

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

**Immunantwort afrikanischer Neugeborener
in Abhängigkeit
mütterlicher Malaria**

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

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

**vorgelegt von
Martin Kramer
aus
Schwäbisch Hall**

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner
2. Berichtstatter: Professor Dr. M. Gregor

Für Růya und Béla

1. Einleitung	2
2. Malaria – eine fortbestehende Herausforderung	6
Historische Betrachtungen.....	6
Epidemiologie.....	6
Vom Mückenstich zur Diagnose Malaria	7
P. falciparum.....	7
Diagnose.....	8
Management der Malaria: Therapie und Prophylaxe.....	8
Therapie.....	8
Prophylaxe	9
<i>Expositionsprophylaxe</i>	<i>9</i>
<i>Vektorkontrolle</i>	<i>10</i>
<i>Chemoprophylaxe</i>	<i>10</i>
<i>Impfung</i>	<i>10</i>
1. Malaria und Schwangerschaft	11
Die Auswirkungen einer Erkrankung für Mutter und Kind	11
Das Phänomen der Sequestration	12
Mütterliche Immunität	12
Malariakontrolle in der Schwangerschaft.....	13
2. Malaria im Neugeborenenalter	13
Das Immunsystem des Neugeborenen.....	14
Kongenitale Malaria	15
Kindliche Immunität	15

3. Malaria Immunologie	16
PfEMP1 und die "var"-Multigene.....	16
CSA und HA als plazentare Rezeptoren	17
Zytokine in Infektionserkrankungen.....	18
Zelluläre Mechanismen – das Paradigma der pro- und anti- inflammatorischen T-Zell-Aktivität.....	19
Interaktion von T- und B-Zell-Epitopen mit MHC-Molekülen	20
Warten auf den Impfstoff	21
Vakzine gegen prä-erythrozytäre Stadien.....	22
<i>SPf66</i>	22
<i>RTS/S: Aktuell wichtigster "Subunit" Vakzinkandidat</i>	22
Vakzine gegen asexuelle Stadien.....	23
<i>MSP1</i>	23
<i>var2CSA</i>	23
Transmissionsblockierende Vakzine gegen Sexualstadien	24
<i>Transmissionsblockade</i>	24
<i>Ganze Parasiten</i>	24
Rationale Modulation des Zytokinmilieus.....	25
Kombinierte Strategien	26
4. Die Studie	26
Albert Schweitzer	26
Gabun und Lambaréné	27
Albert- Schweitzer-Hospital und Forschungslabor der Universität Tübingen	27
Theoretische Basis der Studie	28
Ziel der Studie.....	28

3. Material und Methoden.....	30
1. Studienpopulation.....	30
2. Isolation Mononuklearer Zellen und Zellkultur	31
3. Erfassung intrazellulärer Zytokinproduktion durch Durchflusszytometrie	32
4. Nachweis für DBL- γ 3 Peptide, glutamatreiches Protein (GLURP) und gereinigtes Proteinderivat spezifischer IgM- und IgG- Antikörper in Nabelschnurblut und mütterlichem peripherenvenösem Blut durch ELISA	33
5. Peptide	34
6. Statistische Auswertung.....	36
4. Ergebnisse	37
1. In vitro T-Zell-Zytokinproduktion als Reaktion auf DBL- γ 3 Peptide in Nabelschnurblut und mütterlichem Blut.....	37
2. IgM und IgG Antikörper mit Spezifität für DBL- γ 3 Peptide sind in Nabelschnurblut und Plasma der Mutter nachweisbar.....	42
5. Diskussion	49
6. Zusammenfassung.....	54
7. Literaturverzeichnis	56
8. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen.....	66
9. Danksagung	68
10. Lebenslauf.....	69

1. Einleitung

Malaria ist eine Vektor gebundene Infektionskrankheit, von der weltweit jährlich 300 – 500 Millionen Menschen betroffen sind (WHO 2005).

Die durch den Stich einer *Anopheles* Mücke auf den menschlichen Wirt übertragenen einzelligen Parasiten der Gattung *Plasmodium* dringen dabei in Erythrozyten ein und lösen durch nachfolgende Bindung an verschiedene Gefäßendothelien eine Vielzahl klinischer Symptome und Komplikationen aus, die, im Falle einer *Plasmodium falciparum* Malaria, unbehandelt nicht selten zum Tode führen. 90% der Todesfälle ereignen sich in Afrika unterhalb der Sahara. Hier sind innerhalb einer semiimmunen Bevölkerung besonders Kleinkinder und schwangere Frauen betroffen (Bryce J et al. 2005).

Trotz erheblicher Bemühungen zur Eindämmung dieser Erkrankung fehlt es weiterhin an zuverlässigen, kostengünstigen und lokal umsetzbaren Methoden vor allem der Prophylaxe. Namentlich die Entwicklung eines Impfstoffes, eines der elaboriertesten Werkzeuge im öffentlichen Gesundheitssektor, hat sich in der Vergangenheit als problematisch erwiesen.

Die Medizingeschichte lehrt uns, dass ein Impfstoff am ehesten gegen einen Organismus entwickelt werden kann, der bereits nach der Erstinfektion zu einer natürlichen Immunität führt. Im Falle der Malaria entwickelt sich erst nach Jahren endemischer Exposition eine Teilimmunität (Bruce-Chwatt LJ, 1963). Diese ineffektive Immunisierung beruht unter anderem auf dem antigenetischen Polymorphismus und der niedrigen individuellen Immunogenität der Parasitenantigene (Good MF et al. 1988; Miller LH et al. 1994), der immunmodulatorischen Eigenschaften des Parasiten selbst und der Interaktion mütterlicher und kindlicher Immunität im Rahmen einer Schwangerschaft.

Letztere nimmt in Form einer Subentität der Erkrankung eine Sonderstellung ein: Bei der Schwangerschafts-assoziierten-Malaria (pregnancy associated malaria = PAM) kommt es zu einer durch den Parasiten induzierten Adhäsion

der infizierten Erythrozyten an Oberflächenmoleküle der plazentaren Synzytiotrophoblasten mit schwerwiegenden Auswirkungen auf Gesundheit und Leben von Mutter und Kind (Steketee RW et al. 2001, Luxemburger C et al. 2001).

Eine Schlüsselrolle nimmt bei dem Anbindungsprozess ein Adhäsionsmolekül auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten, das so genannte PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrozyten Membran Protein 1) ein (Su XZ et al. 1995). Als plazentare Zielmoleküle der Adhäsion wurde unter anderen das Glykosaminoglykan Chondroitin Sulphat A (CSA) identifiziert (Rogerson SJ et al. 1995; Fried M, Duffy PE 1996; Reeder JC et al. 1999). CSA vermittelt auch die Anreicherung infizierter Erythrozyten im intervillösen Raum der Plazenta (Agbor-Enoh ST, Gowda DC 2003), ein Phänomen das Sequestration genannt wird und eine große Rolle bei der Pathophysiologie der PAM spielt (Fried, M, Duffy PE 1996).

Mit zunehmender Parität der Mutter entwickelt sich eine signifikante Immunität gegenüber der PAM. Diese geht mit der Bildung von Antikörpern einher, die unter anderem gegen ein genetisch konserviertes Epitop (s. u.) des PfEMP1 gerichtet sind (Fried M, Duffy PE 1998), das als Duffy-binding-like (DBL) 3 y-Domäne identifiziert wurde (Buffet PA et al. 1999; Gamain B, Miller LH 2004). Monoklonale Antikörper gegen DBL- γ 3 binden an die Oberfläche CSA-adhärenter Plasmodienisolate unterschiedlicher geographischer Herkunft (Lekana Douki JB et al. 2002), was allein wahrscheinlich schon ein relativ konserviertes Expressionsverhalten der DBL- γ 3 Domäne reflektiert, die die Möglichkeit unterstützt, eine Vakzine gegen die Schwangerschafts-assoziierte Malaria zu entwickeln.

Einem weiteren Hindernis ist bei dieser Entwicklung zu begegnen: Dem außerordentlichen Polymorphismus so genannter Major Histocompatibility Complex-Moleküle (MHC: Synonym HLA: Human Lymphocyte Antigen) innerhalb der menschlichen Population. In einer 1998 publizierten Studie erwähnen Southwood und Mitarbeiter mehrere HLA-Moleküle mit großflächig

überlappenden Bindungsarealen. Darunter die drei HLA-Subtypen HLA-DRB1*0101, DRB1*0401 und DRB1*0701 (Southwood S et al. 1998). Die Berücksichtigung dieser Daten bietet möglicherweise einen Ansatz zur Lösung des angesprochenen Problems des MHC/HLA-Polymorphismus.

Das Wissen über B- und T-Zellen und deren gegen spezifische PfEMP1-Epitope gerichtete Aktivität bei natürlicherweise exponierten Menschen ist sehr limitiert (Allsopp CE et al. 2002), und bisher wurde in keiner Studie von PfEMP1 spezifischer Immunantwort im Nabelschnurblut Neugeborener berichtet, die von an Malaria erkrankten Müttern zur Welt gebracht wurden. Epidemiologische Arbeiten legen nahe, dass eine Schwangerschafts-assoziierte Malaria die Wahrscheinlichkeit für das Neugeborene erhöht, frühzeitig an Malaria zu erkranken (Cot M et al. 2003; Le Hesran JY et al. 1997), möglicherweise als Resultat einer Antigenexposition, die immunsuppressive Vorgänge während der fetalen Entwicklung induziert (Brustoski K et al. 2005; 2006).

Die vorgelegte Arbeit vermittelt zunächst einen Überblick über Epidemiologie, Pathogenese, Klinik, Diagnostik sowie therapeutische und prophylaktische Ansätze der Malaria. Besondere Aufmerksamkeit wird dabei auf die PAM und ihre Auswirkungen auf das kindliche Immunsystem gerichtet. Anschließend werden Grundzüge der Malariainmunologie erörtert sowie der aktuelle Forschungsstand bezüglich einer Malaria – Vakzine zusammengefasst, bevor detailliert auf die von uns durchgeführte Studie Bezug genommen wird.

In unserer Studie wollten wir herausfinden, ob in Nabelschnurblut und mütterlichem peripheren venösen Blut DBL- γ 3 spezifische Antikörper- und T-Zellreaktionen nachzuweisen sind. Oben genannte Ansätze aufgreifend testeten wir eine Auswahl vierer Peptide, die durch die konserviert exprimierte DBL- γ 3 Domäne auf PfEMP1 Varianten plazentarer Plasmodien kodiert sind (Khattab A, Kremsner PG 2001; 2003). Die Auswahl der verwendeten Peptide basierte sowohl auf der Konserviertheit der Aminosäuresequenz als auch auf

Prädiktionswerten für eine HLA-DR Allel-Bindungswahrscheinlichkeit (Rammensee H, Stevanovic S 1999).

Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass eine positive Malariaanamnese der Mutter während der Schwangerschaft mit einem vermehrten Vorkommen für die DBL-Peptide spezifischer T-Zellen und IgM im Nabelschnurblut assoziiert ist. Wir werten dies als weiteres Indiz für den transplazentaren Transfer von *P. falciparum* Antigenen. Auch unterstützen die Ergebnisse die Thesen einer Immunogenität dieser Moleküle und einer durch sie vermittelten Modulation des kindlichen Immunsystems.

Aufgrund der hohen Konserviertheit und ihrer ubiquitären Expression könnten die von uns verwendeten Peptide daher einen viel versprechenden Ansatz zur Entwicklung einer wirksamen Vakzine zur Vorbeugung der PAM eröffnen.

2. Malaria – eine fortbestehende Herausforderung

Historische Betrachtungen

Der Name Malaria geht auf den italienischen Begriff „mal aria“ zurück, der schlechte Luft bedeutet und die frühere Assoziation mit Sumpfgebieten widerspiegelt. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte Charles Louis Alphonse Laveran, ein Chirurg in der französischen Armee, Parasiten im Blut eines an Malaria Erkrankten und Dr. Ronald Ross, ein britischer Militärarzt in Hyderabad, Indien fand heraus, dass Moskitos die Krankheit übertragen. In der Folge identifizierte der italienische Professor Giovanni Battista Grassi letztere als der Familie der *Anopheles* zugehörig.

Epidemiologie

Die Bedeutung der Malaria für die Mortalität und Morbidität der Weltbevölkerung ist nach wie vor ungebrochen. Sie ist die bedeutendste parasitäre Infektionserkrankung des Menschen. Jährlich erkranken laut zwischen 1999 und 2004 erschienen Berichten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 300 – 500 Millionen Menschen und sie ist für 1-1,3 Millionen Todesfälle verantwortlich. Dabei finden sich 90 % dieser Fälle in afrikanischen Ländern südlich der Sahara, in erster Linie unter Kleinkindern (Snow RW et al. 1999; 2004; WHO 2005).

Die WHO zählt die Malaria neben HIV/AIDS und Tuberkulose zu den drei Infektionskrankheiten, denen weltweit die meisten Menschen zum Opfer fallen und ist sich mit internationalen Forschungsinstituten, Hilfsorganisationen und Klinikern darüber einig, dass ihre Erforschung und Bekämpfung eine vorrangige Aufgabe von Medizin und Gesellschaft ist.

Alle fünf bekannten humanpathogenen Formen der Malaria, besonders jedoch die durch *P. falciparum* hervorgerufene, rasant und häufig tödlich verlaufende

Malaria tropica, stellen in weiten Teilen nicht nur der sog. "Dritten Welt" ein erhebliches medizinisches, soziales und ökonomisches Problem dar. So wird der Verlust des Bruttosozialproduktes afrikanischer Länder durch diese Krankheit auf 12 Milliarden US-Dollar pro Jahr geschätzt (Breman JG et al. 2001).

Vom Mückenstich zur Diagnose Malaria

P. falciparum

Malariaerreger sind eukaryote einzellige Mikroorganismen der Gattung *Plasmodium* und gelangen nach Inokulation durch den Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles*mücke als Sporozoiten in die Blutbahn ihres Wirtes. Nach Durchlaufen eines weiteren Entwicklungsstadiums in der Leber (Merozoiten) dringen sie in Erythrozyten ein und vermehren sich dort weiter. (Matuschewski K et al. 2006).

Von den ca. 400 bekannten Formen infizieren natürlicherweise nur fünf Formen den Menschen: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*. und *P. knowlesi*. Sie unterscheiden sich morphologisch, immunologisch, in ihrer geographischen Ausbreitung, im Muster ihrer klinischen Erscheinung und in ihrem Resistenzprofil gegenüber verschiedenen Therapeutika.

Wie erwähnt handelt es sich bei *P. falciparum* um den bedeutendsten und gefährlichsten Subtypus. Der Lebenszyklus des Parasiten mit verschiedenen Entwicklungsstadien in Mücke und Wirt ist sehr komplex.

Die ersten Symptome einer Malaria sind unspezifisch und ähneln denen eines viralen Allgemeininfektes: Kopfschmerz, Müdigkeit, gastrointestinale Irritation, Muskel- und Gelenkschmerzen, gefolgt von Fieber, Schüttelfrost, Nachtschweiß, Übelkeit, Erbrechen und Verschlechterung des Allgemeinzustandes. Dies ist das typische Bild einer unkomplizierten Malaria und die Rate der tödlich verlaufenden Erkrankungen beträgt bei einer *P. falciparum* Infektion ca. 0,1%, eine adäquate Therapie vorausgesetzt. Bei ineffektiver oder verzögerter

Behandlung entwickelt sich oft innerhalb von wenigen Stunden ein schweres Krankheitsbild mit Koma (zerebrale Malaria), metabolischer Azidose, schwerer Anämie, Hypoglykämie, respiratorischen Komplikationen und schließlich multiplem Organversagen. In diesem Stadium beträgt die Mortalität bei Therapie 15-20%, unbehandelt würde eine schwere Malaria noch häufiger letal verlaufen (Snow RW et al. 2004).

Diagnose

Die frühzeitige Diagnosestellung und adäquate Therapie sind grundlegende Elemente zur Malariakontrolle. Sie basiert auf klinischen Kriterien (Klinische Diagnose mit niedriger Spezifität) und der Bestätigung einer Infektion durch labordiagnostische Methoden.

Die in der Praxis wichtigste und kostengünstigste diagnostische Methode bei Malariaverdacht ist die lichtmikroskopische Untersuchung von Blutausstrichen (Dünner Tropfen) und dem bis zu 10-fach angereicherten Dicken Tropfens unter Verwendung der Giemsa -Färbung auf Plasmodien (parasitologische Diagnose). Alternativ kann deren Anwesenheit immunologisch und molekularbiologisch nachgewiesen werden. Die zur Verfügung stehenden Malaria-Schnelltests (rapid diagnostic tests (RDTs)) beruhen auf dem Nachweis parasitenspezifischer Antigene. Das mit Abstand sensitivste Verfahren für die Malaria-Diagnostik ist die Polymerasekettenreaktion (PCR). Sie ist jedoch aufgrund des hohen Material- und Zeitaufwands lediglich im Rahmen von Forschungsprojekten praktikabel (Rakotonirina H et al. 2008).

Management der Malaria: Therapie und Prophylaxe

Therapie

Für die Therapie der Malaria kommen, abhängig von Epidemiologie und Übertragungsprofil der Erkrankung, der Resistenzentwicklung sowie vom politischen und ökonomischen Kontext unter anderem folgende Medikamente in Frage: Chinin und seine Derivate (Chinin, Chloroquin, Primaquin, Mefloquin,

Amodiaquin, Atovaquon - Proguanil), Antibiotika (Pyrimethamin - Sulfadoxin, Fosfomycin Clindamycin, Doxycyclin, Co-trimoxazol – Rifampicin - Isoniazid), und Artemisinin nebst Derivaten.

Letztere werden in Kombination mit anderen Substanzen („artemisinin-based combination therapies“ (ACTs)) von der WHO als einzige effektive (Reserve-) Therapieoption bei einer *P. falciparum* Malaria angesehen (WHO 2001; 2005; Kabanyanyi AM et al. 2007).

Eine Vielzahl weiterer Substanzen befindet sich als Mono- oder Kombinationstherapie in der Erprobungsphase. Für Reisende in Malaria-Gebieten besteht weiterhin die Möglichkeit der Mitnahme eines so genannten Stand-by Therapeutikums zur selbständigen Notfallbehandlung.

Bei der Auswahl eines geeigneten Therapeutikums sind Risiko-Nutzenabwägungen zu treffen, die dessen Neben- und Wechselwirkungsspektrum und Preis berücksichtigen.

Ein großes Problem ist die zunehmende Resistenzentwicklung. Eine Monotherapie ist, wenn immer möglich, zu vermeiden und stattdessen eine Kombination synergistisch wirkender Substanzen, unterschiedlicher Pharmakodynamik zu wählen. Denn einerseits sind Kombinationstherapien effektiver und andererseits beugt man der Resistenzentwicklung vor, indem Parasiten, die durch eine de novo Resistenz gegen ein Therapeutikum entwickelten, durch das andere getötet würden (Price RN et al. 2007; Majori G 2004).

Prophylaxe

Expositionsprophylaxe

Dieser Begriff subsumiert alle Maßnahmen zur Verhinderung bzw. Reduktion der Wirtkontakte mit dem infektiösen Vektor Mücke (Exposition) und beinhaltet die Anwendung von Insektizid-behandelten Mückennetzen, angemessener Kleidung, Repellents ebenso wie Verhaltensmaßnahmen. Die Expositionsprophylaxe stellt eine effektive, einfach durchzuführende und zugleich kostengünstige Maßnahme zur Senkung der Malariainzidenz dar (Rieckmann KH 2006).

Vektorkontrolle

Unter Vektorkontrolle versteht man Vorkehrungen zur Senkung der die Parasiten übertragenden Mückenpopulation. Hierbei kommen besonders zwei Strategien zum Einsatz: Die Anwendung langwirksamer Insektizide (vor allem DDT = Dichlordiphenyltrichlorethan und Pyrethroide) in Behausungen (Indoor Residual Spraying of long-acting insecticide (IRS)) und die Verwendung damit imprägnierter Bettnetze (Long-Lasting Insecticidal Nets (LLINs)).

Komplettiert werden diese Strategien durch flurbereinigende Eingriffe, Maßnahmen zur Trockenlegung möglicher Brutplätze und Larvenkontrolle, sowie architektonische Optimierung.

Trotz erheblicher Bedenken gegenüber DDT, wegen dessen Anreicherung im Fettgewebe und über die Nahrungskette und seiner humantoxischen Wirkung, wird sein Einsatz im Rahmen der sog. Stockholmer Konvention weiter empfohlen, da keine ähnlich wirksame Substanz zur Verfügung steht. (Sadasivaiah S et al. 2007).

Auch bei der Vektorkontrolle handelt es sich um eine relativ kostengünstige und grundsätzlich effektive, jedoch schwer konsequent und flächendeckend zu etablierende Maßnahme (Rieckmann KH 2006).

Eine distinguierte Methode ist der Einsatz genetisch veränderter Moskitos, die keine oder wiederum genetisch alterierte, abgeschwächt virulente Plasmodien übertragen können und so zu einer Verdrängung der nativen Parasiten- und Mückenpopulation führen (Riehle MA 2003).

Chemoprophylaxe

Wegen der hohen Kosten bleibt die Chemoprophylaxe zum Beispiel mit Chloroquin, Doxycyclin, Mefloquin (Lariam[®]) oder Atovaquon - Proguanil (Malarone[®]) meist zahlungskräftigen Reisenden vorbehalten. Zudem kann bei bestehenden Nebenwirkungen aller Präparate lediglich eine begrenzte Einnahmezeit empfohlen werden.

Impfung

Die weite Verbreitung und die steigende Inzidenz der Malaria, die auf resistente Parasiten und insektizidresistente Moskitos zurückgehen unterstreichen die Notwendigkeit, neue Methoden zur Eindämmung der Krankheit zu entwickeln.

Besonders die Entwicklung eines zuverlässigen Impfstoffes gegen Malaria ist seit Jahrzehnten das Anliegen vieler Forschungsgruppen weltweit, böte sich damit doch die Möglichkeit des Schutzes Reisender einerseits und vor allem der trotz energischer Versuche bisher gescheiterten Eindämmung der Bedrohung der betroffenen Bevölkerung in Endemiegebieten andererseits. Die jetzige Studie soll zum tieferen Verständnis von immunologischen Vorgängen und der Wirt-Parasiten-Interaktionen bei einer Malaria beitragen, da dieses eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Vakzineentwicklung darstellt.

1. Malaria und Schwangerschaft

Die Auswirkungen einer Erkrankung für Mutter und Kind

Malaria in der Schwangerschaft ist eine der bedeutendsten vermeidbaren Faktoren für mütterliche und kindliche Mortalität und Morbidität weltweit. Schätzungsweise 40% der Schwangeren sind einer Malaria gegenüber exponiert (Steketee RW et al. 2001).

Das klinische Erscheinungsbild einer *P. falciparum* Malaria in der Schwangerschaft wird größtenteils vom Immunstatus der Frau bestimmt, der wiederum von der vorhergegangenen Malaria-Exposition abhängt. Schwangere mit schwacher oder fehlender Immunität, wie Frauen außerhalb eines Endemiegebietes oder Reisende, haben ein beträchtliches Risiko für eine schwere Erkrankung mit hoher Mortalität. Bedrohliche Komplikationen stellen insbesondere die zerebrale Malaria, die plazentare Malaria bzw. Schwangerschafts-assoziierte Malaria (PAM: pregnancy associated malaria), eine Hypoglykämie, ein Lungenödem und schwerste hämolytische Anämien dar (Looareesuwan S et al. 1985; Brabin BJ et al. 2001).

Die fetale und perinatale Mortalität für erkrankte und nicht-immune Frauen wurde mit bis zu 60-70% beschrieben und die PAM ist einer der Hauptursachen für vermindertes Geburtsgewicht. (Mc Gregor IA 1984; Brabin B 1991; Garner P 2003).

Das Phänomen der Sequestration

Ein Charakteristikum einer *P. falciparum* Infektion ist die Eigenschaft infizierter Erythrozyten (iRBC: infected red blood cells), sich an venöse Endothelialzellen anzuheften. Die Adhärenz wird in den iRBC innerhalb der ersten 16 – 20 Stunden des intraerythrozytären Zyklus wirksam, wenn der Parasit zu einem frühen Trophozoiten herangereift ist und die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche induziert.

Diese sogenannten Adhäsine oder VSAs (variable surface antigens) vermitteln die Bindung der iRBC an eine Vielzahl bereits identifizierter und im jeweilig befallenen Organ unterschiedlichen Rezeptoren des Gefäßendothels. Der Parasit umgeht dabei die Eliminierung von iRBC durch die Milz und humorale und zelluläre Mechanismen der Infektabwehr.

Das beschriebene Phänomen wird Sequestration genannt und stellt ein Schlüsselereignis für häufige Formen der komplizierten Malaria dar, unter anderem die zerebrale Malaria und die PAM. Bei letzterer kommt es zu einer ausgeprägten Sequestration von iRBC innerhalb der Placenta.

Mütterliche Immunität

Erwachsene in einem holoendemischen Gebiet entwickeln im Laufe ihrer ersten Lebensjahre üblicherweise ein hohes Maß an Immunität (Cohen S et al. 1961). Eine Infektion ist, obwohl häufig, regelmäßig asymptomatisch und eine schwere Erkrankung selten.

Während einer Schwangerschaft ändert sich jedoch das Bild. Das langwährende Rätsel, warum Frauen mit einer gut etablierten protektiven Immunität erneut für eine schwere Infektion anfällig werden, sobald sie schwanger werden (Brabin BJ, Rogerson SJ 2001), und warum die Prävalenz und Schwere der PAM umgekehrt proportional zu Parität und Alter ist (Steketee RW et al. 1996; Rogerson SJ et al. 2000), wurde vor kurzem gelöst: Als das für die bereits erwähnte Adhäsion von iRBCs verantwortliche plazentare Molekül

wurde das Glycosaminoglycan Chondroitin Sulphat A (CSA) identifiziert (Rogerson SJ et al. 1995; Beeson JG, Duffy PE 2005).

Weiterhin wurde dokumentiert, dass diese CSA-spezifische Adhäsion durch ein eigenständiges VSA (VSA_{PAM} genannt) vermittelt wird, das bei extraplazentaren Infektionen nicht oder selten exprimiert wird und gegen das bei Nulligravidae daher auch keine IgGs entwickelt wurden (Beeson JG et al. 1999). Diese VSA_{PAM} -spezifischen IgGs blockieren den Adhäsionsprozess in der Plazenta (Fried M et al. 1998; Ricke CH et al. 2000) und werden für die bei höherer Parität zunehmende Immunität einer PAM gegenüber verantwortlich gemacht (Staalsoe T et al. 2004).

Malariakontrolle in der Schwangerschaft

Das von der WHO empfohlene Maßnahmenpaket zur Prävention und Behandlung einer Malaria in der Schwangerschaft umfasst die Diagnose und Behandlung jeder Episode einer klinischen Malaria und Anämie, den Einsatz insektizid-behandelter Bettnetze sowie, in Gebieten hoher Transmission, eine intermittierende präventive Behandlung (IPT = intermittent preventive treatment) mit Sulfadoxin–Pyrimethamin (SP) zur Therapie einer periodischen plazentaren Infektion (Mc Gready R et al. 2001; WHO 2004).

2. Malaria im Neugeborenenalter

Malaria bleibt in Afrika die wichtigste Ursache der Kindersterblichkeit vor dem fünften Lebensjahr (Black RE et al. 2003).

Eine Reihe nationaler und internationaler Programme zur Malariakontrolle wurden lanciert, darunter das „Integrated Management of Childhood Illness“ (IMCI), die Initiative „Roll Back Malaria“ und der „Global Fund“.

Aus vielen Ländern wurden große Fortschritte in Vorsorge und Therapie der Malaria durch die Einführung der Artemisin combined therapy (ACT) (Barnes KI

et al. 2005) imprägnierter Moskitonetze (Lengeler C. 2004) und die intermittierende präventive Behandlung (IPT) von Kindern und schwangeren Frauen (D'Alessandro U et al. 1995) berichtet. Trotzdem bleibt die Erkrankung weiterhin ein großes Problem (Kouznetsov RL. 1977; Lengeler C et al. 2003; Martensson A et al. 2005).

Das Immunsystem des Neugeborenen

Die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft erfordert die Suppression des mütterlichen Immunsystems, da es den Fetus als Allograf zu tolerieren gilt (Koch CA, Platt JL 2007). Während der Schwangerschaft werden von der Plazenta eine Reihe löslicher Faktoren produziert, die das mütterliche Immunsystem in Richtung einer protektiven Th2 phänotypischen Reaktion moduliert (Dealtry GB et al. 2000). Es bleibt weiterhin zu untersuchen, ob und auf welche Weise solche Faktoren das heranwachsende kindliche Immunsystem beeinflussen.

Feten und Neugeborene sehen sich einer Vielzahl immunologischer Anforderung ausgesetzt, die die Infektabwehr, die Vermeidung schädlicher inflammatorischer Immunreaktionen mit resultierender Frühgeburtlichkeit oder Abort und die Bewältigung des Überganges von einem sterilen intrauterinen Umgebung in eine Welt voller fremder Antigene einschließt. Die Anforderungen führen zur Ausbildung eines besonderen angeborenen Immunsystems, das tendenziell gegen die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine gerichtet ist. Diese Tendenz setzen das Neugeborene einem erhöhten Infektrisiko aus und beeinträchtigt seine Immunreaktionen auf viele Impfstoffe (Levy O. 2007). Eine erfolgreiche Impfung im Neugeborenenalter muss daher die doppelte Hürde des inhibitorischen Effekts potenziell übertragener mütterlicher Antikörper und des Th2 dominierten Milieus überwinden. Eine künstliche Modulation in Richtung einer ausreichenden Th1 Reaktion ist zur Kontrolle vieler Infektionserkrankung nötig.

Kongenitale Malaria

Werden Parasiten im peripheren Blut des Neugeborenen festgestellt, spricht man von kongenitaler Malaria. Bei transplazentarer Passage von infizierten Erythrozyten können Parasiten in der Nabelschnur nachgewiesen werden (Kochar et al. 1998).

Die kongenitale Malaria ist die am wenigsten bekannte Manifestation dieser Erkrankung und ein sehr vernachlässigtes Forschungsfeld. Es wird daher angeregt diskutiert, ob eine vertikale *P. falciparum* Infektion im Afrika unterhalb der Sahara eine Seltenheit darstellt oder als häufiges Phänomen angesehen werden kann. So reicht ihre Prävalenz in verschiedenen Studien von 0% - 37% bei mütterlichen Parasitämieraten zwischen 24.8 und 54.4% (Uneke CJ. 2007). Die meisten Studien bewerten die Entität allerdings als außerordentliche Rarität.

Die Pathogenese und der zeitliche Ablauf einer vertikalen Infektion sind unklar; über deren Auswirkungen auf das Immunsystem des Kindes, ein eventuell gesteigertes Infektrisiko und die generelle Morbidität ist sehr wenig bekannt.

Eine kongenitale Malaria verläuft häufig asymptomatisch und die initial nachweisbare Parasitämie ist oft rasch und spontan rückläufig, sodass selten eine Behandlungsnotwendigkeit besteht. Trotzdem sollten Neugeborene mit Fieber unklarer Genese und Trinkschwäche in Endemiegebieten auf eine Malaria untersucht werden, vor allem bei bekannter Parasitämie der Mutter (Falade C et al. 2007; Menendez C et al. 2007).

Kindliche Immunität

Die Altersabhängigkeit der Anfälligkeit für eine Malaria in endemischen Gebieten reflektiert höchstwahrscheinlich die natürliche Entwicklung protektiver Immunität als Reaktion auf eine anhaltende Exposition gegenüber *P. falciparum*. Dabei spielen IgG eine zentrale Rolle, wie es der dramatische Effekt passiv übertragener IgG klinisch immuner Erwachsener auf eine schwere *P. falciparum* Malaria bei Kindern nahelegt (Cohen S. 1961).

Verschiedene Studien spezifizieren einzelne IgG im Zusammenhang mit protektiver Immunität. So ließen sich nur IgGs mit einer Immunität in Verbindung bringen, die gegen variant surface antigens (VSA) gerichtet waren (Newbold CI et al. 1992).

Weiterhin wurde gezeigt, dass Parasiten im Blut von Individuen mit eingeschränkter Immunität vornehmlich eine Untergruppe von VSA exprimieren, die auch bei Fällen schwerer Malaria gefunden werden und daher als VSA_{SM} (SM: severe malaria) bezeichnet werden (Bull PC et al. 1999; Ofori MF et al. 2002; Nielsen MA et al. 2002). Hingegen exprimieren Parasiten bei semi-immunen Individuen tendenziell andere VSA (VSA_{UM}), wie sie in Fällen unkomplizierter Malaria oder asymptomatischen Infektionen gefunden werden. Außerdem scheinen sich VSA_{SM}-spezifische IgG schneller zu entwickeln als VSA_{UM}-spezifische IgG, sodass gezeigt werden konnte, dass VSA_{SM}-exprimierende Parasiten Infektionen nicht immuner Individuen dominieren (Lavstsen T. 2005).

Weitere Erklärungsansätze zur Altersabhängigkeit der Immunitätsentwicklung sind allgemeine Veränderungen des Immunmilieus im Laufe der Entwicklung. Etwa die Abnahme naiver T-Zellen aufgrund der Thymusinvolution. Hingegen nimmt die Zahl der Gedächtnis-T-Zellen als Resultat des kumulativen Effektes verschiedenster Antigenkontakte während der Entwicklung zu und damit auch die Wahrscheinlichkeit einer kreuzreaktiven T-Zell-Stimulation (Baird JK. 1998)

3. Malaria Immunologie

PfEMP1 und die "var"-Multigene

Als wichtigstes Adhäsion gilt das sogenannte *P. falciparum* Erythrozyten Membranprotein 1 (PfEMP1) auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten. PfEMP1 wurde zunächst als stammspezifisches, höchst polymorphes Protein

mit hohem Molekulargewicht (250-350 kDa) beschrieben und mit einer Bindungskapazität für eine Vielzahl endothelialer Rezeptoren wie CD36, Thrombospondin (TSP), inter-cellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), Chondroitinsulphat A (CSA) und viele andere in Verbindung gebracht.

Später konnte gezeigt werden, dass sich *P. falciparum* einer klonalen Antigenvariation des PfEMP 1 mit hochvariablen Bindungseigenschaften bedient, um der Immunantwort seines Wirtes während des intraerythrozytären Stadiums seines Lebenszyklus zu entgehen (Sharma YD. 1991; Freitas-Junior LH et al. 2000).

1995 konnten die für PfEMP1 kodierenden Gene identifiziert und sequenziert werden. Jede Variante des PfEMP1 ist durch ein einzelnes Gen der "var"-Multigenfamilie kodiert, wobei pro haploidem Genom circa 60 Kopien existieren und einen großen Polymorphismus aufweisen, sowohl innerhalb des einzelnen Parasiten als auch zwischen verschiedenen Subtypen. Dabei weist die Aminosäuresequenz der meisten PfEMP1 jedoch zumindest eine Cysteinreiche Interdomänenregion (CIDR) mit einer variablen Anzahl an Duffy-binding-like (DBL) Domänen sowie eine Terminalsequenz (ATS) auf (Smith JD et al. 2000). Die auf diesem Wege erreichte enorme Antigenvarianz ist ein Schlüsselereignis bei der Virulenz von *P. falciparum* und verdeutlicht eines der Hindernisse, die der Entwicklung einer Vakzine gegenüberstehen. Die PfEMP1 Varianz ist im Falle der Schwangerschafts-assoziierten Malaria geringer als in Fällen einer Malaria ohne Schwangerschaftsbezug. Dies mag auf die Restriktion auf die Rezeptorspezifität zurückzuführen sein und könnte eine Erklärung für die relativ rasche Entwicklung einer Immunität gegenüber Schwangerschafts-assoziiierter Malaria liefern (Hviid L 2004).

CSA und HA als plazentare Rezeptoren

Als Rezeptoren für die PfEMP 1 vermittelte Adhärenz infizierter Erythrozyten innerhalb der Plazenta gelten die Glykosaminoglykane Chondroitinsulphat A

(CSA) und Hyaluronsäure (HA) der Synzytiotrophoblasten (Fried M et al. 1996; Reeder JC et al. 2000). Sie sind somit die Schlüsselmoleküle für die PAM.

Dieses spezifische Bindungsverhalten an CSA in der Plazenta wird auch mit der erhöhten Anfälligkeit Erstgebärender für eine Malariainfektion in Verbindung gebracht. Denn erst durch eine Exposition mit Parasitenantigenen während der ersten Schwangerschaft entwickeln Frauen in endemischen Gebieten eine spezifische Immunität, die sie während nachfolgenden Schwangerschaften schützt. Dabei erwerben sie gegen PfEMP 1 - Bestandteile Antikörper, welche die Parasitenadhärenz an menschliche Synzytiotrophoblasten verhindern (Ricke CH et al. 2000).

Zytokine in Infektionserkrankungen

Zytokine sind Schlüsselregulatoren des Immunsystems. Sie sind wesentlich an der Ausbildung angeborener und erworbener Immunreaktionen, sowie der Etablierung und Aufrechterhaltung des immunologischen Gedächtnisses beteiligt.

Profil und Ausmaß der Zytokinproduktion als Reaktion auf die Invasion eines fremden Organismus oder andere Initiatoren bestimmen zum größten Teil, ob die Immunantwort einen heilsamen oder zerstörerischen Effekt auf den Wirtsorganismus hat.

Am Invasionsort eines Pathogens produzierte Zytokine und Chemokine kontrollieren inflammatorische Signale für die Phagozytose.

Weiterhin regulieren sie die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und somit die Initiation erworbener Immunreaktion.

T- und B-Lymphozyten sind in hohem Maße sensibel für Zytokine, die eine Hauptrolle bei lymphozytären Effektorfunktionen und deren Differenzierung in Gedächtniszellen und andere Zell-Subtypen spielen. (Chabalgoity JA et al. 2007).

Jedoch induzieren viele Pathogene selbst (u. a. *P. falciparum*) die Expression einer Vielzahl von Zytokinen, um dem Wirtsimmunsystem durch dessen Modulation zu entgehen.

Zelluläre Mechanismen – das Paradigma der pro- und anti-inflammatorischen T-Zell-Aktivität

In den drei letzten Jahrzehnten stellte das Th1/Th2 Paradigma ein nützliches Modell zum Verständnis der Wirt-Parasiten-Interaktion und Entwicklung eines effektiven Immunsystems dar (Th: T – Helferzelle). Die grundlegenden Konzepte dieses Paradigmas sind

- dass Th1 und Th2 Zellen unterschiedliche in die Kontrolle verschiedener pathologischer Prozesse involvierte Effektormechanismen unterhalten
- dass sie ihre Funktionen durch Zytokinsignale gegenseitig inhibieren.

Für die Entwicklung einer protektiven Immunität gegen verschiedene Erkrankungen bedürfte es damit der Induktion einer bestimmten Th-Unterart, wohingegen eine andere ineffektiv oder gar schädlich wirkte. Vereinfacht wird TH1 Zellen die Induktion eines pro-inflammatorischen Milieus und TH2 Zellen eine anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben.

Die Formulierung dieses Konzeptes hatte erhebliche Relevanz für die Entwicklung von Impfstoffen, denn es impliziert die mögliche Notwendigkeit einer spezifischen Veränderung der Funktion einzelner Th Subpopulationen und des Zytokinmilieus zur Induktion einer protektiven Immunität gegen ausgesuchte Krankheiten (Chabalgoity JA et al. 2007).

Trotz der zentralen Rolle des Th1/ Th2 Paradigmas für das Verständnis der Th Zell-Interaktion wird es seit langem als sehr vereinfachtes Szenario dafür angesehen, welche Th Subpopulationen in vivo entstehen (Kelso A et al. 1995).

1991 wurde eine distinkte Gruppe von T Zellen mit immunsuppressiver Funktion und von Th1 und Th2 Zellen verschiedenem Zytokinprofil beschrieben: Die regulatorischen T Zellen (T_{regs}).

Später wurde deutlich, dass mehrere Typen von T_{regs} existieren, die aufgrund ihrer Oberflächenstruktur und ihres Zytokinprofils unterschieden werden können (Wan YY und Flavell RA 2002). Diese Zellen können in vivo gegen bakterielle, virale und parasitäre Antigene induziert werden und könnten an der Vermeidung immunopathologischer Vorgänge während einer Infektion einerseits und andererseits an der Unterstützung der Pathogenpersistenz durch Suppression einer protektiven Th1 Antwort beteiligt sein (Doetze A et al.2000; Levings MK et al. 2001; Mc Guirk P et al. 2002).

Epidemiologische Studien legen nahe, dass die T-Zell vermittelte Immunität in Malaria-endemischen Gebieten supprimiert sein könnte. Untersuchungen in vitro, an Tiermodellen und einige am Menschen erhobene Daten bringen diese Immunsuppression mit einer Malaria und anderen Parasitosen in Verbindung. Demnach könnte eine Malariainfektion die Wirksamkeit verschiedener Vakzine reduzieren (zum Beispiel T-Zell stimulierende Studienvakzine) und den Erwerb einer natürlichen Immunität gegenüber verschiedenen Infektionserkrankungen verzögern (Bejon P et al. 2007).

Interaktion von T- und B-Zell-Epitopen mit MHC-Molekülen

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex: MHC. Synonym HLA: Human Lymphocyte Antigen) umfasst eine Gruppe von Genen, die Proteine codieren, welche für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen und die immunologische Individualität wichtig sind.

T – Helferzellen (Th) spielen eine bedeutende Rolle in der Immunabwehr pathogener Keime, indem sie sowohl zur Induktion zellulärer und humoraler Immunantwort beitragen, als auch selbst Effektoren darstellen. Th erkennen Komplexe, die zwischen MHC–Molekülen der Klasse II und antigenen Peptiden

geformt werden. Diese Peptide bestehen meist aus 13 – 16 Aminosäuren (Hunt DF et al. 1992).

Peptid-Motive für solche Interaktionen, sogenannte Epitope, sind in der Vergangenheit identifiziert worden (Sette AS et al. 1989, 1993; Hammer JP et al. 1994). Unter anderem aufgrund dieser Daten lassen sich heute Voraussagen über die Bindungswahrscheinlichkeit bestimmter Epitope mit MHC Klasse II-Molekülen treffen.

Eine Auslese geeigneter T- und B-Zell Epitope sollte es möglich machen, das Immunsystem auf konservierte Epitope auch solcher Pathogene zu fokussieren, die sich durch eine hohe genetische Variabilität auszeichnen, wie beispielsweise *P. falciparum* (Nardin EH et al. 1993).

Die künstliche Fokussierung des Immunsystems auf solche Determinanten könnte besonders für die Entwicklung eines sogenannten Epitop-basierten Vakzins für die Prophylaxe und Immunotherapie der Malaria von großem Wert sein (Doolan DA et al. 1997; Hoffmann SL et al. 1996).

Warten auf den Impfstoff

In Analogie zu den meisten anderen Vektorübertragenen Krankheiten bestehen mit Vektorkontrolle und Expositionsprophylaxe zwei grundlegende Maßnahmen öffentlicher Gesundheitsförderung, die in Kombination mit medizinisch-klinischem Krankheitsmanagement den einzelnen Patienten zu schützen und die Verbreitung der Malaria einzudämmen vermögen (Rieckmann KH 2006). Allerdings lehrt uns das Beispiel dieser Infektionserkrankungen auch, dass es für deren Eradikation eines zuverlässigen Impfstoffes bedarf.

Die Forschung zu Malaria-Vakzinen verfolgt zwei grundsätzliche Strategien. Die meisten der sogenannten "Subunit" Vakzine werden entwickelt, um die natürlich erlangte Immunität zu imitieren, die sich über Jahre der kontinuierlichen Exposition gegenüber *P. falciparum* entwickelt.

Experimentelle Vakzine, wie sie attenuierte Lebendparasiten oder die Transmission blockierende Antigene darstellen, induzieren Immunantworten, die denen natürlich entwickelter Immunität überlegen sind.

Der komplexe Lebenszyklus von *P. falciparum* mit verschiedenen Entwicklungsstadien in Wirt und Vektor bietet grundsätzlich eine Vielzahl von Ansatzpunkten für die Vakzineentwicklung:

- Vakzine gegen prä-erythrozytäre *P. falciparum* Stadien sollen eine (Erythrozyten-) Infektion verhindern,
- gegen asexuelle Stadien, Virulenzfaktoren oder Toxine des Parasiten gerichtete Vakzine den Ausbruch oder Verlauf einer Malaria günstig beeinflussen, und
- Vakzine gegen die Sexualstadien von *P. falciparum* eine Transmission von Gametozyten in den Moskitovektor blockieren.

Vakzine gegen prä-erythrozytäre Stadien

SPf66

Die erste "Subunit"-Vakzine war SPf66 und bestand aus kurzen Peptid Sequenzen der zwei größten Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankerten Oberflächenproteine von Merozoiten (Invasionsstadium): merozoite protein 1 (MSP1) und circumsporozoite protein (CSP) (Graves P, Gelband H 2006).

RTS/S: Aktuell wichtigster "Subunit" Vakzinkandidat

Momentan ist die RTS/S Vakzine der am weitest entwickelte "Subunit" Vakzinkandidat. Hierbei handelt es sich um ein CSP – Fragment, das das zentrale repeat - Peptid und das an Hepatitis B Oberflächenantigen gekoppelte C –terminale T – Zell – Epitop umhüllt. Als Adjuvanz dient AS02A. (Heppner DG et al. 2005; Bojang KA 2006). Verschiedene Studien weisen eine signifikante protektive Wirkung dieses Impfstoffes gegenüber einer *P. falciparum* Infektion nach. Dabei wird unter anderem eine bis zu 90% Elimination der inokulierten Sporozoiten (Stoute JA et al. 1997; Kester KE et al. 2001; 2007), als auch die

Reduktion der klinischen Symptome und Komplikationen beschrieben (Bojang KA 2001; Alonso PL et al. 2004; 2005).

Vakzine gegen asexuelle Stadien

MSP1

MSP1 übernimmt eine zentrale Funktion bei der Invasion von Merozoiten in Erythrozyten und weist aufgrund der starken natürlichen Selektion eine hohe Allelvariabilität auf. (Conway DJ et al. 2000).

Jedoch besteht MSP1 aus vier Untereinheiten und die meisten natürlich vorkommenden Varianten stammen von lediglich zwei Prototypen ab. Daher ist eine Kombination rekombinanter MSP1 Proteine ein viel versprechender Ansatz (Pan W, et al. 1999), vor allem das auf dem *falciparum malaria protein-1* (FMP1) basierenden FMP1/AS02A (Withers MR et al. 2006; Thera MA et al. 2006).

Weiterhin untersucht werden MSP3 (Hisaeda H et al. 2002; Druilhe P et al. 2005; Polley SD et al. 2007) und AMA1 (Apical membrane antigen 1). Letzteres stellt einen möglicherweise gegen mehrere Entwicklungsstadien wirksamen Impfstoff dar, da es am Invasionsprozess sowohl von Merozoiten als auch von Sporozoiten beteiligt zu sein scheint (Silvie O et al. 2004).

var2CSA

Die besterforschte Form der "variant surface antigens" ((VSAs) variablen Oberflächenantigene) auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten ist die Familie der "var"- Gene, die für etwa 60 verschiedene *P. falciparum* Erythrozyten Membran Proteine (PfEMP1) kodiert und einer klonalen Antigenvariation unterliegt (Kyes S et al. 2001). Dieses außergewöhnliche Antigen-Repertoire erklärt zum Teil die verzögerte Kinetik natürlich erworbener Immunität und stellt die Vakzinentwicklung vor schwerwiegende Probleme.

Ohne die Identifizierung der wichtigsten PfEMP1 Fraktionen, bleibt die Entwicklung eines darauf beruhenden Impfstoffes eine ferne Vision, mit Ausnahme einer einzigartigen und strukturell unterschiedlichen Variante des

PfEMP1: des sog. „variant surface antigen 2, chondroitin sulphate A-binding (var2CSA) (Salanti A et al. 2003).

Hohe Antikörpertiter korrelieren mit einer protektiven Wirkung gegenüber der PAM (Salanti A et al. 2004), was die Möglichkeit einer Vakzineentwicklung für diese Entität unterstreicht.

Transmissionsblockierende Vakzine gegen Sexualstadien

Transmissionsblockade

Die Induktion von Antikörpern gegen Oberflächenantigene von Gametozyten und Ookineten, die eine obligate Parasitenfertilisation und deren zygotische Transformation blockieren, ist eine elegante Methode, den Lebenszyklus des Parasiten zu unterbrechen.

Zwei der wichtigsten ookinetischen Oberflächenantigene, die essentielle Funktionen bei der Weiterentwicklung zur Oozyste ausüben, sind Pfs25 (Kubler-Kielb J et al. 2007) und Pfs28 (Tomas AM et al. 2001).

Da diese Proteine lediglich während des Transmissionsprozesses in den Mückenvektor exprimiert werden, entwickelt der menschliche Wirt kaum spezifische Antikörper dagegen (Carter R et al. 1989). Der fehlende Selektionsdruck führt auf der anderen Seite zu einer bemerkenswerten genetischen Konservierung.

Ganze Parasiten

Der erste - bisher unübertroffene - Erfolg, eine protektive Immunreaktion gegen Malariaparasiten zu induzieren, wurde durch den Einsatz radioattenuierter Sporozoiten im Nager – Modell erzielt (Nussenzweig RS et al. 1967).

Analog zu anderen Lebendimpfstoffen, induzieren attenuierte Plasmodien im Leberstadium wahrscheinlich eine protektive Zell – vermittelte Immunreaktion gegen das gesamte Antigen - Spektrum dieses Stadiums und könnten sich als die potenteste Malaria – Vakzine herausstellen.

„Subunit“ - Impfstoffe haben kompletten Lebendvakzinen gegenüber die großen Vorzüge geringer Kosten, hoher Sicherheit und chemischer Stabilität bei guter Fokussierung der Wirtsimmunreaktion auf relevante Zielantigene.

Ihre limitierte Komplexität wirft jedoch Fragen bezüglich ihrer Vergleichbarkeit mit bestrahlten Sporozoiten- Vakzinen auf, die als „Gold Standard“ für protektive Immunität angesehen werden.

Einige der Nachteile der Lebendimpfung wurden durch die Einführung genetisch attenuierter Parasiten (GAPs) überwunden (Mueller A-K et al. 2005). Jedoch bleibt fraglich, ob eine natürliche Plasmodien – Exposition die GAP – induzierte Immunreaktion verstärken oder abschwächen würde.

Rationale Modulation des Zytokinmilieus

Impfstoffe, die auf die Induktion einer lang anhaltenden Immunität abzielen, sollten das Zytokinmilieu dahingehend modulieren, angemessene Immun - Effektormechanismen für jedes einzelne Pathogen und eine ausreichende Menge langlebiger Gedächtniszellen zu induzieren. Einige Pathogene verfügen darüber hinaus selbst über die Eigenschaft, die Zytokinumgebung zu beeinflussen, um ihr Überleben im Wirtsorganismus zu sichern.

Ein geeigneter Impfstoff sollte also auch in der Lage sein, diesem Einfluss entgegenzusteuern. Dies jedoch ist keine leichte Aufgabe, da die Zytokininteraktionen sehr komplex sind und der resultierende Effekt auf die Immunreaktion von einer guten Zeitabstimmung der Exposition, den Zielzellen und der vorbestehenden Zytokinumgebung abhängen. Obwohl Zytokine also zur Steuerung von Immunreaktionen eingesetzt werden können, besteht diesbezüglich weiterhin erheblicher Forschungsbedarf.

Die Einflussnahme auf das Zytokinmilieu wird hauptsächlich durch den Einsatz von Hilfs- und Zusatzstoffen, sogenannten Adjuvanzen ausgeübt. Ihre Auswahl ist stark limitiert, sodass momentan ein nennenswerter Anteil der Vakzinentwicklung auf die Erforschung geeigneter Hilfsstoffe abzielt.

Kombinierte Strategien

Ein zentrales Hindernis für die Entwicklung einer Malaria Vakzine besteht in der fehlenden sterilisierenden Immunität während der natürlichen Infektion. Das uns zur Verfügung stehende Repertoire an erfolgreichen Impfstoffen wirkt gegen akute virale und bakterielle Infektionen. Die entsprechenden Impfstoffe imitieren dabei die natürliche Erstinfektion, die anschließend zur Immunität führt.

Diese initiale Immunität existiert nicht bei einer Plasmodieninfektion und ein entsprechender Impfstoff wird nur dann ein brauchbares Instrument der Krankheitsbewältigung werden, wenn er einen mehrjährigen Schutz nach wenigen Immunisationen erwirkt.

Ein möglicher Ansatz könnte in der Kombination verschiedener vorbeschriebener Strategien liegen.

Die Forschung an bestehenden und alternativen Strategien zur Bekämpfung der Malaria als einer der größten medizinischen Herausforderungen unserer Zeit ist von höchster Priorität.

4. Die Studie

Albert Schweitzer

Albert Schweitzer (1875 bis 1965), Dr. der Theologie, der Philosophie und später der Medizin verließ 1913 Europa, um im äquatorial-afrikanischen Gabun als Arzt und Missionar tätig zu werden.

Auf dem Gelände der katholischen Mission Lambaréné errichtete er das bekannte "Urwaldspital" und arbeitete dort mit wenigen Unterbrechungen bis zu seinem Tode. 1954 wurde ihm dafür der Friedensnobelpreis verliehen.

Heute wird das Hospital von der internationalen Stiftung Albert Schweitzer weitergeführt.

Gabun und Lambaréné

Lambaréné liegt knapp 200 Kilometer südlich des Äquators im westlichen Zentralafrika und ist mit etwa 15000 Einwohnern die Hauptstadt einer der neun Provinzen der Republik Gabun. Die Stadt liegt an einer erst kürzlich ausgebauten Hauptverkehrsader zwischen Libreville, der Hauptstadt Gabuns, und der demokratischen Republik Kongo. Auf einer Fläche etwa halb so groß wie Frankreich leben lediglich eine Million Einwohner und Dank des Exports von Erdöl, Bodenschätzen und Tropenhölzern gehört es zu den wohlhabendsten Ländern Afrikas, jedoch mit einer beträchtlichen Verteilungsdiskrepanz.

Albert- Schweitzer-Hospital und Forschungslabor der Universität Tübingen

Das Albert-Schweitzer-Hospital wird von der Republik Gabun teilweise subventioniert und ist für die medizinische Grundversorgung der Region Lambaréné zuständig. Im Hospital finden sich neben der Notambulanz und Poliklinik Stationen der Inneren Medizin, der Chirurgie, der Pädiatrie, sowie der Geburtshilfe sowie eine Zahnklinik.

Hier arbeiten 120 afrikanische Angestellte zusammen mit sechs bis sieben Ärzten aus Europa und den Vereinigten Staaten. Bis zu 180 Patienten können aufgenommen werden. Pro Tag werden ungefähr 120 Konsultationen und etwa zehn chirurgische Eingriffe vorgenommen.

Die jährlichen Ausgaben von etwa dreieinhalb Millionen Franken werden zu je einem Drittel vom gabunesischen Staat, vom deutschen und vom schweizerischen Hilfsverein für das Lambarene-Spital getragen. Weitere Hilfsvereine aus Frankreich, Italien, England, Schweden und den USA übernehmen ebenfalls einen Teil des Aufwands.

Das 1981 auf dem Gelände des Albert-Schweitzer-Hospitals integrierte Forschungslabor hat sich der Erforschung der hauptsächlichen Faktoren für die Krankheitsbelastung der lokalen Bevölkerung verschrieben. Seit 1996 arbeitet es eng mit der parasitologischen Abteilung des Tropeninstituts der Universität

Tübingen zusammen und legt seither einen Forschungsschwerpunkt auf Pathophysiologie und Behandlung der Malaria.

Theoretische Basis der Studie

In einer 1998 publizierten Studie erwähnen Southwood und Mitarbeiter mehrere HLA-Moleküle mit großflächig überlappenden Bindungsarealen. Darunter die drei HLA-Subtypen HLA-DRB1*0101, DRB1*0401 und DRB1*0701 (Southwood S et al. 1998).

Die Berücksichtigung dieser Daten bietet möglicherweise einen Ansatz zur Lösung des angesprochenen Problems des MHC/HLA-Polymorphismus.

Aktuelle Studienergebnisse liefern überzeugende Hinweise dafür, dass die Expression "var"-Gen abhängiger DBL- γ Aminosäuresequenzen bei plazentaren Parasiten zu einem hohen Grad konserviert geschieht.

So konnte gezeigt werden, dass diese Sequenzen in Isolaten aus verschiedenen afrikanischen Gebieten (u.a. Gabun, Kamerun und Kenia) bis zu 99% übereinstimmen (Khattab A et al. 2003).

Ziel der Studie

Das Wissen über die immunologischen Vorgänge während und nach einer Plasmodieninfektion, vor allem in der Schwangerschaft, ist sehr begrenzt. Auch die Auswirkungen einer Schwangerschafts-assoziierten Malaria auf das kindliche Immunsystem, sind bisher ungenügend erforscht.

Oben genannte Ergebnisse aufgreifend, untersuchten wir in unserer Studie die Immunantwort isolierter Leukozyten auf vier ausgewählte "var"-Peptide der DBL- γ Domäne.

Bei diesen Peptiden handelt es sich um 15-mere, die von den konserviertesten Regionen der Domäne kodiert werden.

Damit wurden Mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus zwei verschiedenen Kompartimenten gesondert stimuliert. Zum einen peripherenvenöses Blut der Mutter, zum anderen Blut, das direkt nach der Entbindung aus der Nabelschnurvene entnommen wurde und damit den kindlichen Blutkreislauf repräsentiert. So sollte der grundsätzlich unterschiedlichen Immunverhältnisse bei Kind und Mutter Rechnung getragen werden.

Den hohen Polymorphismus der HLA-Moleküle auf Immunzellen des menschlichen Wirtes berücksichtigend, wurde auf die oben erwähnten Untersuchungen von Southwood et al. Bezug genommen.

Die vier für die Studie ausgewählten Peptide weisen einen hohen prädictiven Bindungswert für die genannten HLA – Subtypen auf.

Angesichts der Aktualität der erwähnten Studienergebnisse liegen zu diesem Thema kaum Daten vor, sodass wir hoffen, mit dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Immunogenese der Schwangerschafts-assoziierten Malaria und deren Auswirkungen auf das kindliche Immunsystem zu erlangen.

Lässt sich, wie unsere Ergebnisse nahelegen, durch die DBL- γ 3 Peptide eine spezifische Immunantwort induzieren, könnten sie aufgrund ihrer konservierten Expression neue Wege zur Vakzieentwicklung eröffnen.

3. Material und Methoden

1. Studienpopulation

Die Arbeit wurde am Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné, Gabun durchgeführt, einem Gebiet mit ganzjähriger Transmission von *P. falciparum* (Sylla EH et al. 2000).

Der Einschluss der Patientinnen in die Studie erfolgte nach mündlicher Aufklärung und Einverständniserklärung durch Unterschrift im Sinne eines informed consent.

Im Zeitraum zwischen Mai und Dezember 2003 wurden insgesamt 85 Proben venösen Blutes sowie Nabelschnurblutes in heparinisierte Blutabnahmeröhrchen (Vacutainer, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) entnommen. Das Blut der verschiedenen Kompartimente (periphervenöses und plazentares Blut der Mutter sowie Nabelschnurblut) wurde anhand der lichtmikroskopischen Untersuchung „dicker Tropfen“ nach Giemsa-Färbung auf das Vorhandensein von *P. falciparum* zum Zeitpunkt der Geburt untersucht.

Die Krankenakten gesunder Patientinnen wurden gesichtet, um die adäquate Diagnose und Therapie stattgehabter Malaria tropica Episoden während der Schwangerschaft sicherzustellen. Die meisten dieser Erkrankungen wurden spätestens zwei Wochen präpartal mittels Chinin behandelt, einem Chemotherapeutikum mit 100% Wirksamkeit gegenüber einer unkomplizierten *P. falciparum* Malaria im Untersuchungsgebiet.

Aufgrund dieser Kriterien wurden für die Studienpopulation drei unterschiedliche Gruppen definiert:

- Negativ: Zum Zeitpunkt der Geburt in allen Kompartimenten ohne Nachweis von *P. falciparum* oder einer floriden Infektion und bezüglich Malaria negative Schwangerschaftsanamnese;
- Plazenta positiv: Nachweis asexueller *P. falciparum* Stadien im plazentaren Blut;

- Behandelt: Zum Zeitpunkt der Geburt in allen Kompartimenten ohne Nachweis von *P. falciparum* oder einer floriden Infektion und dokumentierte Diagnose und erfolgreiche Behandlung einer *P. falciparum* Infektion während der Schwangerschaft.

Der Anteil der Primiparae mit nachgewiesener plazentarer *P. falciparum* Infektion war verglichen mit dem der Multiparae signifikant höher ($p < 0.001$).

Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der Internationalen Stiftung des Albert–Schweitzer–Hospitals in Lambaréné genehmigt.

2. Isolation Mononuklearer Zellen und Zellkultur

Die Isolation der Mononuklearen Zellen aus Nabelschnurblut erfolgte laut Herstellerstandard mittels Schweregradzentrifugation auf Ficoll – Paque (Amersham, Freiburg, Deutschland).

Die Zellisolate wurden direkt in einem Verhältnis von 5×10^6 Zellen / ml in vorgefertigtem Medium (RPMI 1640 Medium (Sigma, Diesenhofen, Deutschland) mit Zusatz von 10% (wt/vol) humanem Serum (AB) (Sigma), 1 mM L-alanylglutamin (Life Technologies, Grand Island, NY), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies), und 1 mM Natriumpyruvat (Life Technologies)) gelöst.

Zur Unterstützung einer Kostimulation wurden je 0.5 µg/ml anti-human CD28 und CD49d Antikörper zugesetzt (BD Biosciences, San Jose, CA) (Gauduin MC et al. 2004).

Insgesamt 0,6 ml der Zellsuspension wurden in eine 48-Loch Flachboden-Zellkulturplatte (Falcon) transferiert. Entweder eines der vier DBL-γ3 Peptide (10 µg/ml), aufgereinigtes *Mycobacterium tuberculosis* Proteinderivat (10 µg/ml) (StatensSerumInstitut, Kopenhagen, Dänemark) oder Phytohämagglutinin (5 µg/ml) (Sigma, Diesenhofen, Deutschland) wurde der Zellkultur zugefügt und diese bei 37°C unter Luftbefeuchtung und Begasung mit 5% CO₂ inkubiert.

Um eine Lyse der Zellwand herbeizuführen und den intrazelluläre Zytokinspiegel ermitteln zu können, wurden der Kultur nach 18 Stunden Inkubationszeit 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma) zugeführt und diese weitere 4 Stunden inkubiert, bevor die Fixation und Antikörpermarkierung erfolgte.

3. Erfassung intrazellulärer Zytokinproduktion durch Durchflusszytometrie

Zur Erfassung intrazellulärer Zytokine und Oberflächenmarker wurden die Zellen direkt nach der Inkubation zweifach in gekühlter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mit zweiprozentiger Paraformaldehyd/PBS Lösung fixiert, und bei 4°C kühl gelagert.

Für die Beladung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden die Zellen für 15 Minuten in einer PBS/10% fetalem bovinem Serum mit 2 µl Fc-Rezeptor blockierenden Lösung (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) auf Eis inkubiert.

Danach erfolgte die Oberflächenmarkierung mit spezifischen an Peridinin Chlorophyll Protein gekoppelte Antikörpern gegen humanes CD3 (SK7) bzw. mit ebenso gekoppelten Mäuse-IgG1 (MOPC-31C) als Isotopenkontrolle.

Für die Markierung intrazellulären Gamma-Interferons (IFN-γ), Interleukins-10 (IL-10) und IL-13 wurden Cytofix/Cytoperm Plus kits (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) benutzt, wobei gemäß dem Protokoll des Herstellers folgende Antikörper zum Einsatz kamen: IFN-γ-Fluoresceinisothiocyanat (B27), IL-10-allophycocyanin (JES3-19F1), IL-13- IFN-γ- Fluoresceinisothiocyanat (JES10-5A2) bzw. als Isotopenkontrolle IgG1- Fluoresceinisothiocyanat der Maus (MOPC-21), IgG2a-Allophycocyanin (R35-95) und IgG1-Phycoerythrin (A11-01) von Ratten.

Die durchflusszytometrische Analyse an einem FACScan wurde mit der CellQuest (Version 3.3) Datenverarbeitungs-Software (BD Biosciences) durchgeführt, wobei je ein Minimum von 100000 Lymphozyten analysiert wurde. Entsprechend wurden Analysewerte für sieben nicht exponierte Europäer ermittelt, um die Grundreaktivität zu erhalten, die von derjenigen der

untersuchten Studienobjekte abgezogen werden muss (Median der Antwort + 3 Standardabweichungen)

4. Nachweis für DBL- γ 3 Peptide, glutamatreiches Protein (GLURP) und gereinigtes Proteinderivat spezifischer IgM- und IgG- Antikörper in Nabelschnurblut und mütterlichem peripherenvenösem Blut durch ELISA

Die Antikörperspiegel gegen die vier DBL- γ 3 Peptide, glutamatreiches Protein (überlassen durch Michael Theisen (Theisen M et al. 1995)) und gereinigtes *Mycobacterium tuberculosis* Proteinderivat (StatensSerumInstitut, Kopenhagen, Dänemark) wurden anhand eines standardisierten ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ermittelt.

Zunächst wurden ELISA - Platten (Immulon2, Dynatech) kurz benetzt: entweder mit 100 μ l (10 μ g/ml) eines jeden DBL- γ 3 Peptides, 100 μ l (100 ng/ml) glutamatreichen Proteins, oder mit 100 μ l (100 ng/ml) gereinigten Proteinderivats, jeweils gelöst in PBS (0.01 M, pH 7.2).

Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Platten zweimalig in mit 0,05% Tween® 20 versetzten PBS (PBS-T) gewaschen und die Reaktion wurde mit 2% bovines Serumalbumin enthaltendem PBS-T (PBS-TB) gestoppt.

Die Plasmaproben wurden dann auf 1:200 in PBS-TB verdünnt gepaart auf Zellkulturplatten übertragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen.

Daraufhin wurden die ungebundenen Antikörper durch viermaliges Waschen der Platten mit PBS-T entfernt, bevor peroxidasegekoppelte Ziegenantikörper gegen humane IgG- oder IgM-Antikörper (Biosource, Solingen, Deutschland) in einer PBS-TB Verdünnung von 1:50000 zugeführt wurden.

Nach einer Stunde wurden die Platten erneut viermalig in PBS-T gewaschen und je 100 μ l Tetramethylbenzidin Lösung (TMB) (Biosource) beigefügt. Die Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 100 μ l 1.8 NH_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei 450 nm abgelesen.

Um die relative Antikörper-Konzentration der getesteten Plasmaproben abzuschätzen, wurden Normkurven erstellt, indem sukzessive Verdünnungen

gepoolter Plasmaproben von fünf Gabunischen Erwachsenen mit positivem anti DBL- γ 3 Antikörperstatus ausgelesen wurden.

Um die abzuziehende Grundaktivität zu ermitteln, berechneten wir den Median der optischen Dichte plus drei Standardabweichungen im Plasma von Negativkontrollen (10 Europäer ohne bekannte *P. falciparum* Disposition).

5. Peptide

Wir verwendeten synthetische Peptide, die mit einer DBL- γ 3 Sequenz eines plazentaren *P. falciparum* Isolats korrelieren, das 1996 in Kamerun erstellt wurde (Isolat 732, GenBank Zugangsnummer AF334807) (Khattab A et al. 2001) und das eine zu über 98% identische Aminosäuresequenz wie zwei Isolate aufweist, die 2000 in Lambaréné gefunden wurden (Khattab A et al. 2003).

Der SYFPEITHI Algorithmus (Rammensee H et al. 1999) wurde verwendet, um Motive zu ermitteln, die mit höchster Wahrscheinlichkeit an in der Gabunesischen Bevölkerung vorhandene HLA-DR Moleküle binden (Migot-Nabias F et al. 1999) und zur häufigsten HLA-DR Überfamilie (Southwood S et al. 1998) gehören.

Tabelle 1 Aminosäuresequenzen der Peptide konservierter Regionen

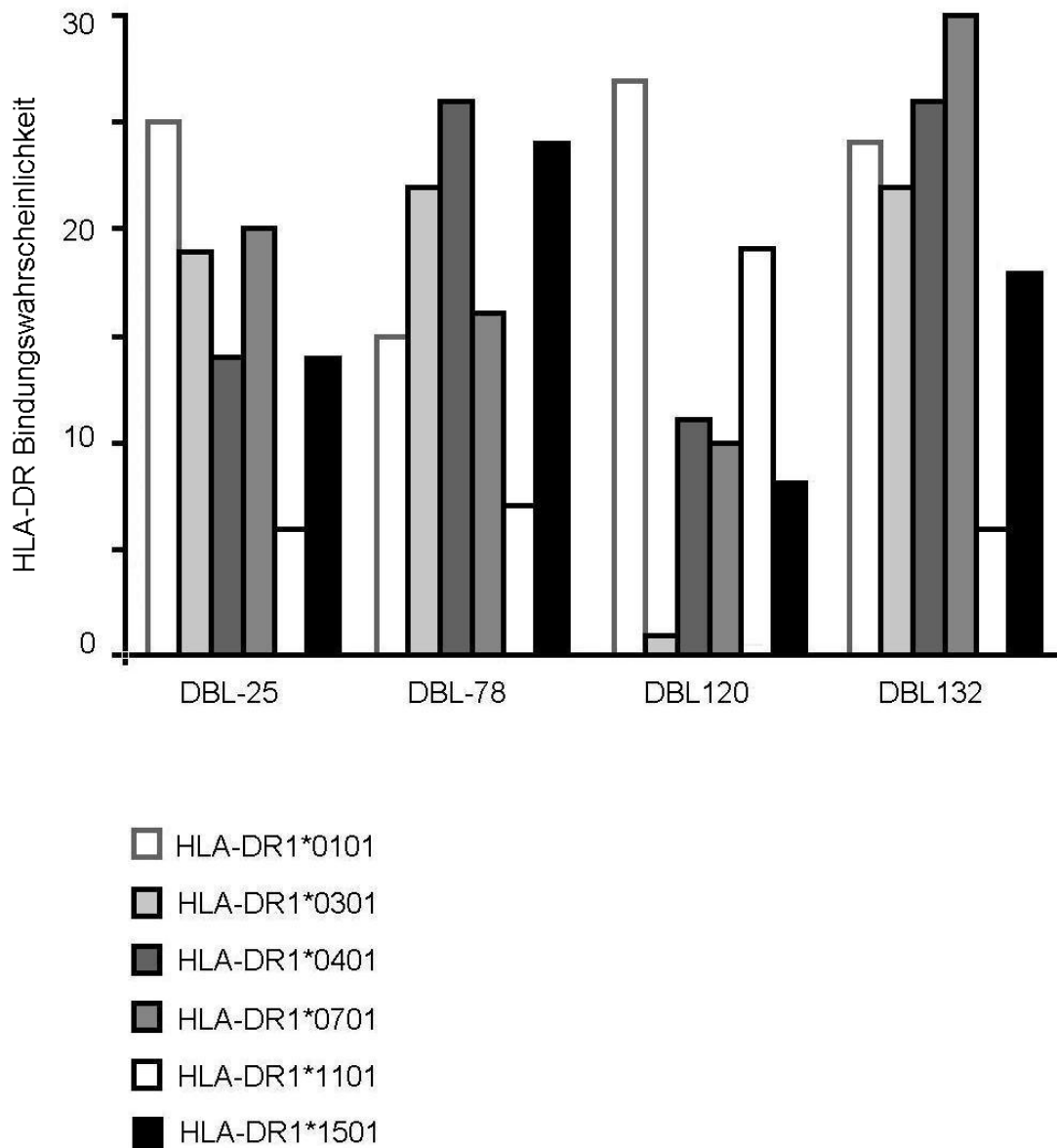
DBL- γ 3 Peptide	Aminosäuresequenz
DBL25	EAFTKTAAAETFLAW
DBL78	DICLGTDDISVKQGDV
DBL120	PQTWWEKNAKDIWEG
DBL132	WEGMLCALTNGLTDA

Tabelle 1 zeigt die Aminosäuresequenzen der vier in dieser Studie verwendeten Peptide und Abbildung 1 die korrespondierenden Punktwerte für den genannten Algorithmus. Die vier DBL- γ 3 Peptide wurden durch die Firma ThermoHybaid

(Ulm, Deutschland) mit einem Reinheitsgrad von über 98% synthetisch hergestellt und mit steriler PBS in Lösung gebracht.

Abbildung 1

Bindungswahrscheinlichkeit für HLA-DR Phänotypen laut SYFPEITHI - Algorithmus



6. Statistische Auswertung

Alle Abbildungen wurden mit StatView erstellt. Für die Ermittlung der Signifikanz von Unterschieden stetiger Variablen zwischen zwei Gruppen wurden der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-U-Test (zwei Gruppen) angewandt. Für Beziehungen zwischen zwei konstanten Variablen kam der nichtparametrische Spearman rank correlation Test (ρ) und für Proportionsunterschiede der Fisher exact test (Exakter Test auf Unabhängigkeit nach Fisher) zum Einsatz.

4. Ergebnisse

1. In vitro T-Zell-Zytokinproduktion als Reaktion auf DBL- γ 3 Peptide in Nabelschnurblut und mütterlichem Blut

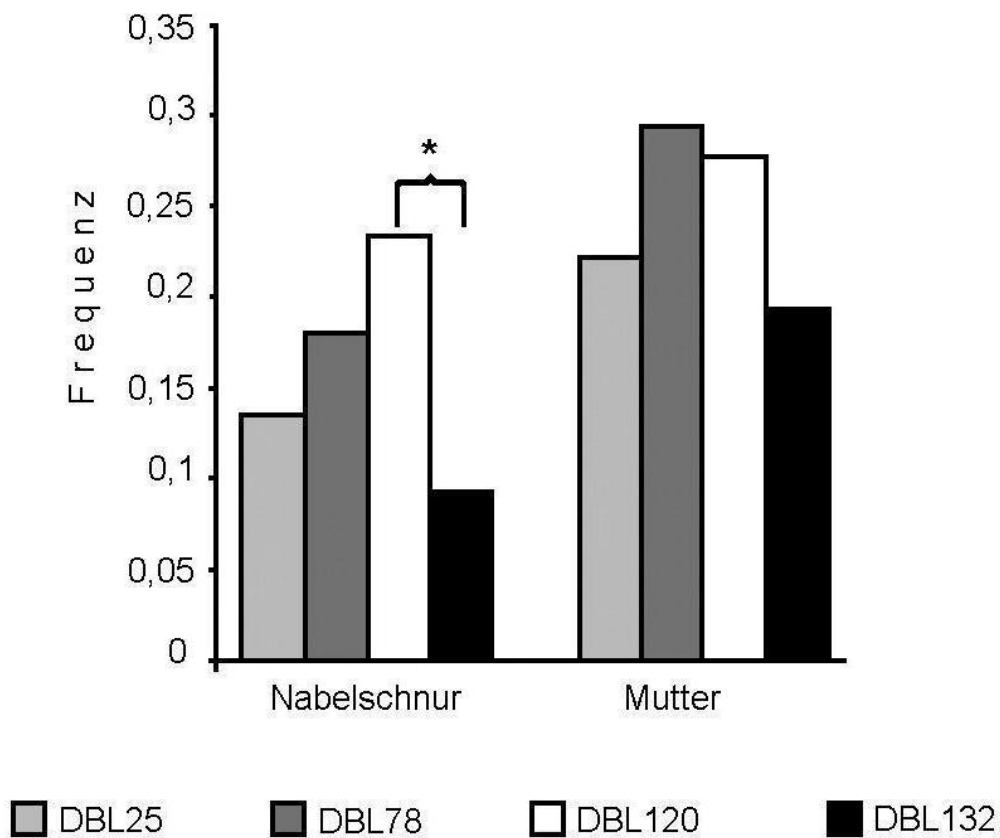
Nachdem Mononukleare Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC), mütterlichem Blut (PBMC) und Blut bezüglich Malaria nicht exponierter Europäer (Kontrollgruppe) über Nacht mit den vier DBL- γ 3 Peptiden zur Stimulation inkubiert worden waren, erfolgte die durchflusszytometrische Messung intrazellulären IFN- γ , IL-13 und IL-10.

Der Anteil der Proben mononuklearer Nabelschnurblutzellen, bei dem eine Zytokinproduktion als Antwort auf die Peptidstimulation nachzuweisen war, reichte von 0,09 bis 0,23, wobei DBL 120 die stärkste Reaktion hervorrief, in absteigender Intensität gefolgt von DBL 78, DBL 25 und DBL 132 (Abbildung 2A). Der Anteil mütterlicher peripherenöser mononuklearer Zellen (PBMC) mit positiver Reaktion reichte von 0,19 bis 0,29. Hierbei zeigte DBL 78 eine geringfügig stärkere Reaktion als DBL 120, wiederum gefolgt von DBL 25 und DBL 132 (Abbildung 2A).

Abbildung 2

Intrazelluläre Zytokinaktivität von T-Zellen aus Nabelschnur- und mütterlichem Blut nach Stimulation der CBMCs (cord blood mononuclear cells) und PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) mit DBL- γ 3 Peptiden

A



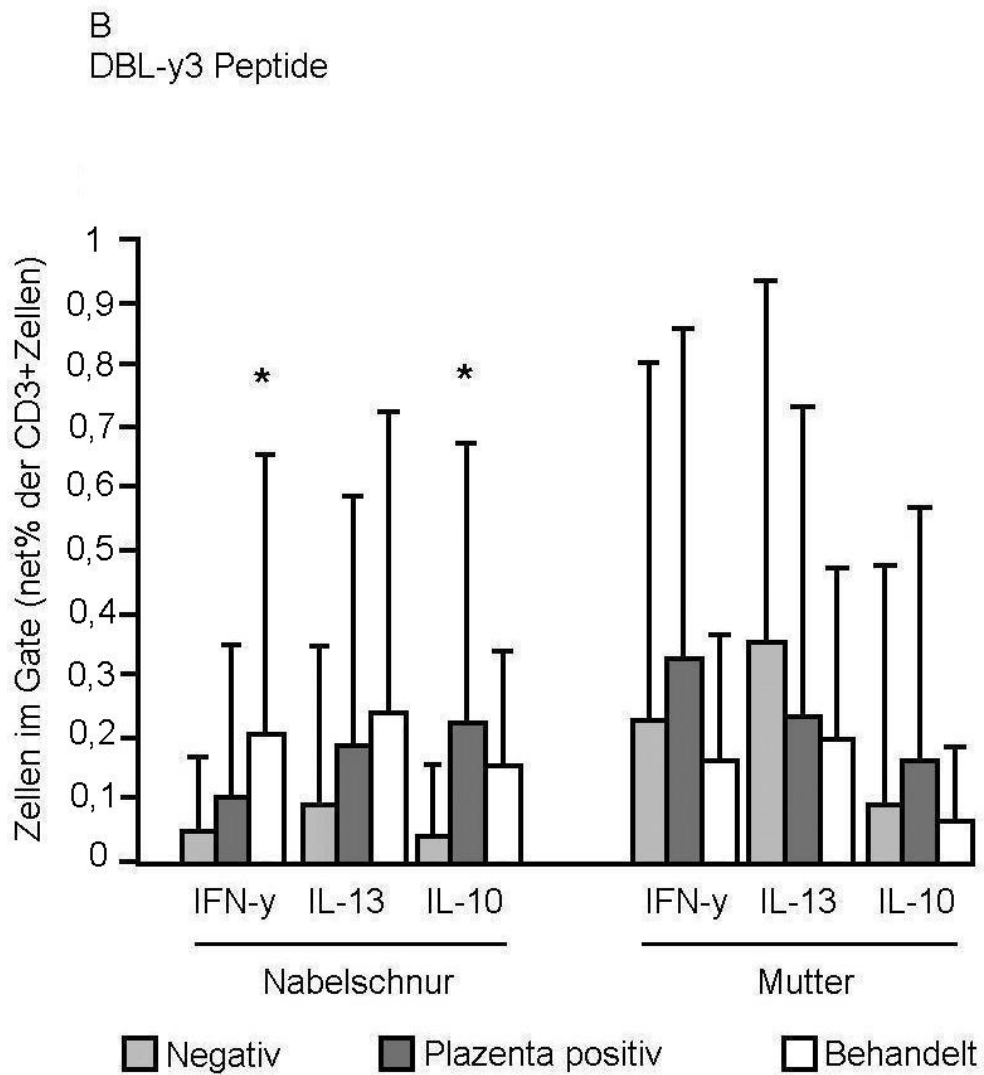
A Prozentsatz (Frequenz) der CD3⁺ Zellen enthaltenden Proben mit positiver Zytokinreaktion auf die DBL- γ 3 Peptide in den beiden Kompartimenten.

Mittlerer Prozentsatz der CD3⁺ Zellen innerhalb des „Gates“ in den Kompartimenten mit IFN- γ , IL-13, oder IL-10 Produktion nach Stimulation mit

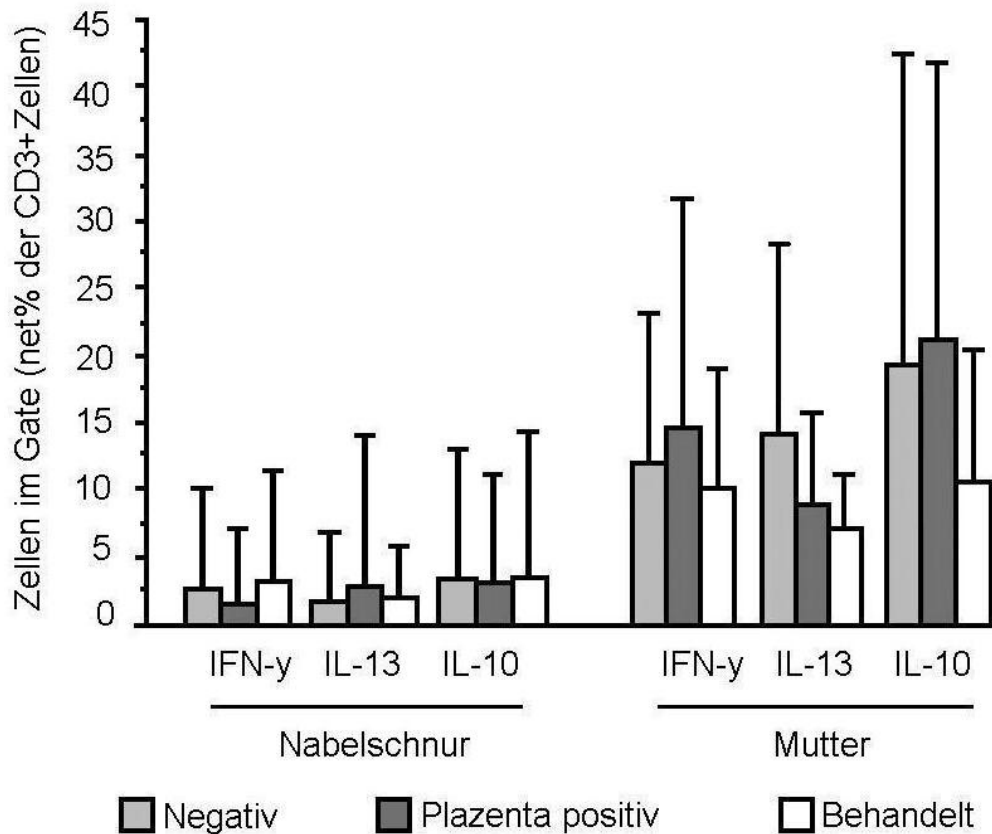
B DBL- γ 3 Peptiden oder

C PHA (Phytohämagglutinin),

gruppiert nach positiver Schwangerschaftsanamnese bezüglich Malaria.



C
PHA



Die Balkendiagramme zeigen die mittleren Prozentzahlen mit Standardabweichungen. Probenumfang: 7 europäische Negativkontrollen; Nabelschnur: 19 Negativ, 14 Plazenta positiv, 17 Behandelt; Mutter: 8 Negativ, 7 Plazenta positiv, 7 Behandelt. *, $p < 0.05$ im Fisher-exact-Test oder Mann-Whitney-Test.

CBMC - Isolate von Neugeborenen der Studiengruppe „Behandelt“ beinhalteten verglichen mit der Negativkontrolle signifikant höhere Prozentanteile DBL- γ 3 Peptid spezifischer CD3⁺IFN- γ ⁺ Zellen, während CBMC - Isolate aus der Gruppe „Plazenta positiv“ eine signifikant höhere Relationen DBL- γ 3 Peptid spezifischer CD3⁺IL-10⁺ Zellen aufwiesen (Abbildung 2B).

CBMC - Isolate sowohl aus der Studiengruppe “Plazenta positiv” als auch der Gruppe “Behandelt” wiesen verglichen mit der Gruppe „Negativ“ erhöhte Anzahlen CD3⁺IL-13⁺ Zellen auf, wenngleich die Unterschiede nicht statistisch signifikant waren.

Der Prozentsatz DBL- γ 3 Peptid spezifischer Zellen mit Aktivität entweder gegenüber IFN- γ , IL-13 oder IL-10 war innerhalb der mütterlichen Leukozytenisolate der drei Studiengruppen statistisch annähernd gleich, jedoch mit tendenziell höheren Anteilen CD3⁺IL-10⁺ Zellen in der Gruppe „Negativ“ sowie vermehrt CD3⁺IFN- γ ⁺ und CD3⁺IL-10⁺ Zellen in der Gruppe „Plazenta positiv“ (Abbildung 2B).

Es konnten keine signifikanten Beziehungen zwischen Zytokinproduktion DBL- γ 3 Peptid spezifischer Zellen aus mütterlichem Blut und der Parität hergestellt werden (Daten nicht dargestellt).

Der Vergleich der Zytokinproduktion von CD3⁺ Zellen in Nabelschnurblut mit der Produktion derjeniger in mütterlichem Blut nach unspezifischer Stimulation mit Phytohämagglutinin zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den nach dem mütterlichen *P. falciparum* Infektstatus eingestuften Gruppen (Abbildung 2C).

2. IgM und IgG Antikörper mit Spezifität für DBL-γ3 Peptide sind in Nabelschnurblut und Plasma der Mutter nachweisbar

Aus Nabelschnurblut und peripherenvenösem Blut der Mutter gewonnenes Plasma wurde auf das Vorhandensein von IgM- und IgG-Antikörpern untersucht, die eine Spezifität für die verwendeten DBL-γ3 Peptide aufwiesen.

Für Vergleichsuntersuchungen dienten rekombinantes glutamatreiches Protein (GLURP) und aufgereinigte Proteinderivatpräparate.

Da mütterliche IgM-Antikörper nicht in der Lage sind die Plazentaschranke zu überwinden, ist anzunehmen, dass in Nabelschnurblutplasma nachgewiesene *P. falciparum* spezifische IgM auf eine Stimulation fetaler B-Lymphozyten durch transplazentar übertragene Antigene hinweisen.

Mit Ausnahme des DBL78 konnten die höchsten Spiegel an IgM Antikörpern mit Spezifität für die DBL-γ3 Peptide in den Nabelschnurplasmaisolaten der Studiengruppe „Plazenta positiv“ nachgewiesen werden (Abbildung 3A).

Die prozentualen Anteile positiver Reaktionen aller Peptide unter der Gesamtzahl der Neugeborenen waren DBL25 (8%), DBL78 (8%), DBL120 (10%) und DBL132 (4%).

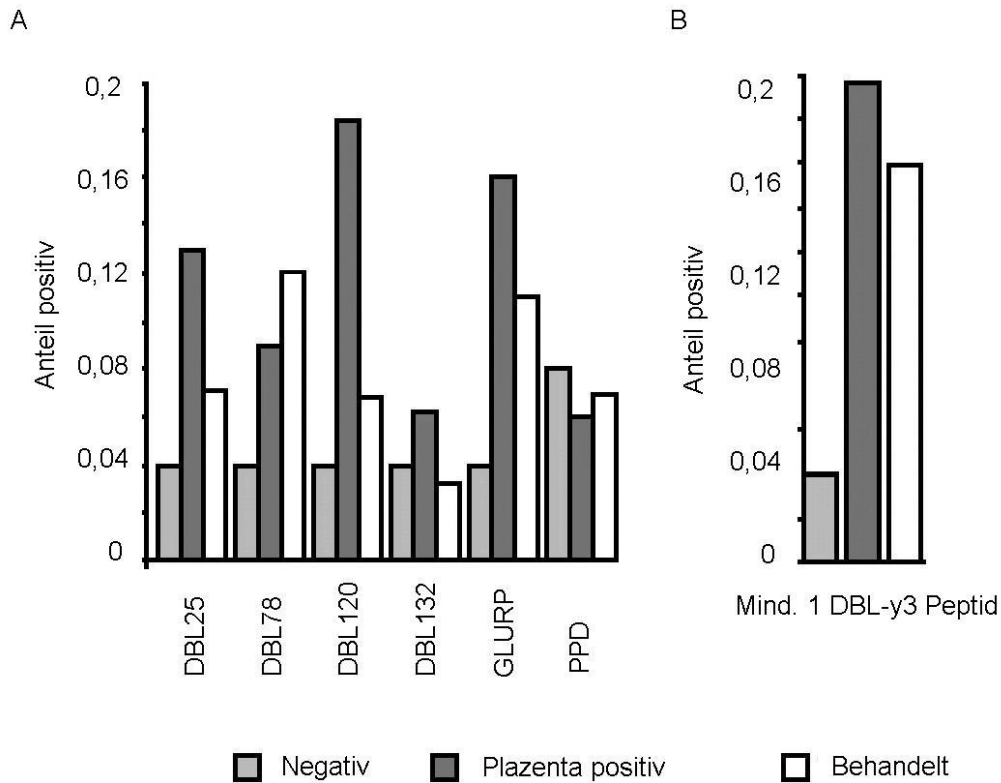
Ein Drittel der Nabelschnurplasmaisolate mit DBL120 spezifischen IgM beinhalteten auch IgM mit Spezifität für DBL132.

Unter den Neugeborenen der Studiengruppe „Behandelt“, war der Anteil der Plasmaisolate mit IgM vermittelter Immunreaktion gegenüber DBL25, DBL78, DBL120 und glutamatreiches Protein um den Faktor 1,5 größer als in der Gruppe „Negativ“ (Abbildung 3A).

Insgesamt nachgewiesen wurde IgM mit Spezifität für die DBL-γ3 Peptide in 7 der 32 (22%) Nabelschnurblutplasmaisolate von Neugeborenen von Müttern mit florider *P. falciparum* Infektion zum Zeitpunkt der Geburt und in 5 von 28 (18%) Isolaten aus Schwangerschaften mit behandelter Infektion. Dies traf dagegen lediglich für eine von 25 (4%) der Nabelschnurblutplasmaisolate der Neugeborenen von Müttern mit negativer Malariaanamnese in der Schwangerschaft zu (Abbildung 3B).

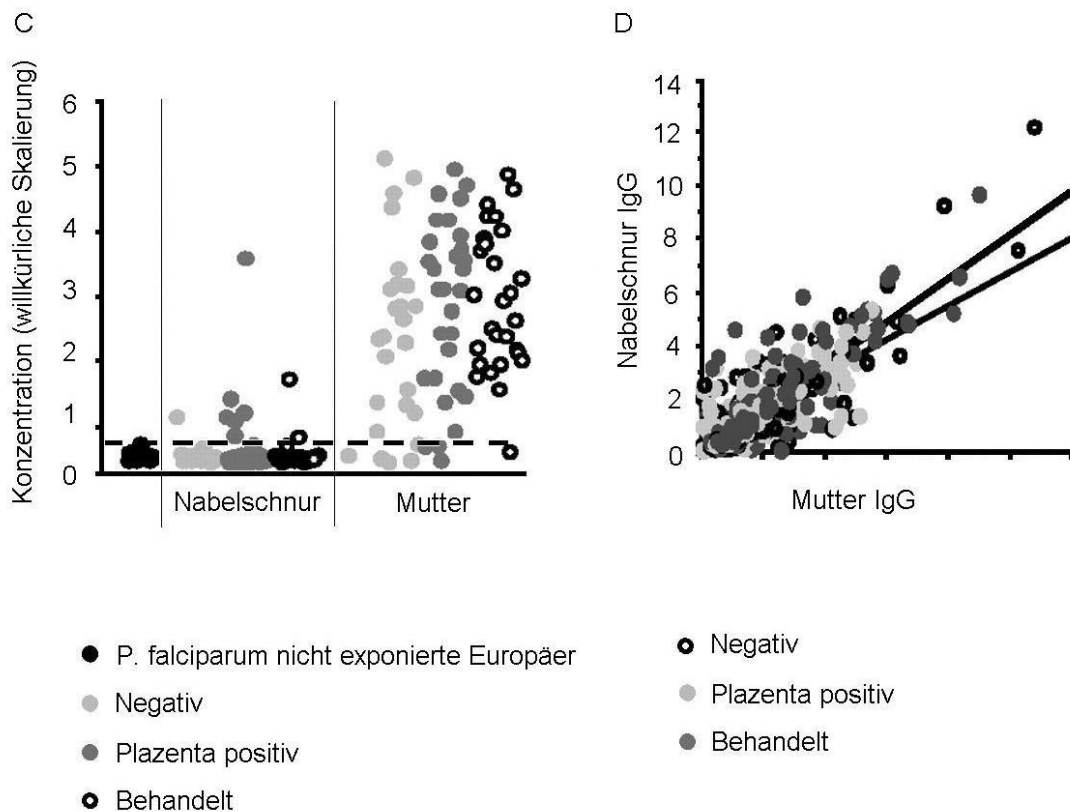
Abbildung 3

IgM und IgG Antikörper mit Spezifität für DBL- γ 3 Peptide im Nabelschnurblut



A Anteil der Nabelschnurblutproben mit IgM Antikörpern der Spezifität für DBL- γ 3 Peptide, GLURP (glutamate-rich protein), oder PPD (purified protein derivative), anhand der Malariaanamnese während der Schwangerschaft gruppiert.

B Anteil der Nabelschnurblutproben mit IgM Antikörpern der Spezifität für mindestens ein DBL- γ 3 Peptid.



C Punktdiagramm (Dot plot) der DBL120 IgM Antikörper-Konzentrationen im Plasma nicht exponierter Europäer (Positivitätsschwelle: Median + 3 Standardabweichungen, unterbrochene Linie), peripherenvenösem Blut gabunesischer Mütter und Nabelschnurblut, gruppiert nach mütterlicher Malariaanamnese während der Schwangerschaft.

D Korrelation der IgG Antikörper Spiegel für alle DBL- γ 3 Peptid in Nabelschnur- und mütterlichem Blut.

Probenumfang: 25 Negativ, 32 Plazenta positiv, 28 Behandelt, 12 Europäische Negativkontrollen. *, $p < 0.05$ nach Fisher-exact-Test mit der Kontrollgruppe verglichen.

Der Median plus 3 Standardabweichungen der nachgewiesenen IgM Antikörperspiegel im Plasma malarianegativer (nicht exponierter) Europäer wurde als Schwellenwert für den Nachweis einer positiven Immunreaktion definiert (illustriert für DBL120-spezifische IgM in Abbildung 3C).

Für alle Gruppen zusammengenommen konnte in 77 der 85 (90%) mütterlichen Plasmaisolate IgM mit Spezifität für mindestens eines der verwendeten DBL- γ 3 Peptide nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen Nabelschnurplasma und mütterlichem Blutplasma bezüglich der Antikörperspiegel gegen ein DBL- γ 3 Peptid, glutamatreiches Peptid oder gereinigtes Proteinderivat konnte hingegen nicht dargestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine starke positive Korrelation ($\rho = 0,72$, $p < 0,001$) zeigte sich zwischen den Spiegeln DBL- γ 3 Peptid spezifischer IgG in beiden Kompartimenten unabhängig vom Infektionsstatus zum Zeitpunkt der Geburt (Abbildung 3D).

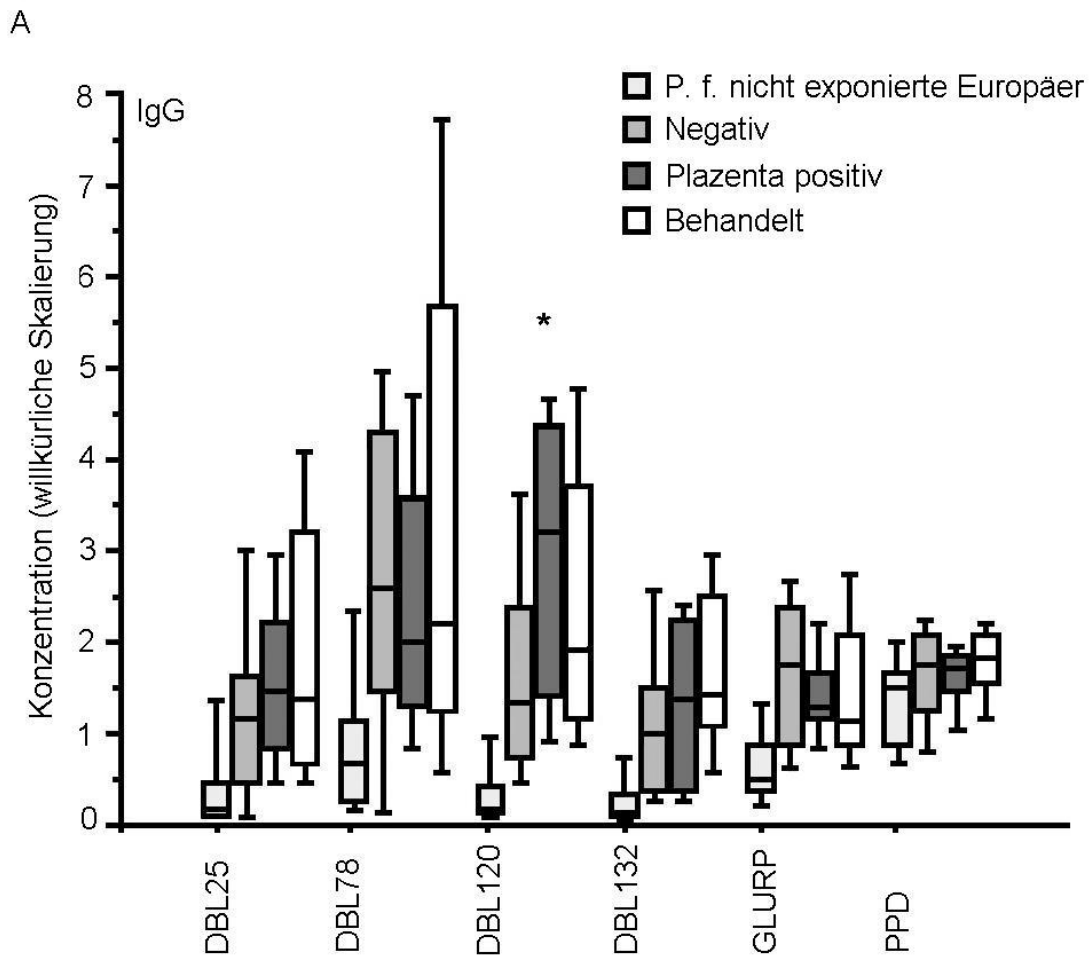
Verglichen mit mütterlichen Plasmaisolaten der Gruppe "Negativ" enthielt Plasma der Gruppe "Plazenta positiv" signifikant höhere Spiegel an IgG-Antikörpern mit Spezifität für DBL120 ($p = 0,009$) und an IgM-Antikörpern mit Spezifität für DBL25 DBL78 und glutamatreiches Protein ($p = 0,030$, $0,002$ bzw. $0,007$) (Abbildungen 4A und 4B).

Eine Behandlung der Malariaerkrankung während der Schwangerschaft zeigte keine Assoziation zu signifikanten Veränderungen der Antikörperspiegel (IgM und IgG) mit Spezifität für DBL- γ 3 Peptide verglichen mit den Spiegeln bei negativen Müttern (Abbildungen 4A und 4B).

Im Blutplasma von Müttern der Gruppe „Negativ“ fanden wir eine positive Assoziation zwischen der Parität und den Spiegeln an IgG- und IgM-Antikörpern mit Spezifität für DBL120 und an IgG mit Spezifität DBL78 ($\rho = 0,51$ und $p = 0,043$; $\rho = 0,47$ und $p = 0,038$ bzw. $\rho = 0,47$ und $p = 0,050$) (Abbildung 5A und 5B). Eine solche Beziehung konnte zwischen der Parität und den Spiegeln von IgG- oder IgM-Antikörpern mit Spezifität gegenüber glutamatreichem

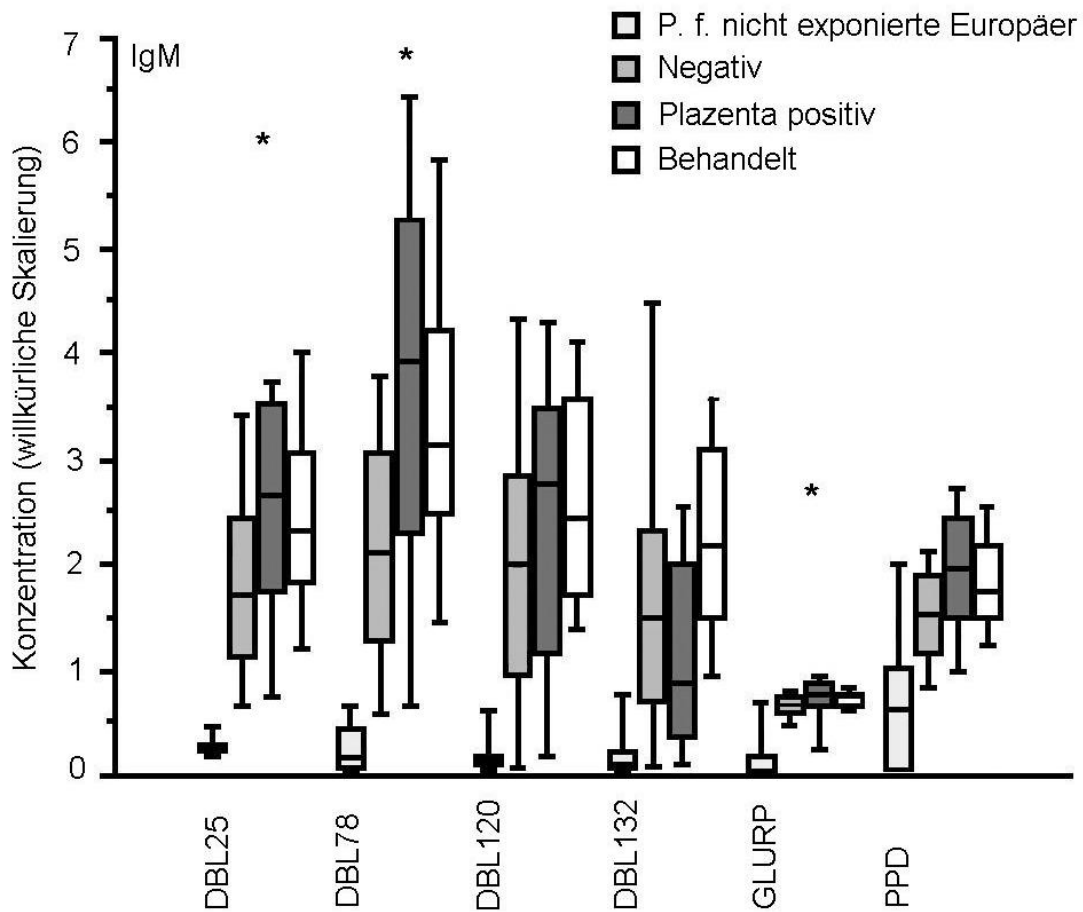
Protein oder gereinigtem Proteinderivat nicht nachgewiesen werden (Abbildung 5).

Abbildung 4



A IgG und

B

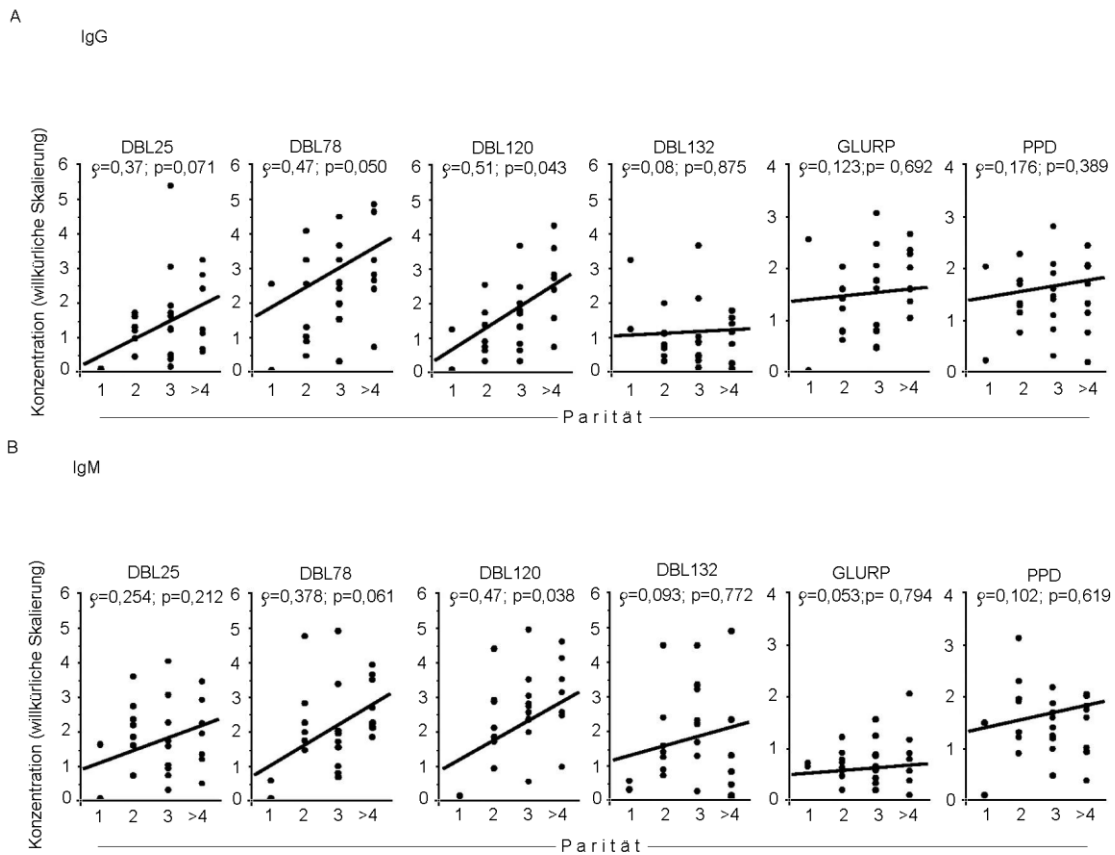


B IgM Antikörper mit Spezifität für DBL- γ 3 Peptide, GLURP (glutamate-rich protein), oder PPD (purified protein derivative) in peripheren mütterlichen Blutplasma zum Zeitpunkt der Geburt.

Die Gruppierung der Proben erfolgte anhand der *P. falciparum* Malariaanamnese während der Schwangerschaft.

Die Box-whisker Plots zeigen die Mediane mit 25. und 75. sowie whiskers für die 10. und 90. Perzentile. Probenumfang: 25 Negativ, 32 Plazenta positiv, 28 Behandelt, 12 Europäische Negativkontrollen. *, $p < 0.05$, nach Mann-Whitney-Test mit der Kontrollgruppe verglichen.

Abbildung 5



Beziehung zwischen Parität und mütterlichen Spiegeln von

A IgG und

B IgM Antikörpern mit Spezifität für DBL- γ 3 Peptide, GLURP (glutamate-rich protein), oder PPD (purified protein derivative). *, $p < 0,05$. Spearman rank correlation.

5. Diskussion

Hypothesen

Diese Studie fundiert auf der Evidenz-basierten Annahme, konserviert exprimierte und an der Persistenz der Parasiten während der Schwangerschaft beteiligte Regionen einer Antigen-Domäne von *P. falciparum* (DBL- γ 3) seien immunogen, und , weiterhin, die Anwesenheit dieses Antigens in der Plazenta könnte zu transplazentarem Transfer von Antigenbestandteilen und in utero-Sensibilisierung des fetalen Immunsystems führen.

Daher wählten wir vier Peptide aus, die durch den Genlokus der CSA bindenden Domäne „DBL- γ 3“ auf PfEMP1 kodiert werden.

DBL- γ 3 zeichnet sich innerhalb der zentralafrikanischen plazentaren *P. falciparum* -Isolate durch ein hohes Maß an geographischer und zeitlicher Konserviertheit aus (Khattab A et al. 2001; 2003).

Das Ausmaß der Konserviertheit lässt vermuten, dass diese Genloki wesentlich für das Überleben der Parasiten im intervillösen Raum der Plazenta sind, möglicherweise durch Beteiligung am CSA vermittelten Adhäsionsprozess.

Es sind B-Zell Epitope in anderen Varianten der DBL- γ 3 Domäne identifiziert worden, die ebenfalls an CSA binden. Außerdem wurde eine CSA bindende Variante des PfEMP1 beschrieben, die mit der schwangerschafts-assoziierten Malaria in Verbindung steht, aber keine DBL- γ 3 Domäne aufweist (Salanti A et al. 2003; 2004; Gamain B et al. 2004).

Die letzteren Erkenntnisse implizieren offensichtlich einen gewissen Grad an Diversität innerhalb derjenigen Interaktionen zwischen Rezeptor und Liganden, die wesentlich für das Zustandekommen und die Aufrechterhaltung der schwangerschafts-assoziierten Malaria verantwortlich gemacht werden.

Unter Verwendung des SYFPEITHI Algorithmus zur Identifizierung potentieller Agreptope (Rammensee H et al. 1999) und , in der Fortführung, T-Zell-Epitope

innerhalb der DBL- γ 3 Domäne erhielten wir Peptide, die sowohl durch B-Zellen als auch durch T-Zellen von Neugeborenen und deren Müttern erkannt werden.

Wir wiesen nach, dass Antikörperreaktionen mit Spezifität für mindestens eines der DBL- γ 3 Peptide (DBL120) im Blut von Müttern mit positiver Infektanamnese in der Schwangerschaft signifikant gesteigert waren.

Außerdem zeigten diese Reaktionen das gleiche Paritäts-abhängige Muster wie es für gewöhnlich mit der schwangerschafts-assoziierten Malaria in Verbindung gebracht wird (Ricke C et al. 2000; Staalsoe T et al. 2001).

In diesem Kontext ist es bemerkenswert, dass sich gleiche, wenn auch meist statistisch nicht signifikante Tendenzen bei den Antikörperreaktionen gegenüber dem DBL78 Peptid zeigten, von welchem die stärkste Bindung an HLA-DRB1*1501 zu erwarten ist, einem innerhalb der Gabunesischen Bevölkerung besonders häufig vorkommenden Allel.

Wir interpretieren das Vorkommen von IgM-Antikörpern mit Spezifität für die DBL- γ 3 Peptide oder Glutamatreiches Peptid im Nabelschnurblutplasma vorrangig derjenigen Neugeborener aus Schwangerschaften mit stattgehabter oder bestehender *P. falciparum* Infektion als Bestätigung unserer Annahme einer Sensibilisierung in utero.

Der Prozentsatz an Nabelschnurblutproben mit DBL- γ 3 Peptid spezifischen IgM (4% - 10%) ist vergleichbar mit dem Prozentsatz der in Kenia gewonnenen Proben mit IgM- Antikörpern gegen rekombinantes *P. falciparum* MSP-1₁₉ (6%) (King CL et al. 2002) und dem Anteil in Kamerun isolierter Proben mit IgM gegen einfaches Parasiten Lysat (14%) (Xi G et al. 2003).

Zusammengenommen mit unseren Beobachtungen einer DBL- γ 3 Peptid spezifischen Zytokinaktivität identifizieren diese Erkenntnisse PfEMP1 oder zumindest Anteile davon als transplazentar übertragbare Antigene, die zu einer Sensibilisierung fetaler T- und B-Lymphozyten führen.

Es werden in zunehmendem Maße Beweise dafür gefunden, dass eine persistierende plazentare *P. falciparum* Infektion, wie sie durch die hohen Titer von gegen die schwangerschafts-assoziierte Malaria gerichteten Antikörpern im Nabelschnurblut reflektiert wird, zu einer höheren Anfälligkeit gegenüber einer Malaria im Kindesalter führt (Fried M, Duffy PE 1996; Le Hesran JY et al, 1997; Cot M et al. 2003; Mutabingwa T et al. 2005).

Bleibt eine solche plazentare Infektion unbehandelt, scheint sie zu einer weiteren Reduktion der bereits geschwächten unspezifischen neonatalen T-Zell Aktivität zu führen (Ismaili JM et al. 2003).

So zeigten auch unsere in der Vergangenheit durchgeführten Studien, dass eine floride plazentare *P. falciparum* Infektion zum Zeitpunkt der Geburt zum einen mit einer reduzierten Expression von MHC I und II auf Monozyten und zum anderen mit einer durch IL-10 supprimierten und gegen *P. falciparum* Antigene gerichteten Immunantwort vom Th1- Typus einhergeht (Brustoski K et al. 2005; 2006); Ein wahrscheinlich über regulatorische T-Zellen vermittelter und zur Reduktion der pathologischen Auswirkungen einer prolongierten proinflammatorischen Th1-Aktivierung notwendiger Mechanismus.

Die Daten unterstützen darüber hinaus die These, dass eine erfolgreiche Therapie einer PAM die Th1 gebundene Immunoresponsivität von Neugeborenen auf *P. falciparum* Antigene erhöhen und damit einen protektiven Effekt einer frühkindlichen Malaria gegenüber haben könnte.

In der vorgelegten Arbeit hatten generell diejenigen Nabelschnurblutisolat die höchsten IgG- Antikörpertiter und IL-10 Antworten gegen DBL- γ 3, die aus Schwangerschaften mit an der Geburt bestehender Infektion stammten, eine mit den oben erwähnten Studien übereinstimmende Beobachtung.

Wenngleich bezüglich des mütterlichen Blutes kein statistischer Zusammenhang zwischen Zytokinaktivität und *P. falciparum* Infektion während der Schwangerschaft hergestellt werden konnte, enthielten PBMC negativer Mütter erhöhte Zahlen DBL- γ 3 spezifischer CD3⁺IL-13⁺ Zellen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass erhöhte Anzahlen von Zellen mit Aktivität sowohl vom Typus Th-2 (Winkler S et al. 1999) als auch vom Typus Th-1 (Luty AJ et al. 1999) gleichermaßen für den Schutz gegenüber *P. falciparum* und das Phänomen der Semi-Immunität Erwachsener entscheidend sind.

Wir fanden keine Vermehrung der DBL- γ 3 spezifischen IgG oder IgM im Plasma negativer Mütter, obwohl eine Tendenz zu erhöhten IgG gegen DBL78 zu beobachten war. Eine IgG Subtypisierung könnte ein unterschiedliches Profil aufzeigen, das auf protektive Antikörper in dieser Gruppe hinweisen könnte.

Da kurze Peptide nicht die Eigenschaften der nativen Oberflächenmoleküle auf infizierten Erythrozyten abbilden können, verwendeten wir in dieser Studie Kontroll-Stimulanzen, die die Sensitivität der Ergebnisse unterstützen und die unspezifische Aktivität abgrenzen helfen. So untermauert beispielsweise das Ausbleiben einer starken Antikörperreaktion auf DBL- γ 3 Peptide in nicht exponierten Individuen eine Beziehung dieser Antworten zu unserer Kohorte, während die Paritäts-Abhängigkeit mütterlicher Plasmaspiegel an Antikörpern gegen DBL78 und DBL120, nicht aber gegen glutamatreiches Protein, die Annahme einer Beziehung dieser beiden DBL- γ 3 Peptide zur schwangerschafts- assoziierten Malaria unterstützen.

Limitationen

Diese Arbeit kann nur als Pilotstudie angesehen werden. Zusätzliche Untersuchungen sind notwendig, um den Spezifitätsgrad dieser mit den DBL- γ 3 Peptiden interagierenden Antikörper zu bestimmen. Zum Beispiel bleibt zu untersuchen, ob diese Antikörper in Malariaexponierten nachzuweisen sind, die nicht schwanger sind, ob die Zuführung rekombinanter DBL- γ 3 Peptide zum Plasma in der nachfolgenden ELISA Analyse reduzierte peptidspezifische Reaktionen zeigt oder, ob dies zur Blockade der Antikörperbindung an infizierte Erythrozyten führt.

Hinsichtlich der Diagnose einer plazentaren *P. falciparum* Infektion ist die Sensitivität der verwendeten lichtmikroskopischen Untersuchung eines Plazentablutausstriches im Vergleich zu einer histopathologischen Aufarbeitung einer Plazentabiopsie niedrig, und die Implementierung letzterer Methode hätte gegebenenfalls zu einer anderen Zuordnung verschiedener Proben zu den Studiengruppen geführt.

Fazit

Zusammenfassend, ist diese Arbeit die Erste, die bei Müttern und ihren Neugeborenen die Immunantwort auf Peptide untersucht, die aus der konservierten Region der DBL- γ 3 Domäne auf PfEMP1 stammen.

Zwei der vier verwendeten Peptide waren besonders immunogen, was sich bei Schwangeren und ihren Nachkommen sowohl in B- als auch T-Zell-Antworten widerspiegelte.

Auf der mütterlichen Seite waren höhere Spiegel an gegen diese Peptide aktiven Antikörpern mit einer schwangerschafts-assoziierten Malaria und der Parität assoziiert.

Auf der fetalen Seite demonstriert der Nachweis sowohl Zytokin- als auch IgM-vermittelter Immunantwort gegen diese Peptide, dass Komponenten der DBL- γ 3 Domäne auf PfEMP1 die Plazentaschranke überwinden und das fetale Immunsystem sensibilisieren können.

6. Zusammenfassung

Malaria wird durch protozoische Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht und besonders *P. falciparum* bleibt trotz erheblicher Anstrengungen zur Eindämmung der Erkrankung ein Hauptfaktor weltweiter Mortalität und Morbidität. Diese Parasiten haben einen komplexen Lebenszyklus innerhalb der als Vektor fungierenden Moskitos und dem Menschen als Wirt.

Hauptursachen, die zum Wiederaufleben der Malaria beitragen, sind die Ausbreitung Medikamenten-resistenter Plasmodien, Insektizid-resistenter Moskitos und das Fehlen eines wirksamen Impfstoffes.

Erwachsene in Gebieten mit hoher Transmission erwerben üblicherweise eine Teilimmunität gegen eine *P. falciparum* Infektion. Während einer Schwangerschaft ist diese Immunität erheblich eingeschränkt.

Anteile des *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) (hier vor allem das VAR2CSA Protein) vermittelt die Adhärenz infizierter Erythrozyten an Chondroitinsulphat A (CSA) des plazentaren Synzytiotrophoblasten (Fried M. et al. 1996; Beeson JG et al. 2000). Die Sequestration der Erythrozyten im intervillösen Raum ist ein Charakteristikum der Pregnancy-associated malaria (PAM).

Letztere geht mit einer erhöhten Anfälligkeit des Neugeborenen für diese Krankheit einher und vermutlich induziert eine transplazentare Passage von Parasitenantigenen bzw. kompletten Parasiten immunregulatorische Vorgänge innerhalb des Säuglings.

Die für die Bindung von CSA verantwortliche Region auf dem PfEMP 1 wurde als Duffy Binding-Like (DBL) γ 3 Domäne identifiziert.

Ziel der Studie war es, die Aktivierbarkeit immunkompetenter T-Zellen in Nabelschnur- und peripherenvenösem Blut von Müttern mit unterschiedlicher Schwangerschaftsanamnese bezüglich einer *P. falciparum* Infektion durch Bestandteile dieser Domäne zu untersuchen.

Hierfür bestimmten wir die Plasmaspiegel der T-Zell Zytokine Interferon Gamma (IFN- γ), Interleukin 10 (IL10) und 13 (IL 13) sowie der Immunglobuline G (IgG)

und M (IgM) nach in vitro Stimulation durch vier Peptidisolat aus hochgradig konserviert exprimierten Arealen der DBL γ 3 Domäne in Zentralafrika häufig vorkommender Parasitenpopulationen.

Eine plazentare *P. falciparum* Infektion zum Zeitpunkt der Geburt ließ sich mit einer erhöhten Anzahl DBL γ 3 Domäne spezifischer CD3⁺Interleukin 10 positiver T-Zellen (CD3⁺IL-10⁺ThZ) im Nabelschnurblut assoziieren, während eine vor Geburt erfolgreich durchgeführte Eradikation mit einer erhöhten Aktivität CD3⁺ Interferon Gamma positiver T-Zellen (CD3⁺IFN- γ ⁺ThZ) einherging.

DBL γ 3 spezifische IgM konnten in 12 der 60 (20%) Nabelschnurblutproben aus Schwangerschaften mit positiver Malariaanamnese nachgewiesen werden. Das Vorkommen mütterlicher IgG Ak mit Spezifität gegenüber einer der Peptide zeigte ein von der Parität abhängiges Profil.

Dies unterstützt die These einer gegen Schwangerschafts-assoziierte Malaria protektiven Immunreaktion polyklonaler anti-PfEMP 1 Antikörper.

Die erhobenen Daten demonstrieren, dass Peptide, die dem Exprimat der konservativen Regionen der DBL γ 3 Domäne auf PfEMP 1 entsprechen, sowohl in *P. falciparum* infizierten Müttern als auch in deren Nachkommen eine immunogene Wirkung induzieren.

7. Literaturverzeichnis

- Agbor-Enoh ST, Achur RN, Valiyaveettil M, Leke R, Taylor DW, Gowda DC.** 2003. Chondroitin sulfate proteoglycan expression and binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the human placenta during pregnancy. *Infection and Immunity* **71**:2455–61.
- Agbor-Enoh ST, Archur RN, Valiyareettil M, Leke R, Taylor DW, Allsopp CE, Sanni LA, L. Reubsaet F, Ndungu C, Newbold T, Mwangi, Marsh K, Langhorne J.** 2002. CD4 T-cell responses to a variant antigen of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, erythrocyte membrane protein-1, in individuals living in malaria-endemic areas. *J. Infect. Dis.* **185**:812-819.
- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Aide P, Sigauque B, Milman J, Mandomando I, Bassat Q, Guinovart C, Espasa M, Corachan S, Lievens M, Navia MM, Dubois MC, Menendez C, Dubovsky F, Cohen J, Thompson R, Ballou WR.** 2005. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomized control trial. *Lancet* **366**:2012–2018.
- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, Mandomando I, Spiessens B, Guinovart C, Espasa M, Bassat Q, Aide P, Ofori-Anyinam O, Navia MM, Corachan S, Ceuppens M, Dubois MC, Demoitié MA, Dubovsky F, Menéndez C, Tornieporth N, Ballou WR, Thompson R, Cohen J.** 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomized controlled trial. *Lancet* **364**:1411–1420.
- Baird JK.** 1998. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol.* **92**(4):367-90.
- Ballou WR, Arevalo-Herrera M, Carucci D, Richie TL, Corradin G, Diggs C, Druilhe P, Giersing BK, Saul A, Heppner DG, Kester KE, Lanar DE, Lyon J, Hill AV, Pan W, Cohen JD.** 2004. Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg* **71**(Suppl. 2), 239–247.
- Barnes KI, Durrheim DN, Little F, Jackson A, Mehta U, Allen E, Dlamini SS, Tsoka J, Bredenkamp B, Mthembu DJ, White NJ, Sharp BL.** 2005. Effect of artemether-lumefantrine policy and improved vector control on malaria burden in KwaZulu-Natal, South Africa. *PLoS Med.* doi: 10.1371/journal.pmed.0020330.
- Beeson JG, Brown GV, Molyneux ME, Mhango C, Dzinjalama F, Rogerson SJ.** 1999. *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *J Infect Dis.* **180**(2):464-72.
- Beeson JG, Duffy PE.** 2005. The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. *Curr Top Microbiol Immunol.* **297**:187-227.
- Bejon P, Mwacharo J, Kai O, Todryk S, Keating S, Lowe B, Lang T, Mwangi TW, Gilbert SC, Peshu N, Marsh K, Hill AV.** 2007. The induction and persistence of T cell IFN-gamma responses after vaccination or natural exposure is suppressed by *Plasmodium falciparum*. *J Immunol.* **179**(6):4193-201.

- Black RE, Morris SS, Bryce J.** 2003. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*. **361**:2226-2234.
- Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, Ballou WR, Conway DJ, Reece WH, Gothard P, Yamuah L, Delchambre M, Voss G, Greenwood BM, Hill A, McAdam KP, Tornieporth N, Cohen JD, Doherty T.** RTS, S Malaria Vaccine Trial Team. 2001. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in the Gambia: a randomized trial. *Lancet* **358**:1927–1934.
- Bojang KA.** 2006. RTS,S/AS02A for malaria. *Expert Rev Vaccines* **5**:611–615.
- Brabin B.** 1991. An assessment of low birthweight risk in primiparae as an indicator of malaria control in pregnancy. *Int J Epidemiol*. **20**(1):276-83.
- Brabin BJ, Hakimi M, Pelletier D.** 2001. An analysis of anemia and pregnancy-related maternal mortality. *J Nutr*. **131**(2S-2):604-615.
- Brabin BJ, Rogerson SJ.** 2001. The epidemiology and outcomes of maternal malaria. In *Malaria in Pregnancy: Deadly Parasite, Susceptible Host* (Duffy, P.E. and Fried, M. eds), pp. 27–52.
- Breman JG, Egan A, Keusch GT.** 2001. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. *Am J Trop Med Hyg* **64**(Suppl. 1–2): 4-5.
- Bruce-Chwatt L.J.** 1963. A longitudinal survey of natural malaria infection in a group of West African adults. *West Afr. Med. J.* **12**:199-217.
- Brustoski K, Moller U, Kramer M, Hartgers F, Kremsner PG, Krzych U, Luty AJF.** 2006. Reduced cord blood immune effector cell responsiveness mediated by CD4+ T cells induced in utero as a consequence of placental *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis*. **193**(1):146-54.
- Brustoski K, Moller U, Kramer M, Petelski A, Brenner S, Palmer DR, Bongartz M, Kremsner PG, Luty AJF, Krzych U.** 2005. IFN-gamma and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Immunol.* **174**:1738-1745.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE.** 2005. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. **365**:1147-1152.
- 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.** 1999. *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12743-12748.
- Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Marsh K.** 1999. Antibody recognition of *Plasmodium falciparum* erythrocyte surface antigens in Kenya: evidence for rare and prevalent variants, *Infect. Immun.* **67**:733-739.
- Calvo-Calle JM, Oliveira GA, Watta CO, Soverow J, Parra-Lopez C, Nardin EH.** 2006. A linear peptide containing minimal T- and B-cell epitopes of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein elicits protection against transgenic sporozoite challenge. *Infect Immun* **74**:6929–6939.
- Carter R, Graves PM, Quakyi IA, Good MF.** 1989. Restricted or absent immune responses in human populations to *Plasmodium falciparum* gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies. *J Exp Med* **169**:135–147.

Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S. 2007. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**(1-2):195-207.

Cohen S, Mc Gregor GI, Carrington S. 1961. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* **192**:733–737.

Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, Bojang KA, Oduola AM, Kremsner PG, Arnot DE, Greenwood BM, McBride JS. 2000. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med* **6**:689–692.

Costa FT, Fusai T, Parzy D, Sterkers Y, Torrentino M, Douki JB, Traore B, Petres S, Scherf A, Gysin J. 2003. Immunization with recombinant duffy binding-like-gamma3 induces pan-reactive and adhesion-blocking antibodies against placental chondroitin sulfate A-binding *Plasmodium falciparum* parasites. *J. Infect. Dis.* **188**:153-164.

Cot M, Le Hesran JY, Staalsoe T, Fievet N, Hviid L, Deloron P. 2003. 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.* **157**:203-209.

D'Alessandro U, Olaleye BO, McGuire W, Langerock P, Bennett S, Aikins MK, Thomson MC, Cham MK, Cham BA, Greenwood BM. 1995. Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme. *Lancet.* **345**(8948):479-83.

Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N. 2000. The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol.* **123**(2):107-19.

Doetze A, Satoguina J, Burchard G, Rau T, Löliger C, Fleischer B, Hoerauf A. 2000. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by Th3/Tr1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor- β but not by a T (h)1 to T (h)2 shift, *Int Immunol* **12**:623–630.

Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, Audran R, Bouzidi A, Oeuvray C, Roussilhon C. 2005. A malaria vaccine that elicits in human antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Medicine* **2**, e344.

Falade C, Mokuolu O, Okafor H, Orogade A, Falade A, Adedoyin O, Ogunu T, Aisha M, Hamer DH, Callahan MV. 2007. Epidemiology of congenital malaria in Nigeria: a multi-centre study. *Trop Med Int Health.* **12**(11):1279-87.

Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F, Nehrbass U, Wellems TE, Scherf A. 2000. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature.* **407**(6807):1018-22.

Fried M, Duffy PE. 1996. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* **272**:1502-1504.

Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. 1998. Maternal antibodies block malaria. *Nature* **395**:851-852.

Gamain B, Smith JD, Avril M, Baruch DI, Scherf A, Gysin J, Miller LH. 2004. Identification of a 67-amino-acid region of the *Plasmodium falciparum* variant surface antigen that binds chondroitin sulphate A and elicits antibodies reactive with the surface of placental isolates. *Mol. Microbiol.* **53**:445-455.

- Garner P, Gülmezoglu AM.** 2003. Drugs for preventing malaria-related illness in pregnant women and death in the newborn. *Cochrane Database Syst Rev.*(1):CD000169.
- Gauduin MC, Kaur A, Ahmad S, Yilma T, Lifson JD, Johnson RP.** 2004. Optimization of intracellular cytokine staining for the quantitation of antigen-specific CD4+ T-cell responses in rhesus macaques. *J. Immunol. Methods* **288**:61-79.
- Good MF, Kumar S, Miller LH.** 1988. The real difficulties for malaria sporozoite vaccine development: nonresponsiveness and antigenic variation. *Immunol. Today* **9**:351–355.
- Graves P, Gelband H.** 2006. Vaccines for preventing malaria (SPf66). *Cochrane Database System Rev* CD005966.
- Heppner DG Jr, Kester KE, Ockenhouse CF, Tornieporth N, Ofori O, Lyon JA, Stewart VA, Dubois P, Lanar DE, Krzych U, Moris P, Angov E, Cummings JF, Leach A, Hall BT, Dutta S, Schwenk R, Hillier C, Barbosa A, Ware LA, Nair L, Darko CA, Withers MR, Ogutu B, Polhemus ME, Fukuda M, Pichyangkul S, Gettyacamin M, Diggs C, Soisson L, Milman J, Dubois MC, Garçon N, Tucker K, Wittes J, Plowe CV, Thera MA, Duombo OK, Pau MG, Goudsmit J, Ballou WR, Cohen J.** 2005. Towards an RTS,S-based multi-stage, multi-antigen vaccine against *falciparum* malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* **23**:2243–2250.
- Hisaeda H, Saul A, Reece JJ, Kennedy MC, Long CA, Miller LH, Stowers AW.** 2002. Merozoite surface protein 3 and protection against malaria in *Aotus nancymai* monkeys. *J Infect Dis* **185**:657–664.
- Hviid L.** 2004. The immuno-epidemiology of pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria: a variant surface antigen-specific perspective. *Parasite Immunol.* **26**:477-486.
- Ismaili J, van der Sande M, Holland MJ, Sambou I, Keita S, Allsopp C, Ota MO, McAdam KP, Pinder M.** 2003. *Plasmodium falciparum* infection of the placenta affects newborn immune responses. *Clin. Exp. Immunol.* **133**:414-421.
- Jakobsen PH, Rasheed FN, Bulmer JN, Theisen M, Ridley RG, Greenwood BM.** 1998. Inflammatory reactions in placental blood of *Plasmodium falciparum*-infected women and high concentrations of soluble E-selectin and a circulating *P. falciparum* protein in the cord sera. *Immunology* **93**:264-269.
- Kabanywanyi AM, Mwita A, Sumari D, Mandike R, Mugittu K, Abdulla S.** 2007. Efficacy and safety of artemisinin-based antimalarial in the treatment of uncomplicated malaria in children in southern Tanzania. *Malar J.* **6**:146.
- Kelso A.** 1995. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?, *Immunol Today* **16**:(8) 374–379.
- Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, Ockenhouse CF, Heppner DG Jr, Hall T, Wellde BT, White K, Sun P, Schwenk R, Krzych U, Delchambre M, Voss G, Dubois MC, Gasser RA Jr, Dowler MG, O'Brien M, Wittes J, Wirtz R, Cohen J, Ballou WR; RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group.** 2007. A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of a two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults. *Vaccine* **25**:5359–5366.
- Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, Ockenhouse CF, Heppner DG, Hall T, Krzych U, Delchambre M, Voss G, Dowler MG, Palensky J, Wittes J,**

- Cohen J, Ballou WR; RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group.** 2001. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* **183**:640–647.
- Khattab A, Kremsner PG, Klinkert MQ.** 2003. Common surface-antigen var genes of limited diversity expressed by *Plasmodium falciparum* placental isolates separated by time and space. *J. Infect. Dis.* **187**:477-483.
- Khattab A, Kun J, Deloron P, Kremsner PG, Klinkert MQ.** 2001. Variants of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 expressed by different placental parasites are closely related and adhere to chondroitin sulfate A. *J. Infect. Dis.* **183**:1165-1169.
- King CL, Malhotra I, Wamachi A, Kioko J, Mungai P, Wahab SA, Koech D, Zimmerman P, Ouma J, Kazura JW.** 2002. Acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in the human fetus. *J. Immunol.* **168**:356-364.
- Koch CA, Platt JL.** 2007. T cell recognition and immunity in the fetus and mother. *Cell Immunol.* **248**(1):12-7.
- Kochar DK, Thanvi I, Joshi A, Subhakaran, Aseri S, Kumawat BL.** 1998. *Falciparum* malaria and pregnancy. *Indian J Malariol.* **35**(3):123-30.
- Kubler-Kielb J, Majadly F, Wu Y, Narum DL, Guo C, Miller LH, Shiloach J, Robbins JB, Schneerson R.** 2007. Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* elicited in mice by protein conjugates of Pfs25. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:293–298.
- Kyes S, Horrocks P, Newbold C.** 2001. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol* **55**:673–707.
- Lavstsen T, Magistrado P, Hermsen CC, Salanti A, Jensen ATR, Sauerwein R, Hviid L, Theander TG, Staalsoe T.** 2005. Expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 in experimentally infected humans, *Malar. J.* **4**:21.
- Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyemé M, Boudin C, Deloron P.** 1997. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am. J. Epidemiol.* **146**:826-831.
- Lekana Douki JB, Traore B, Costa FT, Fusaï T, Pouvelle B, Sterkers Y, Scherf A, Gysin J.** 2002. Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. *Blood* **100**:1478-1483.
- Leke RF, Djokam RR, Mbu R, Leke RJ, Fogako J, Megnekou R, Metenou S, Sama G, Zhou Y, Cadigan T, Parra M, Taylor DW.** 1999. Detection of the *Plasmodium falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women: implications for diagnosing placental malaria. *J Clin Microbiol.* **37** (9):2992-2996.
- Lengeler C, Sharpe B.** 2003. Indoor residual spraying and insecticide-treated nets. Washington (D. C.): Global Health Council: 17–24.
- Lengeler C.** 2004. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev.*

- Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG.** 2001. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells, *J Immunol* **166**:5530–5539.
- Levy O.** 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* **7**(5):379-90.
- Looareesuwan S, Phillips RE, White NJ, Kietinun S, Karbwang J, Rackow C, Turner RC, Warrell DA.** 1985. Quinine and severe *falciparum* malaria in late pregnancy. *Lancet.* **6**;2(8445):4-8.
- Luty AJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Migot-Nabias F, Deloron P, Nussenzweig RS, Kremsner PG.** 1999. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J. Infect. Dis.* **179**:980-988.
- Luxemburger C, McGready R, Kham A, Morison L, Cho T, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ, Nosten F.** 2001. Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in an area of low malaria transmission. *Am.J. Epidemiol.* **154**:459–465.
- Majori G.** 2004. Combined antimalarial therapy using artemisinin. *Parassitologia.***46**(1-2):85-7.
- Mårtensson A, Strömberg J, Sisowath C, Msellem MI, Gil JP, Montgomery SM, Olliaro P, Ali AS, Björkman A.** 2005. Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clin Infect Dis.* **41**:1079–1086.
- Matuschewski K.** 2006. Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector. *Cell Microbiol* **8**:1547–1556.
- Mc Gready R, Cho T, Keo NK, Thwai KL, Villegas L, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F.** 2001. Artemisinin antimalarials in pregnancy: a prospective treatment study of 539 episodes of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Clin Infect Dis.* **33**(12):2009-16.
- Mc Gregor IA.** 1984. Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* **33**(4):517-25.
- Mc Guirk P, McCann C, Mills KH.** 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*, *J Exp Med* **195**: 221–231.
- Mc Guirk P, Mills KH.** 2002. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases, *Trends Immunol* **23**(9):450–455.
- Menendez C, Mayor A.** 2007. Congenital malaria: the least known consequence of malaria in pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med.* **12**(3):207-13.
- Migot-Nabias F, Fajardy I, Danze PM, Everaere S, Mayombo J, Minh TN, Renaut A, Georges AJ.** 1999. HLA class II polymorphism in a Gabonese Banzabi population. *Tissue Antigens* **53**:580-585.
- Miller LH, Good MF, Milon G.** 1994. Malaria pathogenesis. *Science* **26**:1878–1883.

- Mueller A-K, Labaied M, Kappe SHI, Matuschewski K.** 2005. Genetically modified *Plasmodium parasites* as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* **433**:164–167.
- Newbold CI, Pinches R, Roberts DJ, Marsh K.** 1992. *Plasmodium falciparum*: the human agglutinating antibody response to the infected red cell surface is predominantly variant specific, *Exp. Parasitol.* **75**:281-292.
- Nielsen MA, Staalsoe T, Kurtzhals JAL, Goka BQ, Dodoo D, Alifrangis M, Theander TG, Akanmori BD, Hviid L.** 2002. *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression varies between isolates causing severe and non-severe malaria and is modified by acquired immunity, *J. Immunol.* **168**:3444-3450.
- Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H & Orton C.** 1967. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* **216**:160–162.
- Ofori MF, Dodoo D, Staalsoe T, Kurtzhals JA, Koram K, Theander TG, Akanmori BD, Hviid L.** 2002. Malaria-induced acquisition of antibodies to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens, *Infect. Immun.* **70**:2982-2988.
- Pan W, Ravot E, Tolle R, Frank R, Mosbach R, Turbachova I, Bujard H.** 1999. Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum*: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **27**:1094–1103.
- Polley SD, Tetteh KKA, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojang KA, Conway DJ.** 2007. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. *J Infect Dis* **195**:279–287.
- Price RN, Dorsey G, Ashley EA, Barnes KI, Baird JK, d'Alessandro U, Guerin PJ, Laufer MK, Naidoo I, Nosten F, Olliaro P, Plowe CV, Ringwald P, Sibley CH, Stepniewska K, White NJ.** 2007. World Antimalarial Resistance Network I: clinical efficacy of antimalarial drugs. *Malar J.* **6**:119.
- Rakotonirina H, Barnadas C, Raheerijafy R, Andrianantenaina H, Ratsimbasoa A, Randrianasolo L, Jahevitra M, Andriantsoanirina V, Ménard D.** 2008. Accuracy and reliability of malaria diagnostic techniques for guiding febrile outpatient treatment in malaria-endemic countries. *Am J Trop Med Hyg.* **78**(2):217-21.
- Ramharter M, Wernsdorfer WH, Kremsner PG.** 2004. In vitro activity of quinolines against *Plasmodium falciparum* in Gabon. *Acta Trop.* **90**:55-60.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S.** 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**:213-219.
- Reeder JC, Cowman AF, Davern KM, Beeson JG, Thompson JK, Rogerson SJ, Brown GV.** 1999. The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:5198-5202.
- Reeder JC, Hodder AN, Beeson JG, Brown GV.** 2000. Identification of glycosaminoglycan binding domains in *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 of a chondroitin sulfate A-adherent parasite. *Infect Immun.* **68**(7):3923-6.

- Ricke CH, Staalsoe T, Koram K, Akanmori BD, Riley EM, Theander TG, Hviid L.** 2000. Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A. *J. Immunol.* **165**:3309-3316.
- Rieckmann KH.** 2006. The chequered history of malaria control: are new and better tools the ultimate answer? *Ann Trop Med Parasitol* **100**:647–662.
- Riehle MA, Srinivasan P, Moreira CK, Jacobs-Lorena M.** 2003. Towards genetic manipulation of wild mosquito populations to combat malaria: advances and challenges. *J Exp Biol.* **206**(Pt 21):3809-16.
- Rogerson SJ, Chaiyaroj SC, Ng K, Reeder JC, Brown GV.** 1995. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Exp. Med.* **182**:15-20.
- Rogerson SJ, van den Broek NR, Chaluluka E, Qongwane C, Mhango CG, Molyneux ME.** 2000. Malaria and anemia in antenatal women in Blantyre, Malawi: a twelve-month survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**:335–340.
- Sadasivaiah S, Tozan Y, Breman JG.** 2007. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) for indoor residual spraying in Africa: how can it be used for malaria control? *Am J Trop Med Hyg.* **77**(6 Suppl):249-63.
- Salanti A, Dahlbäck M, Turner L, Nielsen MA, Barfod L, Magistrado P, Jensen AT, Lavstsen T, Ofori MF, Marsh K, Hviid L, Theander TG.** 2004. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med* **200**:1197–1203.
- Salanti A, Staalsoe T, Lavstsen T, Jensen AT, Sowa MP, Arnot DE, Hviid L, Theander TG.** 2003. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol. Microbiol.* **49**:179-191.
- Sharma YD.** 1991. Knobs, knob proteins and cytoadherence in *falciparum* malaria. *Int J Biochem.* **23**(9):775-89.
- Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, Rubinstein E, Hannoun L, Charoenvit Y, Kocken CH, Thomas AW, Van Gemert GJ, Sauerwein RW, Blackman MJ, Anders RF, Pluschke G, Mazier D.** 2004. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem* **279**:9490–9496.
- Smith JD, Subramanian G, Gamain B, Baruch DI, Miller LH.** 2000. Classification of adhesive domains in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**:293-310.
- Snow RW, Craig M, Deichmann U, Marsh K.** 1999. Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull WHO* **77**:624–640.
- Snow RW, Korenkromp EL, Gouws E.** 2004. Pediatric mortality in Africa: *Plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk. *Am J Trop Med Hyg* **71** (Suppl. 2):16–24.
- Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio MF, Appella E, Hoffman S, Kubo RT, Chesnut RW, Grey HM, Sette A.** 1998. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J. Immunol.* **160**:3363-3373.

- Staalsoe T, Megnekou R, Fievét N, Ricke CH, Zornig HD, Leke R, Taylor DW, Deloron P, Hviid L.** 2001. Acquisition and decay of antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes that protect against placental parasitemia. *J. Infect. Dis.* **184**:618-626.
- Staalsoe T, Shulman CE, Bulmer JN, Kawuondo K, Marsh K, Hviid L.** 2004. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet.* **363**(9405):283-9.
- Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C.** 2001. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64** (Suppl 1): 28–35.
- Steketee RW, Wirima JJ, Slutsker L, Breman JG, Heymann DL.** 1996. Comparability of treatment groups and risk factors for parasitemia at the first antenatal clinic visit in a study of malaria treatment and prevention in pregnancy in rural Malawi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**:17–23.
- Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P, Wellde BT, Garçon N, Krzych U, Marchand M.** 1997. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* **336**:86–91.
- Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TE.** 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* **82**:89-100.
- Sylla EH, Kun JF, Kremsner PG.** 2000. Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.* **94**:652-656.
- Theisen M, Vuust J, Gottschau A, Jepsen S, Hogh B.** 1995. Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**:30-34.
- Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Sagara I, Dicko A, Diemert DJ, Heppner DG Jr, Stewart VA, Angov E, Soisson L, Leach A, Tucker K, Lyke KE, Plowe CV; Mali FMP1 Working Group.** 2006. Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in mammalian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS Clinical Trials* **1**, e34.
- Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, van Lin LH, de Koning-Ward TF, Sinha R, Lupetti P, Beetsma AL, Rodriguez MC, Karras M, Hager A, Mendoza J, Butcher GA, Kafatos F, Janse CJ, Waters AP, Sinden RE.** 2001. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J* **20**:3975–3983.
- Uneke CJ.** 2007. Congenital *Plasmodium falciparum* malaria in sub-Saharan Africa: a rarity or frequent occurrence? *Parasitol Res.* **101**(4):835-42.
- Wan YY, Flavell RA.** 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells, *Immunol Rev* **212**:114–130.
- WHO (World Health Organization).** 2005. World Malaria Report 2005. WHO, Geneva.
- WHO / UNICEF.** 2003. Africa Malaria report. Geneva , MAL/2003 1093:120.

- WHO.** 2004. A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African Region. Brazzaville. Regional Office for Africa (AFR/MAL/04/01).
- WHO/CDS/RBM.** 2001. Antimalarial Drug Combination Therapy: Report of a WHO Technical Consultation. Geneva, 4-5 April 2001.
- Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A, Graninger W, Kremsner PG.** 1999. Frequency of cytokine-producing T cells in patients of different age groups with *Plasmodium falciparum* malaria. J. Infect. Dis. **179**:209-216.
- Withers MR, McKinney D, Ogutu BR, Waitumbi JN, Milman JB, Apollo OJ, Allen OG, Tucker K, Soisson LA, Diggs C, Leach A, Wittes J, Dubovsky F, Stewart VA, Remich SA, Cohen J, Ballou WR, Holland CA, Lyon JA, Angov E, Stoute JA, Martin SK, Heppner DG Jr; MSP-1 Malaria Vaccine Working Group.** 2006. Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. PLoS Clinical Trials 1-32.
- Xi G, Leke RG, Thuita LW, Zhou A, Leke RJ, Mbu R, Taylor DW.** 2003. Congenital exposure to *Plasmodium falciparum* antigens: prevalence and antigenic specificity of in utero-produced antimalarial immunoglobulin M antibodies. Infect. Immun. **71**:1242-1246.

8. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

ACTs	artemisinin-based combination therapies
CBMC	cord blood mononuclear cells
CD	cluster of differentiation
CSP	circumsporozoite protein
DBL	duffy – binding – like
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorter (Durchflusszytometer)
FcR	Rezeptoren, die den konstanten Anteil des Antikörpermoleküls erkennen
FMP1	falciparum malaria protein-1
GAPs	genetically attenuated parasites
GLURP	glutamate-rich protein
GPI	glycosyl-phosphatidyl-inositol
HBS-Ag	Hepatitis B Surface-Antigen
HLA	human lymphocyte antigen
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN- γ	Interferon- γ
Ig(G/M)	Immunglobulin (Klasse G/M)
IL-10/13	Interleukin-10/13
IMCI	integrated management of childhood illness
IPT	intermittent preventive treatment
iRBC	infected red blood cell
IRS	indoor residual spraying
LLINs	long-lasting insecticidal nets
MHC	major histocompatibility complex (syn. HLA)
MOPC	mouse plasmacytoma
MSP 1	merozoite surface protein 1
PAM	pregnancy associated malaria
PBS	phosphate buffered saline

PBS-T	PBS + Tween [®]
PBS-TB	PBS + Tween [®] + bovines Serumalbumin
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
Pfs25/28	<i>Plasmodium falciparum</i> surface protein 25/28
PPD	purified protein derivative
RDTs	rapid diagnostic tests
RTS/S	rekombinante P. falciparum CSP Vakzine, gekoppelt mit der zentralen repeat Sequenz 'R' und Haupt T-Zell Epitopen 'T', in Verbund mit dem kompletten Hepatitis B surface Antigen 'S' und ko-exprimiert in Hefe mit dem Antigen 'S'
SP	Sulfadoxin + Pyrimethamin
Th(1/2) Zelle	T-Helfer Zelle vom Typ 1/2
TMB	tetramethylbenzidine buffer
TRAP	thrombospondin-related anonymous protein
TSP	Thrombospondin
Tween [®]	Polysorbate 20
var2CSA	variant surface antigen 2, chondroitin sulphate A-binding.
VSA	variable surface antigen
WHO	World Health Organisation

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt den gabunesischen Müttern für ihre Teilnahme an dieser Studie und den Hebammen der Geburtshilfe im Albert Schweitzer Hospital in Lambaréné für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

Ich danke auch besonders den weiteren Architekten dieser Studie, allen voran Kim Brustoski und Adrian J. F. Luty.

Sehr dankbar bin ich Saadou Issifou für seine wertvolle Hilfe, Michael Theisen und Francine Ntoui für die Überlassung der rekombinanten GLURP – Präparationen und Ayman Khattab für die technische Expertise bei der Arbeit mit den DBL- γ 3 Aminosäure - Sequenzen.

Nicht zuletzt möchte ich Peter Kreamsner für die gute Betreuung und die kritische Durchsicht dieser Arbeit danken.

Finanzielle Unterstützung erhielten wir von der Bundesregierung (Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), Deutsche Forschungsgemeinschaft und Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (DFG - BMZ Lu812/1-3)) und dem fortune – Programm der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen.

10. Lebenslauf

- **Geburtsdatum** 27.02.1975
- **Geburtsort** Schwäbisch Hall
- **Eltern** Randolph Kramer, Bankkaufmann
Ortrun Kramer, Krankenschwester
Bruder Daniel

- **Schulbildung**

	1985	Gymnasium St. Michael in Schwäbisch Hall
	1990	Gymnasium der Schloss-Schule in Kirchberg an der Jagst
Abitur	1995	Kirchberg an der Jagst

- **Zivildienst** 1995-1996 Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes in Schwäbisch Hall

- **Medizin-Studium** 1997-2006 Georg-August-Universität in Göttingen

Famulaturen	2002	Innere Medizin in Coleraine, Nordirland
	2002	Tropen- und Reisemedizin bei Prof. T. Jelinek, LM-Universität, München
	2004	Gynäkologie und Geburtshilfe, Chirurgie im Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné, Gabun
	2004	Gynäkologie und Geburtshilfe im Krankenhaus Neu Bethlehem, Göttingen
Praktisches Jahr	2005-2006	Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Northeim, Wahlfach: Gynäkologie
Ärztliche Prüfung	25.04.2006	(3. Staatsexamen)
Approbation	Mai 2006	

- **Dissertation** 2003-2010 „Immunantwort afrikanischer Neugeborener als Funktion mütterlicher Malariaanamnese“ Prof. Dr. Peter G. Kremsner, Institut für Tropenmedizin, Universität Tübingen

- **Interessen**

Reisen Tunesien, Ecuador, Kolumbien, Venezuela (1996), Indien (2000), Irland (2002), Gabun (2003/2004), Kambodscha (2009)

Sprachen Englisch, Französisch, Spanisch, Schwedisch, Türkisch