments
Kühlschrank	FIDES
Laminar Flow Hood	Nuaire
Lichtmikroskope	Olympus
Liquid Nitrogen Container ABS-50	Consarctic
Neubauer Improved Zählkammer (0,1000 mm Tiefe/ 0,0025 mm <sup>2</sup> )	Brand
Pipetboy acu	Integra Biosciences
Pipetten Labmate™ L20, L200, L1000	Abimed
Präzisionswaage	Kern
Research ® Pipetten	Eppendorf
Tiefkühltruhe -20 °C	Eco
Tiefkühltruhe -80 °C NU-6520E	Nuaire
Wasserbad C10-P5 Immersions Circulator	Haake
Zentrifuge	Beckman

**7.1.6 Hardware, Software**

PC FACS	Macintosh
FACS Calibur Software Cell Quest® 3.3	Becton Dickinson
StatView Version 5.0.1	SAS Institute Inc.
Reference Manager Professional Ed. Version 10	ISI ResearchSoft
Excel 2002	Microsoft

**7.2 Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1.1</b>	Entwicklungszyklus <i>Plasmodium falciparum</i>	3
<b>Abb. 1.2</b>	Verbreitung von <i>P. falciparum</i> 2004 - geschätzte Inzidenz klinischer Episoden pro Person und Jahr	5
<b>Abb. 1.3</b>	<i>P. falciparum</i> im Giemsapräparat - Ausstrich und Dicker Tropfen	9
<b>Abb. 2.1</b>	Karte von Gabun	32
<b>Abb. 2.2</b>	Objektträger mit "Dickem Tropfen"	36
<b>Abb. 2.3</b>	FACS-Prinzip	45

<b>Abb. 2.4</b>	FACS-Histogramm: Punktdiagramm aus FSC- und SCC-Höhe	48
<b>Abb. 2.5</b>	Punktdiagramm der eingegrenzten Zellen markiert mit APC und PerCP	48
<b>Abb. 2.6</b>	Markierung der oben angezeigten Zellen mit CD45RO und CD45RA	49
<b>Abb. 3.1</b>	Gruppeneinteilung nach Anwenden der Ausschlusskriterien	52
<b>Abb. 3.2</b>	Geburtsgewicht nach Malariastatus, unterteilt in Multi- und Primigravidae	54
<b>Abb. 3.3</b>	Lymphozytenwerte von Müttern und Nabelschnurblut in Abhängigkeit von der Parität	55
<b>Abb. 3.4</b>	$\gamma\delta$ -T-Zellen als Anteil der CBMCs in Abhängigkeit vom Malariastatus nach unspezifischer Stimulation	55
<b>Abb. 3.5</b>	HLA-DR Expression auf $\gamma\delta$ -T-Zellen der behandelten Gruppe und der Gruppe mit plazentarer Malaria nach unspezifischer Stimulation	56
<b>Abb. 3.6</b>	CD45RA auf CD3-T-Zellen der CBMCs in Abhängigkeit vom Malariastatus <i>ex vivo</i>	57
<b>Abb. 3.7</b>	Isoformen CD45RA und CD45RO exprimiert auf CD3-T-Zellen	58
<b>Abb. 3.8</b>	CD25 exprimiert auf CD3 <sup>+</sup> CBMCs unterteilt nach Malariastatus	58
<b>Abb. 3.9</b>	IFN- $\gamma$ und IL-13 positive CD3 <sup>+</sup> PBMCs der Gruppe mit plazentarer Infektion nach den verschiedenen Kontrollstimulationen	59
<b>Abb. 3.10</b>	IFN- $\gamma$ und IL-13 Expression von $\gamma\delta$ -T-Zellen der PBMCs und CBMCs nach unspezifischer Stimulation	60
<b>Abb. 3.11</b>	Perforin- und Granzym B-positive NK-Zellen, CD3- und $\gamma\delta$ -T-Zellen <i>ex vivo</i>	60
<b>Abb. 3.12</b>	Perforin- und Granzym B-negative NK-Zellen der CBMCs <i>ex vivo</i>	61
<b>Abb. 3.13</b>	Granzym B-positive NK-Zellen <i>ex vivo</i> und nach unspezifischer Stimulation	62
<b>Abb. 3.14</b>	Perforin-positive NK-Zellen <i>ex vivo</i> und nach unspezifischer Stimulation	62
<b>Abb. 3.15</b>	Hämoglobinwerte von Müttern und Nabelschnurblut	63
<b>Abb. 3.16</b>	Expression von HLA-DR auf PBMCs und CBMCs <i>ex vivo</i>	64
<b>Abb. 3.17</b>	CD25 exprimiert auf CD3-T-Zellen von PBMCs und CBMCs	64
<b>Abb. 3.18</b>	Lymphozytenwerte in Abhängigkeit von der Jahreszeit	66
<b>Abb. 3.19</b>	CD45RO-Expression auf CD3-T-Zellen von CBMCs nach unspezifischer Stimulation in Bezug zur Jahreszeit	67

### 7.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 2.1</b>	Durchgeführte Färbungen der verschiedenen stimulierten Zellpopulationen für aufgeführte Antigene mittels fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper	49
<b>Tab. 3.1</b>	Gruppeneinteilung nach Malariastatus	53
<b>Tab. 3.2</b>	Beschreibung der Studienpopulation	53
<b>Tab. 3.3</b>	Höhere Expression von Zytokinen und Oberflächenmarkern auf PBMCs im Vergleich zu CBMCs	65
<b>Tab. 3.4</b>	Expression von Zytokinen und Oberflächenmarkern in Abhängigkeit von der Jahreszeit	67

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APC	Allophycocyanin (bei Antikörpern)
APC	Antigen Presenting Cell
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
CBMCs	Cord Blood Mononuclear Cells
CD	Cluster of differentiation
CPM	Complete Parasite Medium
CSA	Chondroitin Sulfate A
DBL	duffy binding-like
DNA	Desoxyribonucleid acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Hb	Hämoglobin
HbF	fetales Hämoglobin
HbS	Sichelzellenhämoglobin
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
HRPII	Histidine-rich Protein II
ICAM1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPT	Intermittent Preventive Treatment
IUGR	Intrauterine Growth Restriction
LDH	Laktatdehydrogenase

LSA	Liver-stage Antigen
M	molar
mAb	monoclonal Antibody
MACS	Magnetic Activated Cell Separation
MSP	Merozoite Surface Protein
μl	Mikroliter
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NK	Natural Killer
nm	Nanometer
P.	Plasmodium
PAM	Pregnancy-associated Malaria
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein
Pf	Plasmodium falciparum
PfEMP1	P. falciparum erythrocyte membrane protein 1
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSC	Side Scatter
TCR	T-cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UC	Ultra Culture
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
WHO	World Health Organization

## 8 Danksagung

Nach reiflicher Überlegung habe ich mich am Ende meiner Studienzeit noch ein Jahr beurlauben lassen, um mich meiner Doktorarbeit zu widmen. Das habe ich nur deshalb getan, weil es mir ermöglicht wurde, in meinem Wunschgebiet der Tropenmedizin eine Studie „im Feld“ durchzuführen. Nachdem ich bereits in Straßburg im Séminaire Protestant und in St. Nicolas auf den Spuren von Albert Schweitzer gewandelt war, durfte ich nun auch „sein“ Lambaréné kennenlernen. Für die Überlassung des Themas bin ich Prof. Dr. Peter Kremsner deshalb sehr dankbar. Ebenso wie für kontinuierliche Unterstützung bei der Durchführung der Studie.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Betreuern Dr. Adrian Luty, der immer ein offenes Ohr für Anliegen hatte und Dr. Ilka Engelmann, die mich zu Beginn nach Lambaréné begleitete. Sie hat mich in die Methoden eingearbeitet und zudem all die aufwendigen FACS-Analysen und PCR-Kontrollen durchgeführt. Beide haben mich auch in den Jahren danach weiterhin unterstützt und bei Fragen immer weitergeholfen.

Für finanzielle Unterstützung danke ich dem DAAD, durch den mir ein Stipendium für wissenschaftliche Aus- und Fortbildung im Ausland zur Verfügung gestellt wurde, sowie natürlich meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums auch in vielerlei anderer Hinsicht unterstützt haben.

Zu den Mitarbeitern des Institut für Tropenmedizin in Tübingen und des Laboratoire de Recherches in Lambaréné, die mich in diesem Jahr bei methodischen Fragen und logistischen Problemen unterstützt haben und denen ich für die gute Zusammenarbeit und Freundschaft danken möchte, gehören: Martin Grobusch, Kim Brustoski, Gerardo Cabrerias, Clarisse Yone, Marielle Bouyou, Mohamed Abdel-Latif, Francis Ntumngia, Rolf Fendel, Elie Mavoungou, Michael Ramharter, Andrea Santamaria, Gilbert Esser, Martin Kramer, Georg Kiessling, Norbert Schwarz, Akim Adegnika, Maxime Agnandji,

Steffen Borrmann, Ingrid Lundgren, Pierre-Blaise Matsiegui, Benido Impouma, Michel Missinou, Joe Jarvis, Tihana Bicanic, Dorrith Schonkeren, Łujca Labuda, Alexandra Ritz, Birte Fimmen, Magdalena Necek, Matthias Längin, Dominik Burkhardt und Sunny Oyakhirome.

Für die gute Leitung des Labors danke ich Dr. Saadou Issifou. Für ihre praktische Unterstützung und Freundschaft den Labor-Technikerinnen Ariane Ntseyi, Brigitte Migombet und Eugénie. Ein ganz besonderer Dank für ihr Engagement, ihre Freundlichkeit und ihre Extramühen gilt den Hebammen der Maternité - Léonie, Geneviève, Simone, Nathalie, Véronique, Clémentine, Marie Louise, les deux Jacqueline, Béatrice et Florence. Ich werde nie vergessen, aus dem Schlaf gerissen zu werden mit den Worten: "C'est la mat, il y a eu un accouchement!" Danke für all die Gespräche zu Unzeiten beim Warten auf Entbindungen.

Meine Zeit in Lambaréné wurde auch zu etwas Besonderem durch die Kontakte außerhalb des Labors, die für die Motivation wichtig waren. Merci aux gens du village de lumière et à Maman Honorine, qui a été comme une Maman pour moi. Merci aux femmes de l'alliance et merci aux gens de Schweitzer qui ont été pendant des mois mes voisins et qui m'ont accueilli si chaleureusement. Merci à l'équipe de la boulangerie de vendre des pains dès une heure du matin et un merci spécial à Madame M'Baye et Mami pour nous nourrir avec des plats extraordinaires.

Und der wichtigste Dank an die Studienteilnehmerinnen, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Auch nach "le travail" einer Entbindung ohne jegliche Schmerztherapie haben sie geduldig und oft nachts unsere Fragen beantwortet und die Blutabnahme über sich ergehen lassen. Ich hoffe, dass all die Studien, die durch ihre wertvolle Mitarbeit im Laboratoire de Recherches durchgeführt werden, ihnen letztlich auch einen Vorteil bringen werden in ihrem Leben mit der Malaria.

## 9 Lebenslauf

Name	Möller
Vorname	Ulrike
Geburtsdatum	08.01.1976
Geburtsort	Wedel
1982 - 1986	Grundschule Friedrich-Ebert-Schule, Uetersen
1986 - 1995	Gymnasium Ludwig-Meyn-Schule, Uetersen
1992 - 1993	Red Wing Central High School, Red Wing, Minnesota, USA
1995 - 1996	Freiwilliges Soziales Jahr am Hôpital des Diaconesses, Paris
1996-2004	<b>Studium der Humanmedizin</b>
1998	Physikum (Philipps-Universität Marburg)
1999	Erstes Staatsexamen (Philipps-Universität Marburg)
1999 - 2000	Université Louis Pasteur, Straßburg, Frankreich
2002	Zweites Staatsexamen (Technische Universität Dresden)
2002 - 2003	Forschungsaufenthalt Laboratoire de Recherches Hôpital Albert Schweitzer, Lambaréné, Gabun
2003 - 2004	<b>Praktisches Jahr</b>
1. Tertial	<i>Frauenheilkunde</i> , Universitätsfrauenklinik, Tübingen
2. Tertial	<i>Chirurgie</i> , Hospital civil antiguo, Guadalajara, Mexiko
3. Tertial	<i>Infektiologie</i> , Hôpitaux Universitaires de Genève, Schweiz <i>Kardiologie</i> , Bristol Royal Infirmary, Bristol, Großbritannien
24.11.2004	Drittes Staatsexamen (Eberhard-Karls-Universität Tübingen)
	<b>Berufstätigkeit</b>
2005 - 2007	House Medical Officer, Emergency Department The Northern Hospital, Epping, Victoria, Australien
seit Dez. 2007	Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe Frauenklinik, Fürst-Stirum-Klinik Bruchsal