

**Aus dem
Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. Knobloch**

**Sektion Humanparasitologie
Leiter: Professor Dr. P. G. Kremsner**

**Untersuchung des Einflusses mütterlicher
P.falciparum-Infektion
auf die neonatale angeborene zelluläre Immunaktivität**

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

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

**vorgelegt von
Andrea Santamaria geb. Brückner
aus Berlin**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Schick

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Malaria und ihre Parasiten	1
1.2	Epidemiologie	6
1.3	Abwehrmechanismen bei Malaria	8
1.4	Zytokine	16
1.5	Malaria in der Schwangerschaft	20
1.6	Ziele	22
2	Patienten und Methoden	24
2.1	Der Studienort	24
2.2	Die Patienten	25
2.3	Untersuchungen und Versuche dieser Studie	26
2.4	Diagnostik	27
2.5	Wissenschaftliche Analysen	28
2.6	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Festlegung des Infektionsstatus	35
3.2	Vergleich klinischer Daten in den Gruppen	37
3.3	Zytokinmuster der γ - δ -T-Zellen und der NK-Zellen nach Stimulation in PBMC/ CBMC mit PMA & Ionomycin	40
3.4	Zytokinmuster der Zellen der adaptiven Immunantwort nach Stimulation in PBMC/ CBMC mit PMA & Ionomycin	47
4	Diskussion	51
4.1	Infektionsstatus	51
4.2	Vergleich klinischer Daten	52

4.3	Vergleich der Zytokinmuster der γ - δ -T-Zellen und der NK-Zellen_____	53
4.4	Vergleich der Zytokinmuster der Zellen der adaptiven Immunantwort _____	62
5	Zusammenfassung_____	65
6	Verwendete Materialien _____	67
6.1	Materialien für die Diagnostik_____	67
6.2	Materialien für die wissenschaftlichen Analysen _____	67
7	Literaturverzeichnis _____	70
8	Danksagung_____	74
9	Lebenslauf _____	75

1 Einleitung

1.1 Die Malaria und ihre Parasiten

1.1.1 Definition der Malaria

Malaria ist eine Infektionserkrankung, die vor allem in tropischen und subtropischen Gebieten weit verbreitet ist. Es ist eine parasitäre Erkrankung, die von Vektoren übertragen wird. Die krankheitsverursachenden Parasiten sind *Plasmodien*, *Protozoen* des Stammes der *Sporozoa*, die rote Blutkörperchen befallen (*Haemosporina*). Davon sind 4 Spezies humanpathogen: *P. falciparum*, Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*, Erreger der Malaria tertiana und *Plasmodium malariae*, Erreger der Malaria quartana.

P. falciparum ist die am weitesten verbreitete und auch die gefährlichste Art unter ihnen. Die Malaria tropica kann unbehandelt tödlich verlaufen als Folge von Komplikationen wie Hyperparasitämie, Anämie, zerebraler Malaria und Multiorganversagen.

1.1.2 Entwicklungszyklus des Parasiten

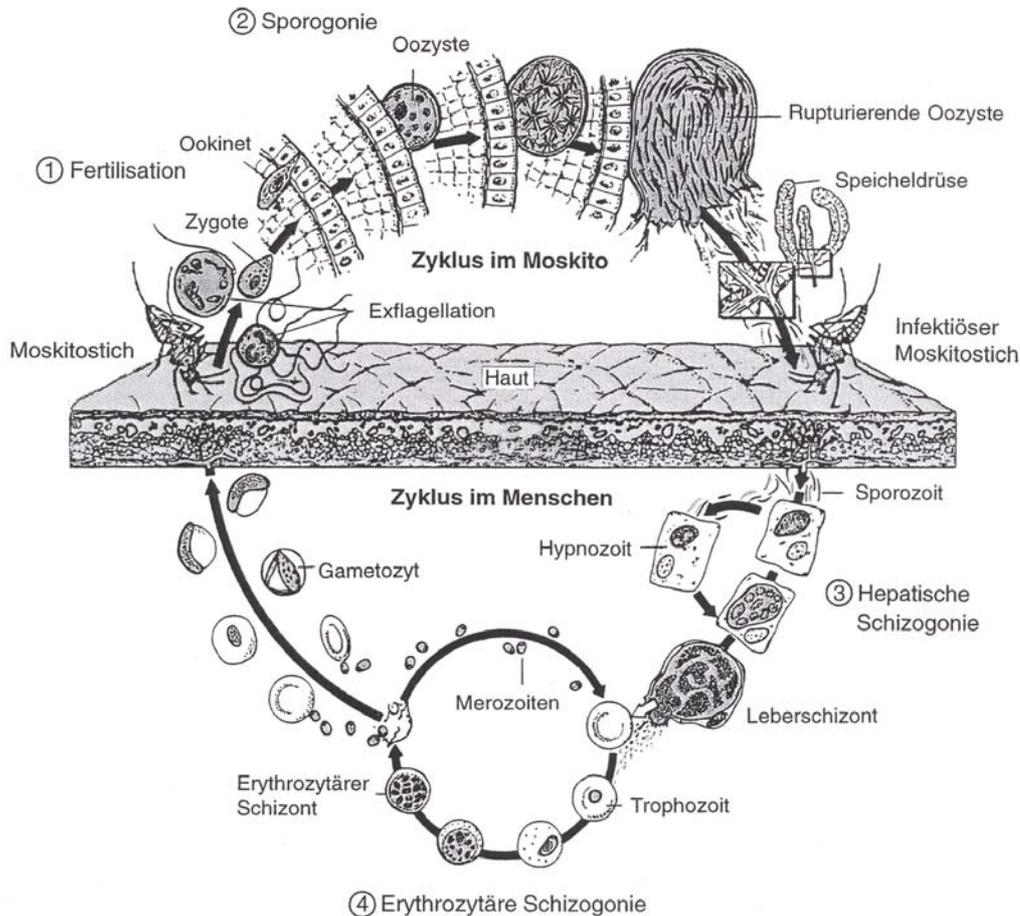
Die Vektoren der Malaria sind blutsaugende weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles*, die Übertragung findet jeweils während der Blutmahlzeit statt. Aus den Speicheldrüsen der Mücke werden Sporozoiten (zumeist weniger als 100) in die Blutzirkulation des Menschen freigesetzt. Diese dringen innerhalb von 2 bis 30 min in die Hepatozyten ein. Wachstum und Teilung der Sporozoiten in der Leber dauert für *P. falciparum* ca. 6 bis 9 Tage (Hepatische Schizogonie). Mit Abschluss dieses prä-erythrozytären Zyklus platzt der Leberschizont und es werden bis zu 40.000 Merozoiten in die Blutzirkulation entlassen. Die Merozoiten binden innerhalb von 15 bis 20 Sekunden an Erythrozyten und dringen in diese ein. Im asexuellen Erythrozytenzyklus entwickeln sich die Trophozoiten innerhalb von 48 bis 72 Stunden zu

erythrozytären Schizonten. Reife Schizonten platzen und entlassen mit der Zerstörung der roten Blutzellen wiederum Merozoiten, die dann erneut rote Blutzellen befallen (Erythrozytäre Schizogonie). Der Zyklus wiederholt sich und es kommt zur exponentiellen Vermehrung der Parasiten bis er durch Chemotherapie, Immunantwort oder Tod des Patienten unterbrochen wird. Oft wird das Parasitenwachstum synchronisiert, die Parasiten erreichen das Stadium der Schizogonie gleichzeitig und mit dem Zerfall der Erythrozyten werden Pyrogene freigesetzt, die für Fieber und die klinischen Symptome verantwortlich sind.

Nach einigen Zyklen differenzieren einzelne Merozoiten zu männlichen und weiblichen Gametozyten, den sexuellen Vermehrungsformen. Diese werden von der weiblichen Anophelesmücke mit der Blutmahlzeit an einer infizierten Person aus dem menschlichen Blut aufgenommen. Im Moskito reifen diese zu Gameten, es erfolgt die Bildung der Zygote, die sich innerhalb von 24 Stunden zum beweglichen Ookineten entwickelt. Dieser wandert im Moskito in die Basallamina des Darmes. In der entstehenden Oozyste werden die Sporozoiten freigesetzt und diese migrieren in die Speicheldrüsen der Mücke. Bei jeder weiteren Blutmahlzeit der infizierten Mücke werden die Sporozoiten mit dem Speichel auf den Menschen übertragen. Damit ist dieser Zyklus innerhalb von 7 bis 18 Tagen geschlossen (je nach Umgebungstemperatur).

Abbildung 1

Entwicklungszyklus von Plasmodium



Der Zyklus der Malariaparasiten

Aus: Knobloch, J. (Herausgeber) (1996), Tropen- und Reisemedizin, 1.Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena

1.1.3 Klinik der Malaria

Die Intensität der klinischen Symptome ist abhängig vom Immunitätsgrad des Patienten. Zu den Patientengruppen mit niedriger Immunität gehören Kleinkinder nach dem 3 – 6 Monate dauerndem Schutz durch Immunfaktoren der teilimmunen Mutter in hyperendemischen Gebieten sowie alle Bewohner nicht- und hypoendemischer Gebiete.

Patienten mit Semi-Immunität haben bei Erkrankung eine mäßig vergrößerte Leber, eine tastbare Milz, eine leichte Anämie bei geringfügiger Parasitämie. Während der Hauptübertragungszeit, der Regenzeit, können bei diesen Patienten kurze fieberhafte Krankheitsperioden auftreten, die auch ohne Therapie rasch überwunden werden.

Die Zeit bis zum Auftreten erster Symptome nach Infektion nichtimmuner Patienten mit *P. falciparum* beträgt zwischen 6 und 14 Tagen, abhängig von der Sporozoitendosis bei Übertragung. Erste Symptome der unkomplizierten Malaria tropica sind unspezifisch: Abgeschlagenheit, Kopf- und Gelenkschmerzen sowie subfebrile unregelmäßige Temperaturen. Nach kurzer Zeit steigen die Temperaturen an, selten zeigt sich Rhythmizität, septische Fieberverläufe bis zur Continua sind möglich. Es kommt zu den typischen mehr oder weniger regelmäßigen Fieberschüben durch den sich wiederholenden Zyklus: die Schizonten platzen, es werden Toxine und der Inhalt der Erythrozyten freigesetzt, die frei gewordenen Merozoiten befallen die Erythrozyten erneut. Die Milz ist vergrößert und kann bei leichtem Trauma oder auch spontan rupturieren. Oft findet sich auch eine mäßige Hepatomegalie. Die normochrome Anämie mit ihren unspezifischen klinischen Zeichen wie Blässe, Dyspnoe und Schwäche entsteht durch Hämolyse, aber auch durch TNF- α (Tumornekrosefaktor α) vermittelte Hemmung der Erythropoetinproduktion, Dyserythropoese und Erythrozytenphagozytose. Hämolysezeichen sowie eine Erhöhung der Laktatdehydrogenase sind regelmäßig nachweisbar. Die Leukozytenzahl bleibt zunächst normal bei einer Eosinopenie und mäßiger Monozytose im Differentialblutbild. Durch peripheren Verbrauch und verminderte Neubildung von Thrombozyten tritt meist eine deutliche Thrombozytopenie auf.

Bei nicht rechtzeitiger Therapie verschlechtert sich das klinische Bild rasch, es kommt zu einer komplizierten Malaria tropica. Die WHO – Kriterien für eine komplizierte Malaria tropica entsprechen klinischen Symptomen: Bewusstseinstörungen bis zum Koma, oft verbunden mit weiteren zerebralen

Symptomen wie Krampfanfällen, schwere Anämien (Hämoglobin < 5g/dl), akutes Nierenversagen, nicht kardiales Lungenödem bis zur Ausprägung eines ARDS, Dehydratation und Hypovolämie, Kreislaufschock, Hypoglykämie, disseminierte intravasale Gerinnung, Hyperpyrexie > 40°C, Hyperparasitämie von > 5% parasitenbefallener Erythrozyten mit Auftreten von Schizonten im peripheren Blut, Hämoglobinurie und schweres Erbrechen. Besonders bei Kindern kann es zu Fundusblutungen (präretinal, oft im Makulabereich) im Vorfeld der zerebralen Malaria kommen.

Die zerebrale Malaria stellt die schwerste Verlaufsform der Malaria tropica dar. Der Grad der Bewusstseinstrübung kann unterschiedlich ausgeprägt sein, im fortgeschrittenen Stadium bis zum tiefen Koma. Andere neurologische Zeichen wie hirnorganisches Psychosyndrom, Krampfanfälle, neurologische Herdsymptome sind möglich. Auch bei rasch einsetzender intensivmedizinischer Therapie ist der Verlauf der zerebralen Malaria oft tödlich. Diese Komplikation wird auf histologischer Ebene begleitet durch Sequestrierung (das heißt Adhäsion über bestimmte Liganden) der parasitierten Erythrozyten an Endothelzellen in postkapillären Venolen. Neben der mechanischen Flussbehinderung tragen immunpathologische Mechanismen mit vermehrter Freisetzung von Zytokinen, dadurch Aktivierung von Endothelzellen, vermehrter Expression von Rezeptoren und Liganden für Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten und deren Adhäsion zur Verlegung der postkapillären Venolen bei. Freiwerdende Malariatoxine beim Platzen der parasitierten Erythrozyten bewirken außerdem eine lokale Hyperaktivierung der Zellen. Die dabei u. a. frei werdenden Verbindungen mit Sauerstoffradikalen führen zu Endothelschädigung und dessen Desintegration. Damit kommt es zur Schädigung von Gehirn und anderen lebenswichtigen Organen mit resultierendem Koma oder Multiorganversagen.

Kommt es zur sogenannten Hyperparasitämie, das heißt zum Befall von mehr als 250 000 Erythrozyten pro μ l Blut (dies entspricht ca. einem Befall von 10%

der gesamten Erythrozyten), prägt sich meist eine schwere Anämie aus mit ihren unspezifischen klinischen Zeichen wie Blässe, Dyspnoe und Schwäche.

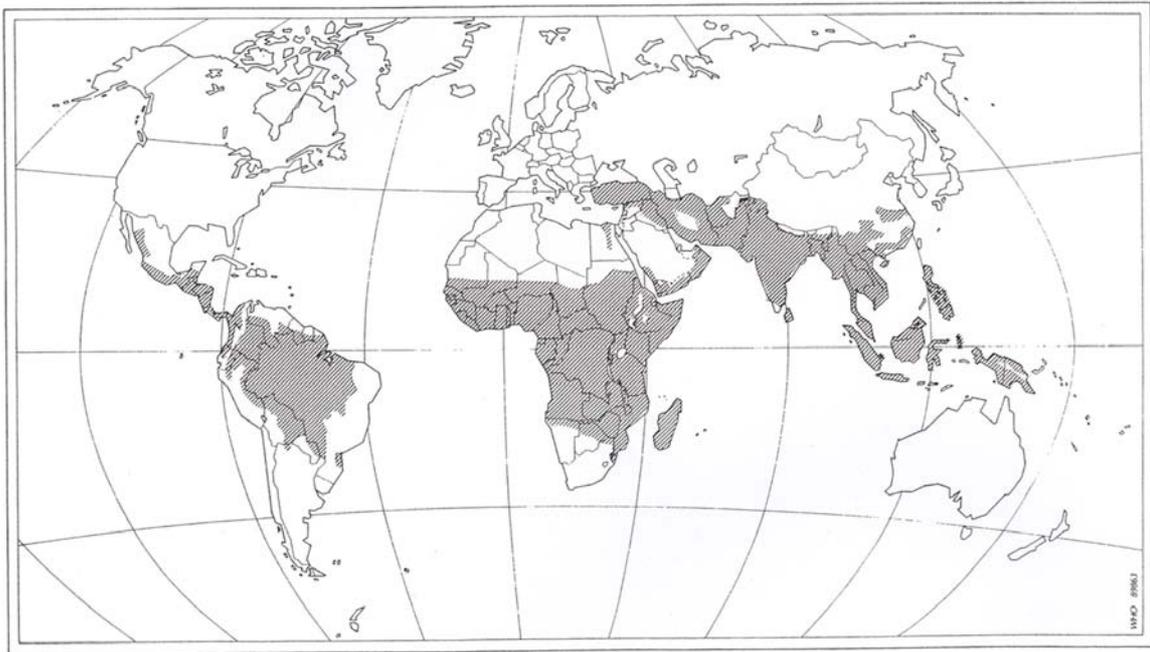
Eine weitere Komplikation stellt die schwere Hypoglykämie dar, oft in Kombination mit einer Laktatazidose. Dazu führen Phospholipidantigene, die die Glukoseaufnahme ins Gewebe erhöhen und hohe TNF-Spiegel bei komplizierter Malaria, die ebenfalls eine blutzuckersenkende Wirkung haben (Kretschmer et al. 1996).

Dabei ist auffällig, dass je nach Alter des Patienten verschiedene Komplikationen typisch sind: schwere Anämien treten gehäuft in früher Kindheit auf, zerebrale Malaria später im Kindesalter (Miller et al. 1994).

1.2 Epidemiologie

Das Verbreitungsgebiet der Krankheit erstreckt sich von Gebieten in Afrika südlich der Sahara über Südostasien und Südamerika. In letzter Zeit tritt Malaria wieder in Gebieten auf, aus denen die Erkrankung verdrängt worden war, und zudem ist die Ausbreitung in neue Gebiete wie Zentral Asien (Malaria Foundation International 2000) zu verzeichnen. Das liegt zum einen an der Ausbreitung der Vektoren. Versuche, die Endemizität von Malaria durch regelmäßiges Sprühen von Insektiziden und konsequente Therapie von Erkrankungen zu kontrollieren und einzudämmen waren bisher nicht sehr erfolgreich. Zum einen werden die Mücken zunehmend resistent gegen Insektizide, zum anderen nimmt die Resistenz der Parasiten gegen Standard-Antimalariamittel zu, vor allem gegen Chloroquin, eine kostengünstige und ehemals sichere Therapie. Multiresistente Stämme tauchen zunehmend auf, vor allem in Südostasien aber auch in Afrika. So ergibt sich ein wachsendes Problem in den betroffenen Regionen, da vor allem hier kostengünstige und effiziente Arzneimittel in großen Mengen benötigt werden.

Abbildung 2



Verbreitungsgebiete der Malaria

Aus: Knobloch, J. (Herausgeber) (1996), Tropen- und Reisemedizin, 1.Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena

Malaria ist eines der größten Gesundheitsprobleme weltweit. Malaria ist jährlich für bis zu 500 Millionen Fälle klinischer Erkrankungen verantwortlich. 40% der Weltbevölkerung in über 90 Ländern leben zu Beginn des 21. Jahrhunderts in malariagefährdeten Gebieten (Malaria Foundation International 2000). Malaria repräsentiert damit ein Gesundheitsproblem für 2,4 Milliarden Menschen. Beinahe 10% der Weltbevölkerung erleiden eine Malaria pro Jahr. Die meisten Fälle heilen nach einer 10 – 20 Tagen dauernden klinischen Erkrankung aus, jedoch nehmen in letzter Zeit die auf Malaria zurückzuführenden Todesfälle zu – jährlich sterben mehr Menschen an Malaria als noch vor 30 Jahren. Geschätzt werden zwischen 1.5 und 2.7 Millionen Todesfällen pro Jahr, darunter hauptsächlich Kinder, nicht immune Erwachsene und semi-immune Frauen während der Schwangerschaft. Fast alle diese Fälle sind von *P. falciparum* verursacht. Am stärksten betroffen ist Afrika südlich der Sahara.

Mehr als 90% der Todesfälle treten in dieser Region auf und 5% der Kinder sterben hier aufgrund einer Malaria bevor sie das Alter von 5 Jahren erreichen.

Es wird geschätzt, dass Malaria in Afrika bei ca. 3 Millionen Neugeborenen jährlich für Komplikationen wie niedriges Geburtsgewicht und ein Versterben in der Perinatalperiode verantwortlich ist, verursacht durch eine Infektion der Mutter in der Schwangerschaft.

Warum Malaria in diesen Populationsgruppen schwere und lebensbedrohliche Erkrankungen verursacht, liegt vermutlich am Zusammenspiel vieler Faktoren: der Ernährungszustand der Patienten, das Niveau der erworbenen Immunität und Parasiteneigenschaften.

1.3 Abwehrmechanismen bei Malaria

Nichtimmune Patienten erkranken an einer Malaria tropica ohne rechtzeitige Therapie schwer und können daran versterben. Ihnen steht nur die unspezifische Abwehr zur Verfügung. Diese kann zwar Parasiten bekämpfen, trägt aber gleichzeitig bei überschießender Aktivierung zu den Organkomplikationen bei.

Bei Menschen, die in Endemiegebieten leben, bildet sich durch häufige wiederholte Infektionen mit Plasmodien eine Teilimmunität aus, die sich durch unkomplizierte oder auch asymptomatische Verläufe auszeichnet. Bei Infektion ist die Parasitenreplikation limitiert und die Symptome sind gemildert. Diese Semiimmunität wird durch regelmäßige Neuinfektionen aufrechterhalten und verliert sich bei Unterbrechung der Exposition.

Des Weiteren haben sich im Laufe der Evolution in den malariaendemischen Gebieten genetische Resistenzfaktoren herausgebildet.

1.3.1 Angeborene Resistenzfaktoren

Auffällig ist die geographische Korrelation: Vor Einführung von Mückenkontrollprogrammen verlief die geographische Verbreitung von Sichelzellanämie, Thalassämien und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel parallel zur Verbreitung der Malaria. Diese Erkrankungen schützen vor einem schweren Verlauf der Malaria, was eine Verbreitung der entsprechenden Gene begünstigt.

Am bekanntesten ist sicherlich die „Sichelzellanämie“, die in hyperendemischen Gebieten für *P. falciparum* besonders häufig ist. Hierbei handelt es sich um eine Punktmutation der β -Kette des Hämoglobins, die im heterozygoten Zustand (HbAS) vor schweren Malariaverlaufsformen schützt. Die Parasitenreplikation ist deutlich geringer, was vermutlich daran liegt, dass im Erythrozyten mit Hämoglobin S aufgrund niedriger Sauerstoffspannung das Wachstum von *P. falciparum* inhibiert wird. Weiterhin nehmen die parasitierten Erythrozyten Sichelform an und können so leichter phagozytiert werden. Es kommt zu weniger „Rosetting“ – einer Adhäsion von parasitierten an nicht parasitierte Erythrozyten. Auf diesem Wege entwickelt sich nur allmählich eine mäßige Parasitendichte (Weatherall et al. 1995). Bei diesen Patienten entsteht eine schnellere Akquisition der Semi-Immunität. Diese Mutation schützt aber nicht vor häufigen Neuinfektionen, jedoch kommt es zu weniger klinischen Erkrankungen. Dieser Vorteil betrifft nicht die Patienten, bei denen diese Mutation homozygot vorliegt (HbSS). Bei ihnen löst oxidativer Streß Sichelzellkrisen aus und ist dadurch mit erheblicher Morbidität und Mortalität verbunden.

Eine weitere Hämoglobinvariante, das in Westafrika häufige Hämoglobin C, führt zu verminderter Invasion von Parasiten in die roten Blutkörperchen und zu schlechterem intraerythrozytärem Wachstum. Auch das fetale Hämoglobin F (HbF) ist mit vermindertem intraerythrozytärem Wachstum verbunden (Weatherall et al. 1995).

Die Blutgruppe A scheint für schwere Malaria zu prädestinieren (Lell et al. 1999). Sie kommt in Europa mit 43% Häufigkeit vor, in Zentralafrika dagegen nur mit 15-20%. Die weitaus häufigste Blutgruppe ist hier O. Unter den von uns untersuchten Frauen fand sich Blutgruppe O zu 62% (154 von 248 Individuen), Blutgruppe A zu 21% (52 von 248 Individuen). Eine mögliche Erklärung dafür könnte der Selektionsnachteil der Blutgruppe A sein.

Die α - und β -Thalassämie sind geographisch mit dem Vorkommen der Malaria korreliert (Weatherall et al. 1995). Ihre Genfrequenz ist proportional zur Malariaprävalenz. Träger der β -Thalassämie, bei denen die Produktion der β -Globinkette des Hämoglobins vermindert bzw. aufgehoben ist, haben nur halb so häufig klinisch manifeste Malariaerkrankungen wie Träger des Wildtyps und bei homozygoten Trägern der α -Thalassämie sind schwere Malaria und vor allem schwere Anämie seltener (Hill, Weatherall 1998), was allerdings in Lambaréné, Ort dieser Studie, nicht nachvollzogen werden konnte (Lell et al. 1999).

Der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel wird X-chromosomal vererbt und scheint heterozygot nur ein halb so großes Risiko für schwere Malaria im Vergleich zum Wildtyp zu haben.

Des Weiteren gibt es einige erythrozytenunabhängige angeborene Resistenzfaktoren, von denen hier bestimmte HLA (human leucocyte antigen) Klasse 1- und 2-Typen zu nennen wären, die mit einem Schutz vor zerebraler Malaria assoziiert sind. So schützt der HLA - Typ B53 vor zerebraler Malaria und Haplotypen von Klasse 2-Allelen vor schwerer Anämie (Hill et al. 1991, May et al. 2001).

Eine Mutation im Promoter der durch Zytokine induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase-2 (NOS2^{Lambaréné}) schützt vor schwerer Malaria und häufigen Infektionen (Kun et al. 1998, 2001).

1.3.2. Erworbene Resistenz

Gegen Parasiten entwickelt sich – im Gegensatz zu Viren und Bakterien – im Allgemeinen nur eine ungenügende und zeitlich begrenzte Immunität. Vermutlich ist dies durch die sehr komplexe genetische Struktur der Parasiten bedingt, durch die große Anzahl verschiedenster Antigene und durch die stammesgeschichtliche Verwandtschaft zum menschlichen Zellsystem, die oft eine optimale Anpassung an den Wirtsorganismus möglich macht.

Eine Immunität im Falle der *Malaria tropica* ist abhängig von der Endemizität, den genetischen Voraussetzungen und dem Alter der Person und dem übertragenen Parasiten. Nach wiederholten Infektionen und bei anhaltender Exposition kommt es zu einer so genannten Semiimmunität, d.h. dass folgende Infektionen milder oder auch asymptomatisch ablaufen. Das ist die sogenannte klinische Immunität. Eine sterile antiparasitäre Immunität kann auch auftreten, ist aber nicht durchgängig vorhanden. Kinder semiimmuner Mütter sind während der ersten 6 Lebensmonate durch mütterliche Antikörper partiell geschützt. Das in dieser Zeit noch vorhandene Hb F dürfte auch noch mit dazu beitragen, dass es in dieser Zeit äußerst selten zu schweren Verlaufsformen einer *P. falciparum* – Infektion kommt.

1.3.3 Unspezifische Abwehrmechanismen

Unspezifische Abwehrmechanismen sind die einzige Verteidigung des Körpers gegen Malaria bevor sich bei einem Säugling oder bei einer Person ohne vorherige Malariakontakte eine antigenspezifische Immunität entwickelt hat. Auch bei semiimmunen Patienten spielen sie eine wichtige Rolle bevor die spezifischen Abwehrzellen rekrutiert werden sowie zur Reduktion der Parasitenlast. Diese unspezifischen Mechanismen stellen ein Zusammenwirken von Zellen wie neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, „Natural Killer“ (NK) Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und löslichen Faktoren dar, wie u. a. Komplement und Mannose-bindendem Lektin (MBL).

Neutrophile Granulozyten vermitteln die Phagozytose von *P. falciparum*. In vitro-Versuche zeigen, dass sie intraerythrozytäre asexuelle Parasiten und freie Merozoiten abtöten können. IFN- γ und TNF und LT verstärken diesen antiparasitären Effekt noch in Anwesenheit von Komplement und Antikörpern. Die genaue in vivo-Relevanz ist aber noch unklar.

Gewebeständige Makrophagen und zirkulierende Monozyten im Blut können Zytokine sezernieren und die Effektorfunktionen von Zytokinen modulieren. Sie phagozytieren direkt freie Parasiten und parasitierte Erythrozyten, besonders in der Milz mustern sie gezielt Erythrozyten auf „Anomalitäten“ aus. Darüber hinaus können sie auch reaktive Sauerstoffmetaboliten, Lipidperoxide, Stickstoffmonoxidderivate und lysosomale Enzyme sezernieren. Sie besitzen Komplement und Oberflächenrezeptoren für Fc (fraction crystallizable, konstanter Teil des Antikörpers im Gegensatz zum antigenbindenden Teil, dem Fab des Immunglobulins). Stimuliert durch TNF- α und IFN- γ trägt dies auch zur Zerstörung der Parasiten bei. Bei der so genannten antikörperabhängigen zellulären Hemmung (ADCI) arbeiten Monozyten und Makrophagen mit malariaspezifischen Antikörpern zusammen.

15% der zirkulierenden Lymphozyten sind NK-Zellen. NK-Zellen brauchen keine Stimulierung durch MHC-Präsentation von spezifischen Antigenen. Sie besitzen eine starke direkte Zytotoxizität, die durch IFN- γ und TNF- α noch verstärkt werden kann. Als Induktor für diese beiden Zytokine konnte IL-12 verantwortlich gemacht werden. NK-Zellen können auch selbst Zytokine produzieren wie IFN- γ und TNF- α . Über die sezernierten Zytokine aktivieren sie antigenpräsentierende Zellen und beeinflussen die T-Helfer-Zellen in ihrem Zytokinmuster in Richtung TH1 (s. u.). Sie sind als eine Zellart (die andere sind die γ - δ -T-Zellen) beteiligt an der frühen pro-inflammatorischen Immunantwort bei Malaria. Nach Stimulation mit *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten in vitro sezernieren sie IFN- γ innerhalb 24 Stunden und unterdrücken das Parasitenwachstum in vitro (Artavanis et al. 2002, Mavoungou et al. 2003)

Die weitere T-Zell-Subpopulation mit entscheidendem Beitrag zur frühen Immunantwort bei Malaria, die $\gamma\delta$ -T-Zellen, macht nur etwa 1-5% der Lymphozyten im peripheren Blut Erwachsener aus. Sie unterscheiden sich von den anderen T-Zellen darin, dass sie statt der α - und β -Kette eine γ - und eine δ -Kette im T-Zellrezeptor zur Antigenerkennung besitzen. Sie sezernieren IFN- γ und TNF- α und hemmen auf diesem Weg das Parasitenwachstum bevor eine antikörpervermittelte Immunantwort zur Parasitenbekämpfung bereit steht. In Erwachsenen sind die häufigsten Subpopulationen im peripheren Blut die Zellen mit V γ 9- und V δ 2-Ketten im $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor. Neuere Studien haben gezeigt, dass V γ 9V δ 2-T-Zellen auch fähig sind zur spezifischen Immunantwort im Sinne des immunologischen Gedächtnisses. Es ist möglich, dass sie hiermit eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität bilden (Shen et al. 2002). Ein Anwachsen der V γ 9V δ 2 Subpopulation nach akuter Malaria wurde in verschiedenen Studien beschrieben und Expression von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von $\gamma\delta$ -T-Zellen während der akuten Erkrankungsphase wird als Zeichen ihrer Aktivierung in vivo angesehen (Hviid et al 1996). $\gamma\delta$ -T-Zellen sezernieren früh nach Inkubation mit *P. falciparum* -infizierten Erythrozyten Th1- Zytokine, aktivieren dadurch Makrophagen und spielen damit vermutlich eine Rolle im Schutz vor Malaria (Hensmann et al. 2001). Im Tierversuch konnte eine wichtige Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Elimination von Parasiten nachgewiesen werden, und die Hemmung des Parasitenwachstums konnte in vitro nachgewiesen werden (Troye-Blomberg et al. 1999).

1.3.4 Antikörpervermittelte Immunität

Antikörper können den Parasiten direkt schädigen, dessen Phagozytose fördern, Komplement aktivieren oder den Zugang zur Wirtszelle verwehren und damit die Ausbreitung der Infektion verhindern. Gelingt es dem Parasiten dennoch, in die Zelle zu gelangen, greifen diese Mechanismen nicht mehr. Intraerythrozytäre Malariaparasiten können durch Wasserstoffperoxid und andere zytotoxische Substanzen aus aktivierten Makrophagen angegriffen werden.

Direkte Schädigung des Parasiten erfolgt über Aktivierung des klassischen Komplementweges durch Antikörper (komplementvermittelte Lyse). Durch Besetzen der Anlagerungsstelle blockieren die Antikörper den Bindungsort der Merozoiten, die daraufhin nicht mehr an die Erythrozytenoberfläche binden können. Dadurch wird die weitere Vermehrung des Parasiten unterbunden. Weiterhin unterstützen Antikörper die Phagozytose: Komplement C3b auf der Parasitenmembran opsoniert den Erreger für die Phagozytose durch Zellen mit C3b-Rezeptoren (z.B. Makrophagen).

Die Antikörper sind spezifisch und richten sich jeweils gegen die unterschiedlichen Stadien des Entwicklungszyklus des Parasiten und deren Oberflächenantigene.

1.3.5 Zelluläre Immunität

Die zelluläre Immunität ist abhängig von spezifischen T-Zellen mit dem für sie charakteristischen T-Zell-Rezeptor. Man unterscheidet bei den T-Zellen solche, die eine α - und eine β -Kette und andere, die eine γ - und eine δ -Kette zur Antigenerkennung besitzen (γ - δ -T-Zellen). Man unterscheidet wiederum die α - β -T-Zellen nach unterschiedlicher Art der Antigenerkennung und der damit assoziierten Adhäsionsmoleküle CD4 und CD8.

CD4⁺ T-Helferzellen erkennen das Antigen in Assoziation mit HLA-Klasse II, das heißt, sie erkennen Peptide „exogener“ Antigene, die vor allem auf den klassischen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten) angeboten werden. Die T-Zelle reagiert mit Zytokinproduktion und stimuliert die Antikörperproduktion bzw. die Makrophagen. Damit haben CD4⁺ T-Helferzellen immunoregulatorische Funktionen bezüglich anderer immunologisch aktiver Zellen.

CD8⁺ T-Zellen erkennen das Peptid auf HLA-Klasse I, das heißt also vor allem Peptide von zelleigenem oder viralem Ursprung und spielen außerdem eine

besonders wichtige Rolle bei der Immunität gegen die extraerythrozytären Stadien der Infektion, z.B. gegen Sporoziten. Werden Mäuse, die gegen Sporoziten immunisiert worden sind, durch Injektion von CD8-Antikörpern behandelt, verlieren sie ihren Schutz gegen eine Reinfektion. Die Schutzwirkung der CD8⁺ T-Zellen könnte auf der direkten Zerstörung von sporozitenhaltigen Hepatozyten beruhen oder indirekt auf der Produktion von IFN- γ und der Aktivierung von Makrophagen mit Freisetzung von Stickoxid sowie andern toxischen Substanzen, die zum Abtöten der Parasiten führen. Die zytotoxische Funktion bezüglich intraerythrozytärer Stadien von *P. falciparum* ist nicht geklärt, da Erythrozyten keine MHC-I-Präsentation haben. CD8⁺ T-Zellen sezernieren auch Zytokine und können so, ähnlich wie CD4⁺ T-Helferzellen Makrophagen zum intrazellulären Abtöten stimulieren. In sofern scheint es wichtig, dass Proteinfragmente mancher intrazellulärer Erreger von HLA-Klasse I präsentiert werden.

Die γ - δ -T-Zellen sind bei akuter Infektion vermehrt im Blut und in der Milz zu finden. γ - δ -T-Zellen sind in Immunantworten gegen verschieden Mikroorganismen aktiv, wie *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* und *Brucella abortus*. Verschiedene Sub-Populationen haben verschiedene Funktionen je nach Zeitpunkt der Aktivierung im Verlauf der Infektion und dem umgebenden Zytokinmilieu. Das führt je nach dem zu einer schützenden inflammatorischen oder einer immunregulativen antiinflammatorischen Antwort.

1.3.6 Generalisierte Immunsuppression bei Malaria

Eine Malaria tropica, vor allem beim Nichtimmunen und bei schweren Verlaufsformen führt zu einer generalisierten Immunsuppression mit einer reduzierten spezifischen Abwehr gegen andere Mikroorganismen und deren Antigene und daraus folgend auftretenden Bakteriämien und Septikämien (Kremsner et al. 1990).

1.4 Zytokine

1.4.1 Th1/ Th2 Konzept

Aktivierte T-Lymphozyten setzen eine Reihe von Zytokinen frei, die die Immunantwort regulieren. Bestimmte Zytokine aktivieren bestimmte Effektorzellen bevorzugt bzw. fördern ihre Reifung. Insofern kann je nach Zytokinmuster eine qualitativ unterschiedliche Immunantwort erfolgen. T-Zellen sezernieren nach wiederholter oder nach chronischer Stimulation ein eingeschränktes, z.T. unterschiedliches Zytokinmuster.

Im Wesentlichen werden drei Subtypen unterschieden:

- *Th0-Zellen*: Sie sezernieren nach Aktivierung eine breite Palette von Zytokinen in eher geringen Mengen (IL-2, IL-5, IFN- γ , TNF- α , IL-10 etc.), die zum Teil antagonistisch wirken. TH0 Zellen werden v. a. zu Beginn einer Immunantwort stimuliert.

- *Th1- oder Th2-Zellen*: chronische Stimulationen bewirken ein Ausreifen der Th0-Zellen zu T-Zellen, die ein mehr eingeschränktes Zytokinmuster sezernieren, in der Regel in hohen Konzentrationen. Je nach Dominanz der sezernierten Zytokine unterteilt man in Th1 und Th2- Lymphozyten:
 - *Th1-Zellen* setzen viel IL-2, IFN- γ , TNF- α frei
 - *Th2-Zellen* synthetisieren mehr IL-4, IL-5

Andere Zytokine, wie z. B. IL-10, können beim Menschen nicht eindeutig den Th1- oder Th2-Zellen zugeordnet werden.

Th1-typische Zytokine (IFN- γ , IL-12, TNF- α) fördern die Differenzierung zu Th1-Zellen, während Th2-charakteristische Zytokine die Entwicklung zu TH2-Zellen

fördern und diejenige zu Th1-Zellen blockieren. Wiederum ist zu bedenken, dass verschiedene Zellen, insbesondere die Effektorzellen der Entzündung (Mastzellen, NK-Zellen, γ - δ -T-Zellen), selbst Zytokine freisetzen können und dadurch die T-Zellantwort beeinflussen.

Es resultiert je nach Th1- oder Th2-Stimulation eine unterschiedliche Immunantwort. Eine bevorzugte Stimulation der Th2-Zellen führt zu starker Antikörperproduktion, die entsprechenden Zytokine hemmen die Th1-Antwort. IFN- γ und IL-12 wiederum blockieren eine Th2-Antwort. Eine Stimulation der Th1-Zellen bewirkt eine Stimulierung der Makrophagen (Wirkung von IFN- γ , TNF- α). Allerdings wirken einige typische Th1- Zytokine auch auf ruhende B-Zellen und somit auch auf die Antikörperbildung.

1.4.2 Charakteristika und Funktion ausgewählter Zytokine

Zytokine werden während der angeborenen und der adaptiven/ erworbenen Immunantwort freigesetzt. Sie haben insbesondere proinflammatorische, immunoregulatorische und die Hämatopoese (Entzündungszellen) steuernde Funktionen. Sie wirken hauptsächlich lokal: über einen autokrinen oder parakrinen, z. T. jedoch auch über einen endokrinen Mechanismus. Ihre Produktion und Sekretion ist kurzfristig - nur solange die Aktivierung der Produktionszelle anhält. Viele unterschiedliche Zytokine werden von verschiedenen Zellen gebildet und wirken auch auf verschiedenen Zellen (sog. Pleiotropismus). Einige können die Produktion anderer induzieren oder supprimieren, sie können synergistisch oder antagonistisch wirken. Zytokine binden an spezifische Zytokinrezeptoren, die das jeweilige Zytokin meist mit sehr hoher Affinität binden. Die Expression der Rezeptoren ist ebenfalls reguliert. Einige Zytokinrezeptoren sind im Serum als lösliche Antagonisten nachweisbar.

Man kann die Zytokine aufgrund ihrer Funktion in verschiedene Kategorien einteilen:

- Zytokine der natürlichen Immunität (proinflammatorische Zytokine): Sie werden bei Anwesenheit infektiöser Keime von mononukleären Phagozyten freigesetzt.
- Regulatoren von Lymphozytenaktivierung, -wachstum und -differenzierung: Diese werden von T-Lymphozyten nach spezifischer Antigenanerkennung freigesetzt.
- Regulatoren der immunologischen Entzündung (Aktivierung unspezifischer Effektorzellen der Entzündung), freigesetzt von spezifisch mit Antigen reagierenden T-Zellen
- Stimulation der unreifen Knochenmarkszellen/ Leukozyten

Das hier untersuchte TNF- α gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen. Es ist der Hauptmediator der Wirtsabwehr gegen gramnegative Bakterien und intrazelluläre Erreger. So spielt es eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen *P. falciparum*. Es wird sezerniert von Monozyten/ Makrophagen, von stimulierten T-Zellen (CD4, CD8, $\gamma\delta$), NK-Zellen und Mastzellen.

In **geringer Quantität**

- aktiviert es Monozyten/ Makrophagen zur Zytokinproduktion (IL-1, IL-6, TNF- α),
- reguliert MHC-I hoch, aktiviert Neutrophile und induziert die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen.

Wird TNF- α in **höherer Quantität** produziert, tritt es in die Blutbahn über und hat hormonähnliche Wirkung:

- es wirkt auf Zellen des Hypothalamus und induziert über Prostaglandinsynthese Fieber (endogenes Pyrogen)
- es hemmt die Gerinnung
- es unterdrückt Stammzellen im Knochenmark

- es wirkt auf Hepatozyten und regt die Produktion von Akut-Phase-Proteinen an
- es induziert IL-1 und IL-6 Synthese in Monozyten

In extremer Dosierung

- bewirkt TNF- α metabolische Störungen, z. B. massive Hyperglykämie
- löst intravasale Gerinnung aus
- bewirkt eine Relaxation der glatten Muskulatur mit Blutdruckabfall und Minderdurchblutung des Gewebes
- reduziert die kardiale Kontraktilität

Das zweite untersuchte Zytokin, IFN- γ , gehört vor allem zu den Zytokinen mit immunregulatorischer Wirkung. Es wird vor allem von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sezerniert, aber auch von γ - δ -T-Zellen und NK-Zellen. Es hat stimulierenden Einfluss auf unspezifische Effektorzellen (Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Endothelzellen). Es aktiviert Makrophagen zur Radikal-/ O₂ – Bildung durch direkte Induktion der entsprechenden Enzyme und zählt damit zu den *Makrophagen-aktivierenden Faktoren (MAF)*. Es steigert die Zytotoxizität von NK-Zellen und verstärkt damit die Abtötung intrazellulärer Erreger. Es stimuliert MHC-I und MHC-II-Expression auf vielen Zellen, wodurch die zelluläre und auch die humorale Immunantwort verstärkt werden. Es fördert die Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th1- Zellen, während die Differenzierung zu Th2- Zellen gehemmt wird. IFN- γ ist ein Aktivator der vaskulären Endothelzellen und fördert die Adhäsion der CD4⁺ T-Zellen, ebenso verstärkt es viele Wirkungen von TNF auf die Endothelzellen.

Im Falle einer Infektion mit *P. falciparum* ist IFN- γ zu Beginn der Erkrankung deutlich erhöht. Damit scheint dieses Zytokin essentiell für die Elimination der Parasiten in der Frühphase der Erkrankung zu sein. Vermutlich sind Individuen mit hoher IFN- γ -Antwort in der Lage, die Infektion im Leberstadium, d.h. im präerythrozytären Stadium, zu kontrollieren. Gegen die asexuellen

erythrozytären Formen, die Merozoiten, hat es keinen direkten Effekt. Aber auch hier verstärkt IFN- γ indirekt über die Aktivierung von Makrophagen und Monozyten die Parasitenelimination. Man nimmt an, dass IFN- γ eine wichtige Rolle beim Schutz vor Reinfektionen einnimmt (Luty et al. 1999).

1.5 Malaria in der Schwangerschaft

Erwachsene, die in endemischen Regionen leben, entwickeln selten eine schwere Malaria. Schwangere Frauen hingegen – besonders in der ersten Schwangerschaft (Primigravidae) – bilden eine Ausnahme. Bei ihnen findet man gehäuft hohe Parasitämien und schwere Anämien, hauptsächlich jedoch wird der Fetus bzw. das Neugeborene beeinträchtigt. Infizierte Mütter haben Neugeborene mit niedrigem Geburtsgewicht und einem erhöhtem Risiko während der Perinatalperiode zu versterben. Es wird angenommen, dass für diesen Effekt auf die fetale Entwicklung die große Anzahl der sequestrierten infizierten Erythrozyten auf der maternalen Seite der Plazenta verantwortlich ist.

Schwangere erkranken häufiger als Nicht-Schwangere (45% versus 31%, Mvondo et al. 1992). Als Grund dafür wird eine allgemeine Immunsuppression der Th1- Antwort (proinflammatorisch: IFN- γ , IL-2) in der Schwangerschaft diskutiert. Außerdem gibt es bestimmte Populationen von Parasiten, die die Fähigkeit besitzen, in der Plazenta bevorzugt zu adhären. Diese Parasiten findet man bei Nicht-Schwangeren selten, daher gibt es in der ersten Schwangerschaft noch keine erworbene Immunität dagegen. Somit sind Primigravidae häufiger infiziert als Multigravidae (Ordi et al. 2001, Okoko et al 2003).

Reife erythrozytäre Formen (Trophozoiten und Schizonten) binden an das vaskuläre Endothelium, damit ist eine Sequestrierung in den Gefäßen möglich, was wiederum eine Elimination in der Milz verhindert. Als Rezeptor in der Plazenta wird CSA (Chondroitin-4-Sulfat) angenommen. Auf der Synzytiotrophoblastenoberfläche findet sich das Proteoglykan Thrombomodulin,

das CSA exprimiert. Erfolgt eine Infektion mit Malaria in der Schwangerschaft, beobachtet man eine Sequestration von *P. falciparum* –infizierten Erythrozyten in den intervillösen Räumen der Plazenta. Diese Adhäsion wird vermittelt über die Expression von Oberflächenantigenen, den Parasite-derived variant surface antigens (VSA), über welche die infizierten Erythrozyten an das plazentäre CSA binden.

PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein), eines der bekanntesten parasitären Adhäsionsmoleküle von *P. falciparum*, ist über *var* Gene kodiert. Damit ändert sich die Expression des PfEMP1 ständig (Gatterm et al. 2003). Wenn das Immunsystem nicht schon Kontakt mit einem bestimmten PfEMP1 hatte, kann sich der entsprechende Parasitenklon vermehren. Infizierte Erythrozyten, die an CSA binden, sind selten in nichtschwangeren Erwachsenen – obwohl Thrombomodulin auch im vaskulärem Endothel präsent ist. Der genaue Aufbau des CSA der Plazenta ist nicht bekannt, aber Unterschiede zwischen endotheliale und plazentärem CSA erklären möglicherweise diesen Umstand. Auch ist der Blutfluß im intervillären Raum extrem verlangsamt, was die verstärkte Bindung an CSA hier erklären könnte (Dorman et al. 2002).

Multigravidae besitzen Antikörper, die die Bindung infizierter Erythrozyten an CSA blockieren (Fried et al. 1998). Bei Primigravidae und Männern fehlen diese. Studien über Parasiteninfektionen in der Schwangerschaft zeigten eine höhere Parasitämie bei Primigravidae (30-35% versus 7-15% bei Multigravidae, Fievet et al. 1996), häufigere Plazentainfektionen (50% versus 15%) und häufigere periphere Parasitämien der Mütter (28% versus 13%, Verhoeff et al. 2001). Angaben über Parasitämien im Nabelschnurblut sind kontrovers, von 0% (Fievet et al. 1996) bis 22-50% (Larkin et al. 1991). Es kommt vor, dass eine Mutter im peripheren Blut keine Parasiten aufweist, sich aber eine Infektion in der Plazenta nachweisen lässt. Dabei handelt es sich am ehesten um eine persistierende Infektion, bei der die peripheren Parasiten schon beseitigt wurden, die Parasiten in der Plazenta jedoch noch nicht.

Die Konsequenzen für Neugeborene und Mütter sind je nach Zeitpunkt der Infektion verschieden. Im 1. Trimenon kommt es gehäuft zu Aborten, v. a. bei nichtimmunen Schwangeren. Danach kommt es häufiger zu Frühgeburten bei infizierten als bei nicht infizierten Müttern (Moormann et al. 1999). Mütter, die wenig erworbene Immunität haben, können schwer erkranken, bei ihnen treten gehäuft hohe Parasitämien und schwere Anämien auf (Tobian et al. 2000). Die Prävalenz von Anämie in der Schwangerschaft liegt bei 89% in Malariagebieten versus 29% in nicht endemischen Gebieten. Für das Neugeborene ist die Frühgeburtslichkeit das größte Problem. Das Risiko für niedriges Geburtsgewicht (<2500g) ist 3mal höher in Malariagebieten und 40% der Kinder mit niedrigem Geburtsgewicht seien auf Malaria zurückzuführen und nur 10% auf die Anämie. Damit trägt Malaria direkt und auch indirekt (über Anämie) zu geringen Geburtsgewichten bei (Brabin et Piper 1997). Schätzungsweise 200 000 bis 1 Millionen Fälle von Neugeborenen mit geringem Geburtsgewicht sind pro Jahr auf Malaria in der Schwangerschaft zurückzuführen (das entspricht 8 – 45 Fälle pro 100 Lebendgeburten). Weiterhin gilt eine Infektion der Plazenta zum Zeitpunkt der Geburt als Risikofaktor für Anämie bei den Säuglingen. Auch scheint eine plazentare Infektion der Mutter mit *P. falciparum* einen nachteiligen Effekt auf die künftige Abwehr von Infektionen für den Säugling zu haben. Im Alter von 4 – 18 Monaten waren bei Kindern von Müttern mit Plazentainfektion häufiger Parasitämien nachweisbar (Le Hesran et al. 1997).

1.6 Ziele

Malaria in der Schwangerschaft ist eines der größten Gesundheitsprobleme in Afrika südlich der Sahara. Malaria verursacht vor allem niedriges Geburtsgewicht, Frühgeburtslichkeit und Anämie der Mütter. Neben diesen direkt nachteiligen Effekten sprechen oben beschriebene Ergebnisse für einen Einfluss mütterlicher Plasmodieninfektion auf das fetale Immunsystem. Mütterliche Plasmodien- als auch andere Parasiteninfektionen haben einen Einfluss auf die neonatale Immunantwort und vermutlich auf die Fähigkeit zur

Abwehr von Infektionen in der frühen Kindheit (Le Hesran et al.1997, Ismaili et al 2003).

Es sollte in dieser Studie der Einfluss mütterlicher Plasmodieninfektion während der Schwangerschaft auf die zelluläre Immunantwort von Lymphozyten im Nabelschnurblut untersucht werden. So war es Ziel dieser Arbeit, nach Unterschieden in der Immunantwort Neugeborener malariainfizierter und nicht infizierter Mütter zu suchen. Das Phänomen der plazentaren Malaria mit ihren schädigenden Einflüssen auf das Neugeborene veranlasste, nach dieser Gruppe der Studienteilnehmer gesondert zu schauen. Zum anderen war es interessant zu untersuchen, wie eine erfolgreiche Chemotherapie während der Schwangerschaft die Fähigkeit zur Immunantwort beeinflusste.

Die untersuchten Zellarten wurden gewählt, weil sie zum einen (wie die NK-Zellen und die γ - δ -T-Zellen) der bereits bei Geburt vorhandenen Immunabwehr angehören, zum anderen (wie die $CD4^+$ T-Helferzellen und die $CD8^+$ T-Zellen) mit ihrer Zytokinproduktion den Verlauf der Malaria maßgeblich beeinflussen (Dadoo et al 2002).

Durch Untersuchungen insbesondere der γ - δ -T-Zellen wurde versucht, die Rolle des angeborenen Immunsystems besser zu verstehen. Angeborene Immunmechanismen sind besonders im Kindesalter von großer Bedeutung für die Abwehr von Infektionskrankheiten. Daher hat diese Studie ein spezielles Interesse an dem Einfluss einer *P. falciparum*-Infektion während der Schwangerschaft auf mütterliche und neonatale γ - δ -T-Zell-Aktivierung. Dies sollte am Beispiel der Zytokinproduktion von $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ erfolgen. Es wurden von T-Zellen sezernierte proinflammatorische Zytokine $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ im mütterlichen und Nabelschnurblut gemessen nach unspezifischer Stimulation mit PMA/ Ionomycinin (PMA = phorbol-12-myristate-13-acetat). $TNF-\alpha$ ist notwendig für eine schnelle Eliminierung der Parasiten, während $IFN-\gamma$ assoziiert ist mit Schutz vor Malaria und vor durch Malaria verursachter Anämie. Diese beiden Zytokine werden von den untersuchten Zellarten

sezerniert und lassen einen Schluss auf die Abwehrbereitschaft des Immunsystems im Sinne der proinflammatorischen und protektiven/ regulativen Immunantwort zu.

Fernziel dieser Untersuchungen soll es sein durch ein besseres Verständnis der Immunmechanismen bei der Abwehr der Malaria einen möglichen Schutz in Form eines Impfstoffes zu finden. Dies vor allem für besonders gefährdete Gruppen der Bevölkerung, wie Säuglinge, Kleinkinder und Schwangere: Mit einem wirksamen Schutz für die Schwangeren könnte man den nachteiligen Effekten für die Neugeborenen entgegenwirken.

2 Patienten und Methoden

2.1 Der Studienort

Die Studie wurde im Forschungslabor des Albert-Schweitzer-Krankenhauses in Lambaréné, Gabun, durchgeführt. Gabun liegt im Westen von Zentralafrika und wird im Norden von Kamerun und Äquatorialguinea, im Osten von der Republik Kongo-Brazzaville und im Westen vom Atlantik begrenzt. Das Klima ist tropisch feucht mit einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 80 und 90%. Die durchschnittliche Lufttemperatur schwankt gering um das Jahresmittel von 27°C, die Niederschlagsmenge von etwa 2000 mm pro Jahr verteilt sich hauptsächlich auf die große und kleine Regenzeit von Januar bis Mai bzw. Oktober bis Dezember. Die Vegetation ist von sekundärem Regenwald geprägt (80% der Oberfläche), der zu geringen Teilen gerodet wurde, um das Land für privaten und gewerblichen Ackerbau zu nutzen.

Lambaréné (Provinz Moyen-Ogooué) liegt landeinwärts etwa 180 km südöstlich von Libreville, der Hauptstadt Gabuns. Die Stadt Lambaréné hat ca. 15 000 Einwohner und ist direkt am Fluß Ogooué gelegen, 75 km südlich vom Äquator. Das Albert-Schweitzer-Krankenhaus befindet sich am nördlichen Rand von Lambaréné, nahe am Ogooué. Es umfasst neben dem Forschungslabor

Abteilungen für Innere Medizin, Chirurgie, Pädiatrie, Gynäkologie und Zahnheilkunde.

In Lambaréné und Umgebung, woher wir unsere Studienteilnehmerinnen rekrutierten, wird Malaria ganzjährig übertragen, entsprechend einem hyperendemischen Gebiet. Dabei werden etwa 90% der Malariafälle durch *P. falciparum* verursacht, die restlichen 10% durch *P. malariae* und *P. ovale*. Die Transmission unterliegt saisonalen Schwankungen, wobei sich in der kurzen Regenzeit von Oktober bis Dezember die höchsten Raten finden, während in der langen Regenzeit sowie in den Trockenzeiten eine geringere Transmission zu verzeichnen ist. Die entomologische Inokulationsrate beträgt etwa 50 infektiöse Stiche pro Jahr (Wildling et al. 1995, Sylla et al. 2000).

2.2 Die Studienteilnehmer

In dem Zeitraum Mai 2002 bis April 2003 wurden zunächst 248 Frauen mit ihren Neugeborenen in diese vergleichende Studie aufgenommen. Wichtigstes Aufnahmekriterium war die Anamnese und damit der Aufenthalt der Studienteilnehmerin in einem hyperendemischen Malariagebiet während der Schwangerschaft. Die Frauen kamen zur Entbindung in das Albert-Schweitzer Hospital. Sie wurden über das Studienziel, das Vorgehen bei Probenentnahme und die Risiken aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung war Voraussetzung zur Aufnahme in die Studie.

Es wurde eine Anamnese bezüglich der Erkrankungen und Komplikationen während der Schwangerschaft, aktueller Beschwerden, der Anzahl vorheriger Schwangerschaften und zuvor geborener Kinder, der Blutgruppe und des Wohnortes (hyperendemisch für Malaria?) erstellt. Dabei gab die oft gut dokumentierte Schwangerschaftsvorsorge der Entbindungsstation zuverlässige Auskunft. Es wurde peripher venöses Blut der Mütter, Blut aus der Plazenta und Blut aus den Nabelschnurvenen des Neugeborenen entnommen. Frauen, bei denen eine abdominale Schnittentbindung notwendig war, sowie Totgeburten

wurden nicht in die Studie aufgenommen. Weiteres Auschlusskriterium stellten dokumentierte andere Infektionskrankheiten wie beispielsweise ein positiver Treponemen-Test während der Schwangerschaft dar.

Nachträglich ausgeschlossen wurde jeder zweifelhafte, nicht eindeutig dokumentierte Malariabefund während der Schwangerschaft. Mit den Kontrollmethoden PCR und HRP II-ELISA (siehe Abschnitt 2.5.) im Labor in Tübingen an den dorthin transportierten Proben erfolgte ebenfalls ein Ausschluss aus der Studie, falls die Ergebnisse dieser Tests negativ waren.

2.2.1 Nachverfolgung

Als Therapie für die erkrankten Mütter, die in jedem Fall ihre Säuglinge stillten, wurde die 7-tägige Chinintherapie gewählt, da sie mit den geringsten Risiken für das Neugeborene verbunden ist. Entsprechend der Dosierung von 30 mg/kg Körpergewicht/ Tag wurden die Mütter mit 3 Gaben pro Tag behandelt. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 60 kg entspricht das 3 x 2 Tabletten Chininsulfat (à 300 mg). Die Patientinnen wurden über die möglichen Nebenwirkungen aufgeklärt und dazu angehalten, das Medikament über den Zeitraum einer Woche regelmäßig einzunehmen.

2.3 Untersuchungen und Versuche dieser Studie

Im Zeitraum von Januar 2002 bis Mai 2003 wurden die Versuche und Untersuchungen dieser Studie durchgeführt. Die zur Auswertung der Zytokinproduktion in der Studie verbliebenen 27 Mütter waren im Durchschnitt 24,3 Jahre alt (die Altersspanne lag zwischen 15 und 44 Jahren). Es wurden direkt nach der Geburt des Kindes ca. 15 ml Blut aus den Nabelschnurvenen entnommen, sowie eine Probe von ca. 2 ml aus dem plazentaren Blut der mütterlichen Seite. Dazu wurde das Plazentagewebe auf der mütterlichen Seite leicht eingeschnitten, um Blut aus den intervillösen Räumen zu gewinnen. Der Mutter wurden ebenfalls ca. 15 ml peripher venöses Blut entnommen. Sämtliche Proben wurden in Heparin-Röhrchen gewonnen (siehe Materialien).

Diese Proben wurden sowohl zur Malariadiagnostik als auch zu den zytologischen Versuchen verwendet, bzw. ein kleinerer Anteil zu Kontrolluntersuchungen wie PCR und ELISA bei -80°C gefroren zum späteren Versand in das Tropenmedizinische Institut in Tübingen.

2.4 Diagnostik

2.4.1 Malariadiagnostik und hämatologische Diagnostik

Die Malariadiagnostik wurde qualitativ und quantitativ aus dem Dicken Tropfen vorgenommen. Dieser wurde nach folgender Methode angefertigt (Kremsner et al. 1988):

10 µl des entnommenen Heparinblutes (Mutter, Plazenta, Kind) wurden mit einer Pipette aufgenommen und auf einem Objektträger unter Benutzung einer Schablone auf einer Fläche von 10 x 18 mm gleichmäßig ausgestrichen. Danach wurde der Objektträger in horizontaler Stellung im Trockenschrank bei 45°C getrocknet und dann mit Giemsalösung (regelmäßig alle 6 Stunden frisch hergestellt aus konzentrierter Giemsalösung 1:5 verdünnt mit Triphosphatpuffer pH 7,2) 20 min gefärbt. Nach Beendigung der Färbezeit wurden die Objektträger unter fließendem Wasser vorsichtig gewaschen und wieder getrocknet.

Durch ein Lichtmikroskop wurden bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Tropfen Immersionsöl mindestens 100 gut verteilte Gesichtsfelder betrachtet um einen Dicken Tropfen als negativ zu bezeichnen bzw. die asexuellen und sexuellen Parasiten ausgezählt. Über einen für das Mikroskop spezifisch ermittelten Umrechnungsfaktor wurde dann die Parasitämie berechnet.

2.4.2 Weitere diagnostische Analysen

Die hämatologischen Laborwerte (Leukozyten-, Thrombozytenzahl, Hämoglobinkonzentration sowie Hämatokrit) von Mutter und Neugeborenem wurden per QBC-Methode (Quantified Buffy Coat) bestimmt.

2.5 Wissenschaftliche Analysen

2.5.1 Isolation von PBMC

Zunächst wurden kleine Mengen der Blutproben von Mutter, Plazenta und Nabelschnur als Vollblut für spätere Kontrolluntersuchungen (PCR/ ELISA) bei -80°C eingefroren. Für die Isolation von Lympho- und Monozyten, den sogenannten PBMC (peripheral blood mononuclear cells) wurden ca. 15 ml des steril gewonnenen Blutes jeweils von Mutter und vom Neugeborenen, antikoaguliert durch Heparin, verwendet. Dies wurde bei 250 g für 10 min zentrifugiert, um Plasma zu gewinnen und für andere Untersuchungen einzufrieren. Alle weiteren Untersuchungen erfolgten auf der Arbeitsbank mit sterilem Laminarflow. Das verbleibende Pellet wurde mit dem restlichen Plasma vermischt, 1:1 mit PBS (Phosphat Buffered Saline) verdünnt. Zuvor wurden Leukosep Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Paque gefüllt und 3 min bei 250 g zentrifugiert. Damit befindet sich das Ficoll-Paque unterhalb der Trennscheibe. Die Leukosep Röhrchen wurden mit 25 ml des Gemisches oberhalb der Trennscheibe überschichtet. Mit dem nachfolgenden 20-minütigen Zentrifugieren bei 400g ohne Bremse (Raumtemperatur) wurde das Blut-PBS-Gemisch aufgetrennt in einen aus Plasma und PBS bestehendem Überstand, an dessen unterem Ende – über der Trennscheibe – sich eine dünne Schicht der PBMC befindet. Der Überstand aus Plasma und PBS wurden vorsichtig abpipettiert und verworfen. Die mononukleären weißen Blutzellen in der darunter liegenden Schicht wurden sorgfältig herauspipettiert und in ein 15 ml Falcontube mit konisch zulaufendem Boden überführt. Um die Zellen von dem noch verbliebenen Ficoll-Paque zu reinigen, wurde zweimal gewaschen. Dazu

wurde das Röhrchen mit den aufgenommenen PBMC bis auf 15 ml mit PBS aufgefüllt, bei 250 g mit Bremse 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet resuspendiert und dieser Vorgang wiederholt. (1. und 2. Waschgang). Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet sorgfältig resuspendiert und in 10 ml PBS aufgenommen um die Zellen zu zählen. Dazu wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß 90 µl Trypanblau pipettiert, dazu 10 µl der gut durchmischten Zellsuspension. Wiederum gut durchmischt, wurden davon 10 µl in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zellen in den 4 Großkästchen ausgezählt. Diese Summe wurde durch 4 geteilt. Gleichzeitig wurde ein Austrich der Zellsuspension nach Giemsa gefärbt, um die Prozentzahl der PBMC zu bestimmen. Vor allem bei der Zelltrennung des Nabelschnurblutes entstanden Verunreinigungen des Pellets mit Retikulozyten (bei der PBMC Trennung in der gleichen Schicht wie die weißen Blutzellen zu finden, da kernhaltig). Mit dem entsprechenden Faktor wurde der Zählwert der Neubauerkammer korrigiert, um vergleichbare PBMC-Zahlen für die nachfolgende Stimulation zu erhalten. Diese Zahl, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 10^5 , ergibt die Zellmenge in der 10 ml Suspension.

Es wurde von den 10 ml Zellsuspensionen die entsprechenden Volumen berechnet, so dass ca. $12,5 \times 10^6$ Zellen für die folgenden Stimulationen, gewonnen wurden. Übrige Zellen wurden für weitere Versuche (andere Stimulationsarten) in entsprechenden Mengen weiterverarbeitet.

Die Zellen in Suspension wurden wiederum in 15 ml PP Röhrchen gegeben und nochmals zentrifugiert, um sie vom PBS zu trennen. Das nach Abpipettieren des Überstandes verbleibende Pellet entspricht der gewünschten Zellmenge. Es wurde mit auf 37°C im Wasserbad erwärmten UC-Medium resuspendiert und auf 10ml aufgefüllt – das entspricht einer Konzentration von $1,25 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium. Zu dem UC-Medium wurden zuvor L-Glutamin (2 mM), 2-Mercaptoethanol (3,5 µl/l) und Gentamycinsulfat (170 mg/l) gegeben, anschließend wurde es steril filtriert bis zum Gebrauch für höchstens eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt.

2.5.2 Kultur der PBMC mit Stimulanzen

Die Zellkultur mit den Stimulanzen fand in sterilen 50 ml Gewebekulturflaschen mit Filter statt. Als Stimulanzen wurden verwendet:

PMA (phorbol 12-myristate-13-acetat) in einer Konzentration von 10 ng/ml in der Kultur.

Ionomycin in einer Konzentration von 1,25 μ M in der Kultur

Brefeldin A in einer Konzentration von 10 μ g/ml in der Kultur

Zur *in vitro* Aktivierung der peripheren weißen Blutzellen wurde PMA (phorbol-12-myristate-13-acetat) und Ionomycin verwendet. Diese beiden Stimulanzen sind polyklonale Aktivatoren, die die Produktion von Zytokinen in Lymphozyten über intrazelluläre Signalkaskaden induzieren. Die Zytokine werden im Endoplasmatischen Retikulum sezerniert und von dort zum Golgi-Apparat transportiert. Der Golgi-Apparat ist u. a. in den Zellen der Abwehr dafür verantwortlich, die Granula mit den enthaltenen Zytokinen durch Exozytose auszuschleusen.

Die verwendeten Stimulantien verändern das Profil der produzierten Zytokine der einzelnen Zellarten nicht, sondern verstärken lediglich die Gen-Expression der schon exprimierten Gene. Damit wird der Nachweis der Zytokine mittels intrazellulärer Färbung erleichtert.

Brefeldin A ist ein Inhibitor des Proteintransportes. Es hemmt den Transport der produzierten Zytokine vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. So bewirkt Brefeldin A durch Block dieses Transportweges eine Akkumulation der Zytokine im Interzellularraum und damit bei der späteren FACS-Analyse

(intrazelluläre Flußzytometrie) ein stärkeres Signal beim Registrieren der zytokinproduzierenden Zellen.

Entsprechende Aliquots der Stimulanzen wurden bereits in Tübingen aus der jeweiligen „stock solution“ hergestellt – im Fall von PMA und Ionomycin in DMSO (Dimethyl Sulfoxid) aufgelöst und in RPMI-Medium verdünnt, Brefeldin A wurde mit 95%igem sterilfiltriertem Alkohol gelöst, bei Gebrauch ebenfalls mit RPMI-Medium 1:10 verdünnt. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert und direkt vor Zugabe zur Kultur aufgetaut. Die Zellkulturflaschen wurden inkubiert bei 37°C, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ Gehalt. Nach 4 Stunden wurden die Zellkulturflaschen für 5 min auf Eis gestellt zum Unterbrechen der Stimulation.

2.5.3 Ernten und Fixieren der Zellen

Nach abgeschlossener Stimulation wurden die Zellen gründlich resuspendiert und in 15 ml Falcontubes gegeben, die Flaschen mit 5 ml PBS nachgespült, dieses PBS dazugegeben und bei 250 g mit Bremse für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 1 ml PBS aufsuspendiert, zum Waschen auf 15 ml mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert siehe oben.

Zum Fixieren wurde die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert und danach 2 ml 4%iges Formaldehyd dazugegeben (jeweils jeden Tag frisch hergestellt aus 37%igem Formaldehyd mit der entsprechenden Menge PBS verdünnt). Die Zellen wurden bei Raumtemperatur 20 min fixiert. Danach durch Auffüllen mit PBS auf 15 ml und Zentrifugation siehe oben 2 x gewaschen. Zur Aufbewahrung bis zum Versand nach Tübingen zur FACS-Analyse wurden die Zellen in 10 ml HBSS (Hanks balanced salt solution) im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. HBSS wurde auf folgende Weise hergestellt: In 500 ml HBSS wurden 1,5 g BSA (Bovine serum albumin, entspricht einer Konzentration von 0,3%) und 0,5 g Natriumazid (entspricht einer Konzentration von 0,1%) gelöst, danach steril filtriert.

2.5.4 Intrazelluläre Zytokinmessung mittels Durchflußzytometrie (FACS)

Wir entschieden uns zur Analyse der Zytokine mittels der Zytometrie. Mit dieser Methode können Analysen an gemischten Zellpopulationen vorgenommen werden, so dass Verluste durch Zellseparation vermieden werden. Dies kam uns insbesondere zugute bei der Untersuchung kleinerer Zellpopulationen, wie der γ - δ -T-Zellen. Weiterhin war es möglich, simultan nach verschiedenen Zellarten und verschiedenen Effekten zu schauen, und im Verlauf zu entscheiden, was als signifikanter bzw. interessanter Trend genauer untersucht werden sollte. So sollte eine Aussage über die Produktion ausgewählter Zytokine der einzelnen Lymphozytenpopulationen getroffen werden, um mögliche Tendenzen der Reaktion des Neugeborenen Immunsystem, abhängig von der Malariainfektion der Mutter in der Schwangerschaft, zu erfassen.

Prinzipiell verläuft die Facs-Analyse nach folgendem Schema:

- Stimulieren und Ernten der Zellen
- Fixieren bis zur tatsächlichen Analyse, um die strukturelle Integrität der Zellen aufrecht zu erhalten – in diesem Falle mit Paraformaldehyd.
- Permeabilisierung für intrazelluläre Färbung:
Um intrazelluläre Antigene zu entdecken, müssen die Zellen vorerst für die fluorchrome-konjugierten Antikörper permeabel gemacht werden, dazu wird Saponin benutzt.
- Anfärben der Oberflächen-Antigene und der intrazellulären Zytokine der PBMC bzw. CBMC (Zellen werden mit fluorchrom-konjugierten Antikörpern inkubiert)

Die Fixierten Zellen wurden in Tübingen mit PBS gewaschen (s. o.). Danach wurden sie mit Saponin (0,1%) permeabilisiert. Dazu wurde das Pellet nach Zentrifugation mit 50 μ l Saponin-Puffer-Antikörper-Gemisch resuspendiert und für 25 min bei Raumtemperatur im Dunkel inkubiert. Es wurde 4fach gefärbt und Eigenschaften von bis zu 2×10^5 Zellen im FACS Calibur flow cytometer

untersucht. Die Zielbereiche (Gates) wurden entsprechend den durch Kontrollen (Isotyp-Antikörper) gewonnenen Profilen gesetzt. Die Daten wurden mit CellQuest Software analysiert.

Folgende monoklonale Antikörper (mAb – monoclonal antibodies) und Reagenzien wurden verwendet: PerCP-anti-CD3 mAb, PerCP-anti-CD4 mAb, PerCP-anti-CD8 mAb, APC-anti-TCR $\gamma\delta$ mAb, APC-anti-CD94 mAb sowie PE-anti-TNF- α mAb und FITC-anti-IFN- γ mAb. Isotypkontrollen wurden entsprechend verwendet. Aus technischen Gründen wurde der konventionelle NK-Zell-Oberflächenmarker CD56 durch CD94 in der Population der CD3⁻ Zellen ersetzt.

Für jede Zellart wurden nach Unterschieden in der Zytokinproduktion zwischen den Gruppen 1. der nicht infizierten, 2. der während der Schwangerschaft infizierten und therapierten und 3. den Plazenta-infizierten bei Geburt gesucht – jeweils für die PBMC der Mutter und die CBMC des Neugeborenen.

2.5.5 HRP II-Antigen-ELISA

Der kommerziell erwerbliche Kit „Malaria Antigen CELISA“ wurde für die Untersuchung auf *P. falciparum* histidin-rich proteinII (PfHRP II) der Proben von Müttern und Neugeborenen verwendet entsprechend den Anweisungen der Hersteller. Hierbei ging es darum, eventuell mikroskopisch nicht erkannte Plasmodieninfektionen mit dieser Methode zur Untersuchung auf *P. falciparum* -HRP II-Antigenämie zu entdecken.

2.5.6 PCR-Analyse auf *P. falciparum* DNA

Von 200 μ l Erythrozytenkonzentrat der Proben von Müttern und Neugeborenen wurde DNA mittels eines kommerziell erwerblichen Kits (Qiagen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufbereitet. Die PCR wurde als Kontrolle der

mikroskopisch gestellten Diagnosen durch Untersuchung auf für *P. falciparum* kodierende DNA durchgeführt.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms Statview vorgenommen.

Es wurden nichtparametrische Tests verwendet, da nicht von einer Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen werden konnte.

U-Test nach Mann-Whitney

Der Mann-Whitney-U-Test dient dem Vergleich von ungepaarten, nicht normalverteilten, stetigen Variablen in zwei Gruppen. Er wurde verwendet, um die quantitativen Ergebnisse der Zytokinproduktion der jeweiligen Zellart zwischen Müttern und Neugeborenen, zwischen jeweils zwei Gruppen entsprechend des Infektionsstatus bezüglich der Malaria und zwischen Multi- und Primipara zu vergleichen. $p < 0,05$ galt als signifikant.

Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test dient wie der Mann-Whitney-U-Test dem Vergleich von ungepaarten, nicht normal verteilten, stetigen Variablen – allerdings in mehr als zwei Gruppen. Er wurde für den quantitativen Vergleich der Zytokinproduktion zwischen den drei unterschiedlichen Gruppen entsprechend des Infektionstatus verwendet. $p < 0,05$ galt als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Festlegung des Infektionsstatus

Mütter und Neugeborene wurden in Gruppen eingeteilt nach Vorliegen oder Abwesenheit einer plazentaren Infektion mit *P. falciparum* zum Zeitpunkt der Geburt und nach dokumentiertem Nachweis einer therapierten mütterlichen Malariainfektion während der Schwangerschaft. Dabei wurde die Gruppeneinteilung folgendermaßen definiert:

- Negativ: (neg) keine plazentare Infektion bei Geburt und kein Hinweis auf Malaria in der Schwangerschaft
- Infiziert: (inf) Plazentare Infektion mit *P. falciparum*, nachgewiesen bei Geburt, unabhängig von klinischer Anamnese während der Schwangerschaft
- Therapiert: (ther) keine plazentare oder periphere Infektion bei Geburt aber dokumentierter Nachweis einer behandelten Malaria in der Schwangerschaft

Es wurden die auswertbaren klinischen Daten von 213 Frauen mit ihren dazugehörigen Neugeborenen erfasst. Sie wurden nach Anzahl der Schwangerschaften (Primiparae/ Multiparae) und nach Infektion mit *P. falciparum* während der Schwangerschaft bzw. zum Zeitpunkt der Geburt den Gruppen (s. o.) zugeteilt.

Tabelle 1

Anzahl der zur Auswertung der klinischen Daten in die Studie aufgenommenen Mütter

Gruppe	Multiparae	Primiparae
Negativ	102	52
Infiziert	22	25
Therapiert	8	4
gesamt	132	81

Des Weiteren wurden insgesamt 68 Stimulationen von PBMC/ CBMC durchgeführt. In Tabelle 2 werden diese aufgeschlüsselt:

Tabelle 2

Anzahl der auswertbaren durchgeführten Zellstimulationen:

Gruppe	Mutter	Nabelschnur
Negativ	20	20
Infiziert	9	9
Therapiert	5	5
gesamt	34	34

Frauen, die über eine Malaria während der Schwangerschaft berichteten, deren Schwangerschaftsvorsorge-Dokumentation aber keinen zuverlässigen Nachweis betreffs Diagnose und Therapie enthielt, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Konfirmation der mikroskopisch gestellten Diagnose der *P. falciparum* - Infektion durch Nachweis von Plasmodium-Antigen und Plasmodien-DNA:

Alle mütterlichen Blut- und Plazentaprobe, die im mikroskopischen Befund eine *P. falciparum* -Infektion zeigten, enthielten sowohl HRP II Antigen als auch Parasiten-DNA. In den Nabelschnurblutproben wurde in keinem einzigen Fall HRP II oder Parasiten-DNA nachgewiesen. In 4 Fällen wurde im peripheren Blut von Müttern, die sowohl im mikroskopischen als auch im HRP II ELISA als negativ eingestuft waren, Plasmodien-DNA gefunden. Damit wurden die Daten dieser 4 Mütter und der dazugehörigen Neugeborenen, die nicht eindeutig als „negativ“ gelten konnten, aus der Auswertung ausgeschlossen.

P. falciparum-HRPII-Antigenämie wurde nachgewiesen mit ELISA, der Nachweis von für *P. falciparum* kodierende DNA erfolgte mit PCR (s. o.).

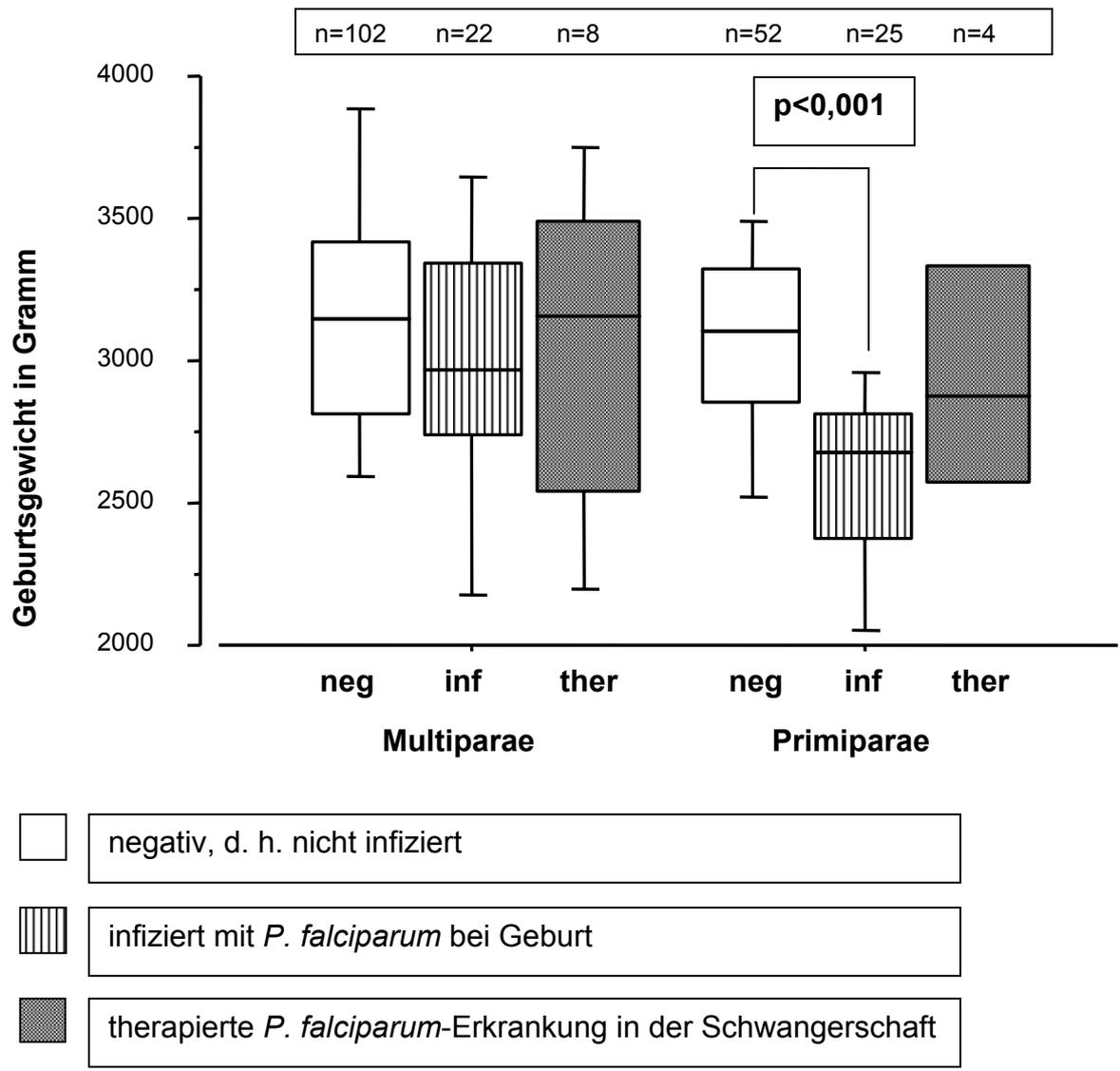
3.2 Vergleich klinischer Daten in den Gruppen

Malaria in der Schwangerschaft wird verantwortlich gemacht für Frühgeburtlichkeit, geringes Geburtsgewicht, Anämie der Mutter vor allem während der 1. Schwangerschaft, sog. Primigravidae (Menendez et al.2000, Dorman et al. 2002).

Somit folgt hier ein Vergleich in Bezug auf diese klinischen Daten. Dabei wurden die Daten aller in die Studie aufgenommenen Frauen verglichen – unabhängig davon, ob die Proben für die immunologischen Stimulationen verwendet wurden. Die Gruppe der Multiparae umfasste 132 Frauen, die Gruppe der Primiparae 81 Frauen jeweils mit ihren Neugeborenen.

Diagramm 1

Geburtsgewicht in Abhängigkeit vom Infektionsstatus für Multi- und Primiparae
 Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)



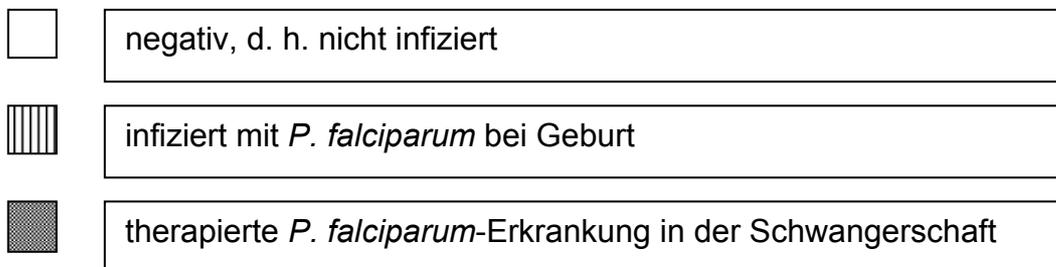
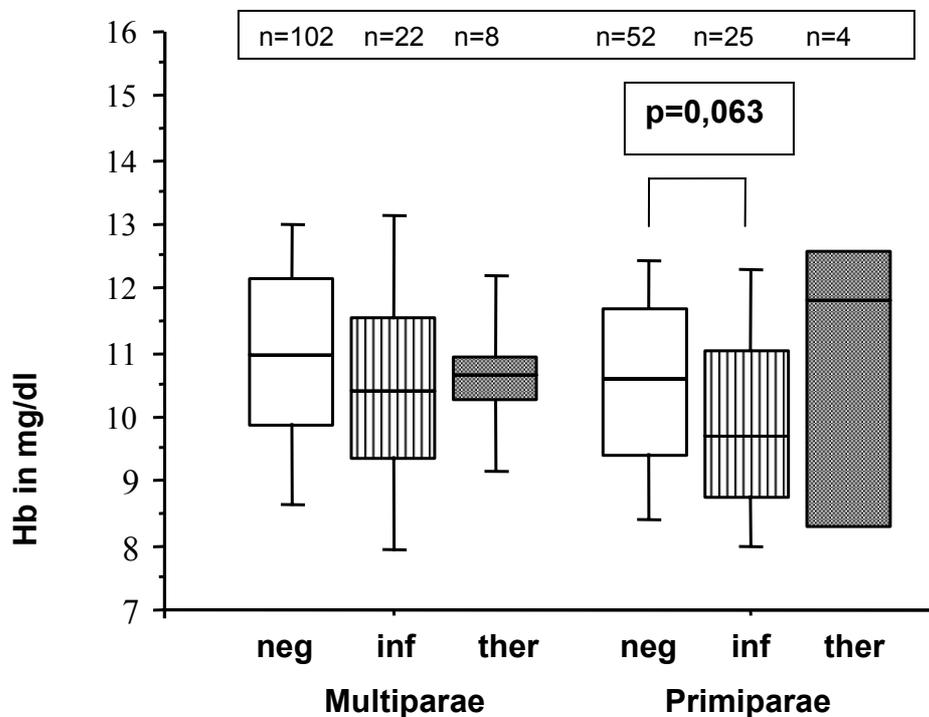
Für Primiparae ist ein signifikanter Unterschied des Geburtsgewichtes zwischen der Gruppe der nicht infizierten Mütter („neg“) gegenüber der Gruppe mit plazentarer *P. falciparum* -Infektion („inf“) zu verzeichnen ($p < 0,001$). Das durchschnittliche Geburtsgewicht in der Gruppe der nicht infizierten Primiparae betrug 3045g, in der Gruppe mit plazentarer Malaria („inf“) 2610 g. Ein

reduziertes Geburtsgewicht bei plazerter Malariainfektion ist auch bei den Multiparae festzustellen, jedoch ist der Unterschied gegenüber nicht infizierten Müttern nicht signifikant ($p=0,19$).

Diagramm 2

Hämoglobinwert in Abhängigkeit vom Infektionsstatus für Multi- und Primiparae

Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)



Hier ein Vergleich der Hämoglobin-Konzentrationen im mütterlichen Blut nach Geburt. Es fällt für die Primiparae ein geringerer Durchschnittswert der Gruppe.

mit plazentarer Malaria „inf“ (9,85 g/dl) gegenüber der Gruppe nicht infizierter Mütter „neg“ (10,6 g/dl) auf. Der Unterschied ist mit $p=0,063$ als nicht-signifikanter Trend zu betrachten. Für Multiparae ist der Wert in der Gruppe mit plazentarer Malaria „inf“ ebenfalls der niedrigste, jedoch nicht signifikant. Insgesamt entsprechen diese Ergebnisse früheren Studien, die zeigten, dass Primiparae von einer Parasiteninfektion während der Schwangerschaft schwerer betroffen sind mit entsprechenden schädigenden Einflüssen auf Mutter und Kind (Verhoff et al. 1997, Okoko et al. 2003).

3.3 Zytokinmuster der γ - δ -T-Zellen und der NK-Zellen ($CD94^+$ $CD3^-$ Zellen) nach Stimulation in PBMC/ CBMC mit PMA & Ionomycin

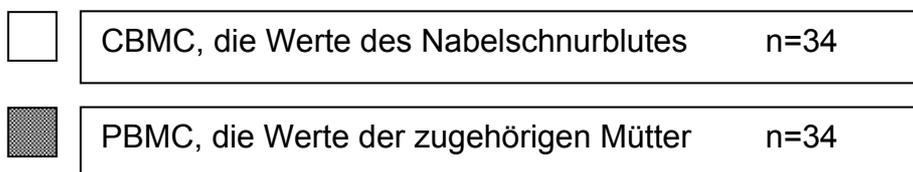
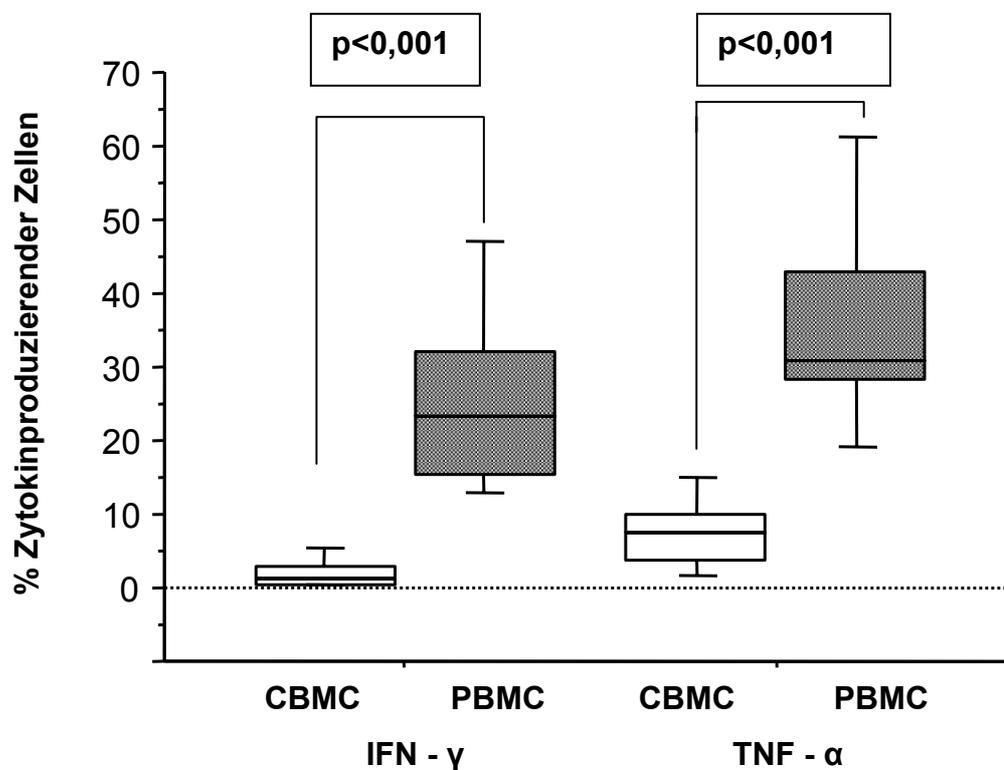
3.3.1 Vergleich der Zytokinproduktion zwischen Müttern (PBMC) und Neugeborenen (CBMC)

Im Nabelschnurblut ist die pro-inflammatorische Zytokinaktivität gegenüber den entsprechenden Lymphozytenpopulationen im peripher venösen Blut Erwachsener deutlich vermindert. Für $CD4^+$, $CD8^+$ und NK-Zellen ist dieser Umstand bereits bekannt (Krampera et al. 2000) und konnte in dieser Studie - wie unten beschrieben - bestätigt werden. Mit den vorliegenden Daten kann man diese Aussage auf die γ - δ -T-Zellen im Nabelschnurblut im Vergleich zum peripher venösen Blut Erwachsener ausdehnen.

Diagramm 3

Vergleich proinflammatorischer Zytokinaktivität der γ - δ -T-Zellen in PBMC von Müttern bzw. in CBMC von Neugeborenen nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin

Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)

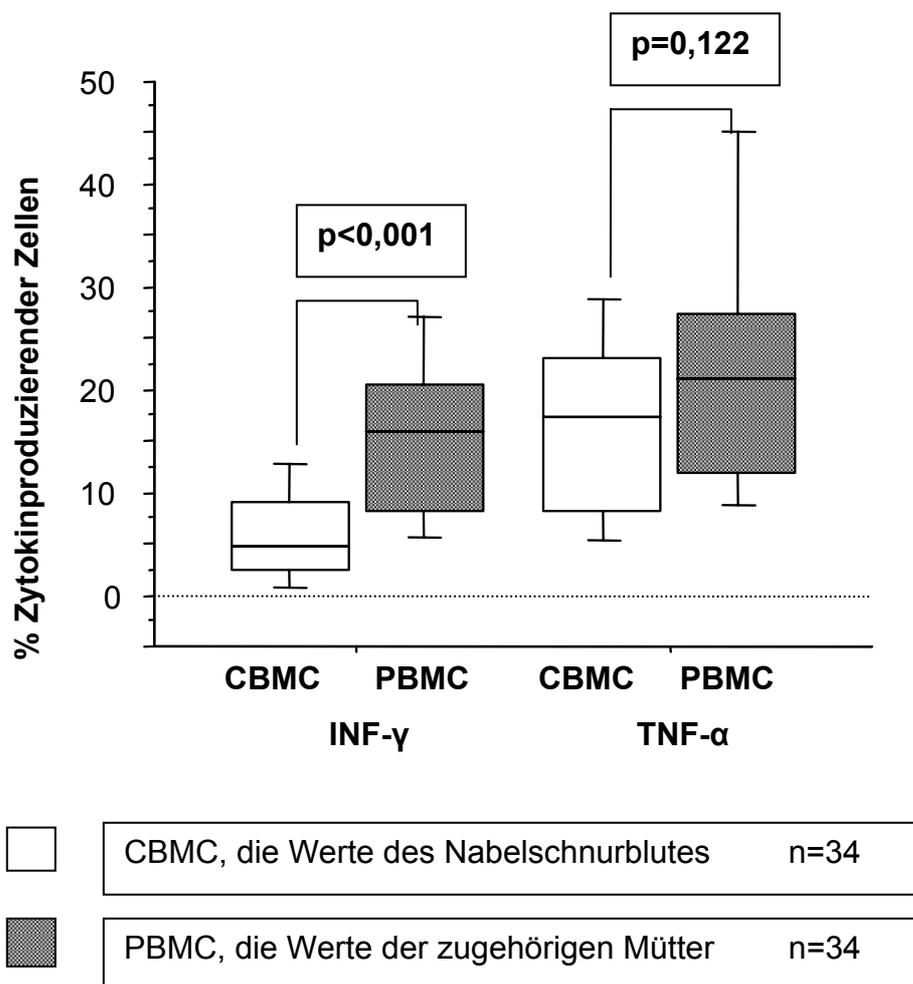


Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Zytokinproduktion sowohl für IFN- γ als auch für TNF- α zwischen Müttern und Neugeborenen ($p < 0,001$ in beiden Fällen).

Diagramm 4

Vergleich proinflammatorischer Zytokinaktivität der NK-Zellen in PBMC von Müttern bzw. in CBMC von Neugeborenen nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin

Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)

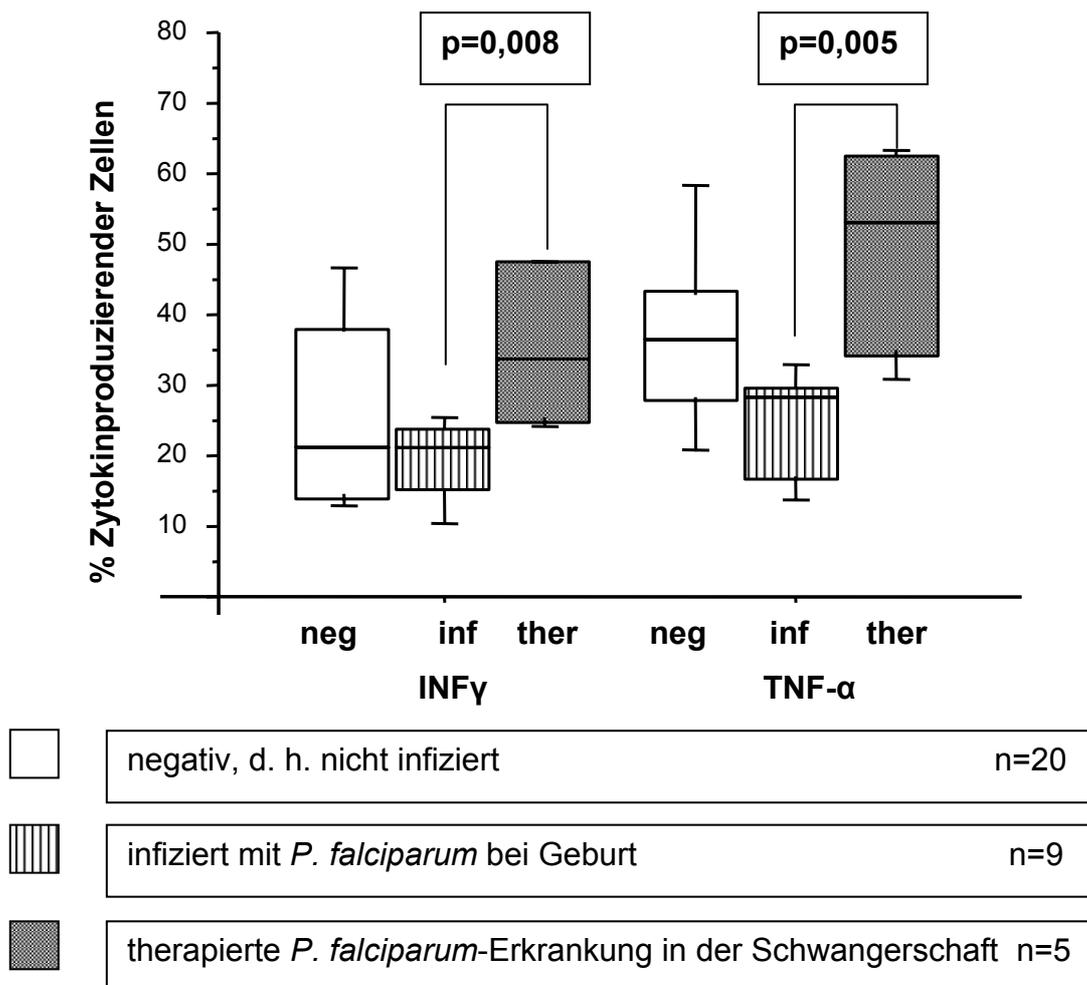


Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Zytokinproduktion für INF- γ ($p < 0,001$) der Mütter gegenüber den Neugeborenen, für TNF- α ist der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,122$).

3.3.2 Vergleich der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion der Zellen des angeborenen Immunsystems zwischen den Gruppen entsprechend Plasmodieninfektionen während der Schwangerschaft im mütterlichen peripheren venösen Blut

Diagramm 5: γ - δ -T-Zellen PBMC

Vergleich proinflammatorischer Zytokinaktivität nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin der γ - δ -T-Zellen in PBMC von Müttern unter Berücksichtigung einer Plasmodieninfektion
 Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)

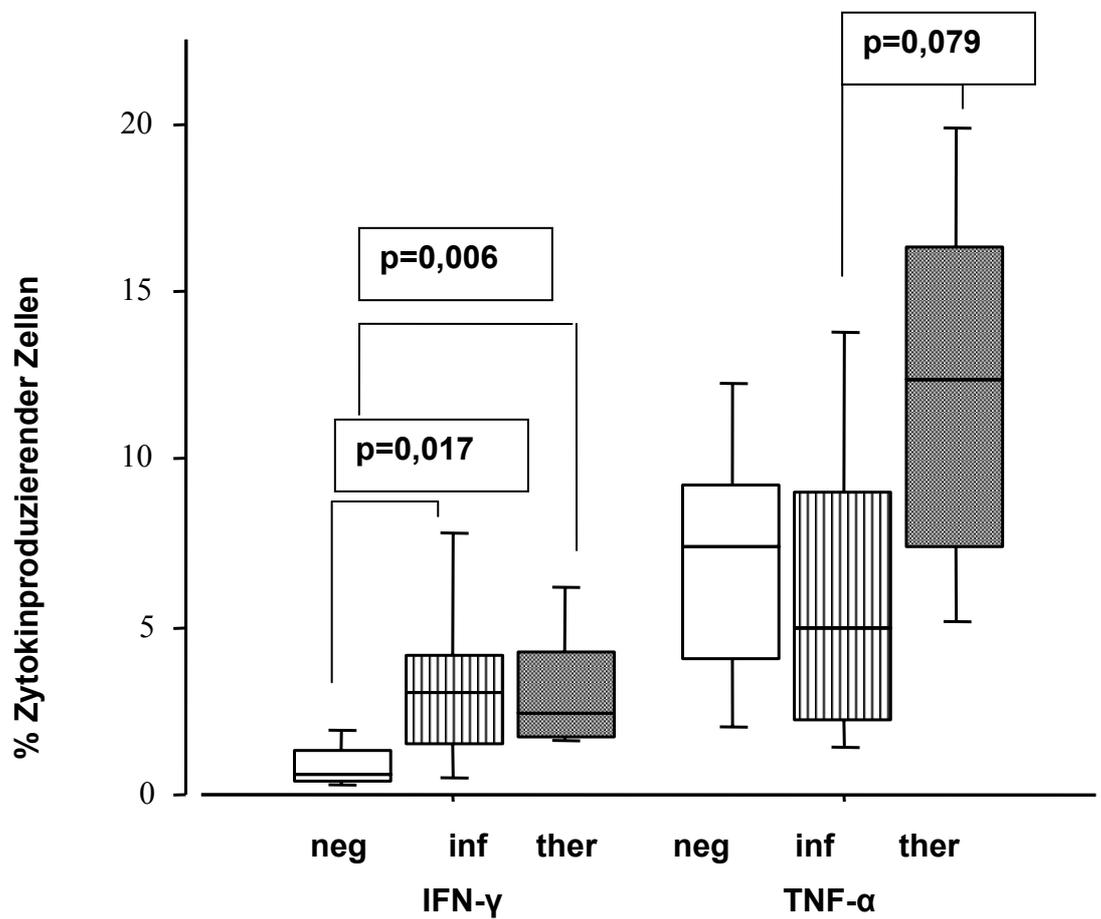


Für beide Zytokine zeigt sich eine signifikant höhere Zytokinproduktion in der Gruppe mit therapierter Malaria-Episode während der Schwangerschaft „ther“ gegenüber der Gruppe mit plazentarer *P. falciparum*-Infektion bei Geburt „inf“.

Diagramm 6: γ - δ -T-Zellen CBMC

Vergleich proinflammatorischer Zytokinaktivität nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin der γ - δ -T-Zellen in CBMC unter Berücksichtigung einer Plasmodieninfektion

Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)



□	negativ, d. h. nicht infiziert	n=20
▨	infiziert mit <i>P. falciparum</i> bei Geburt	n=9
▩	therapierte <i>P. falciparum</i> -Erkrankung in der Schwangerschaft	n=5

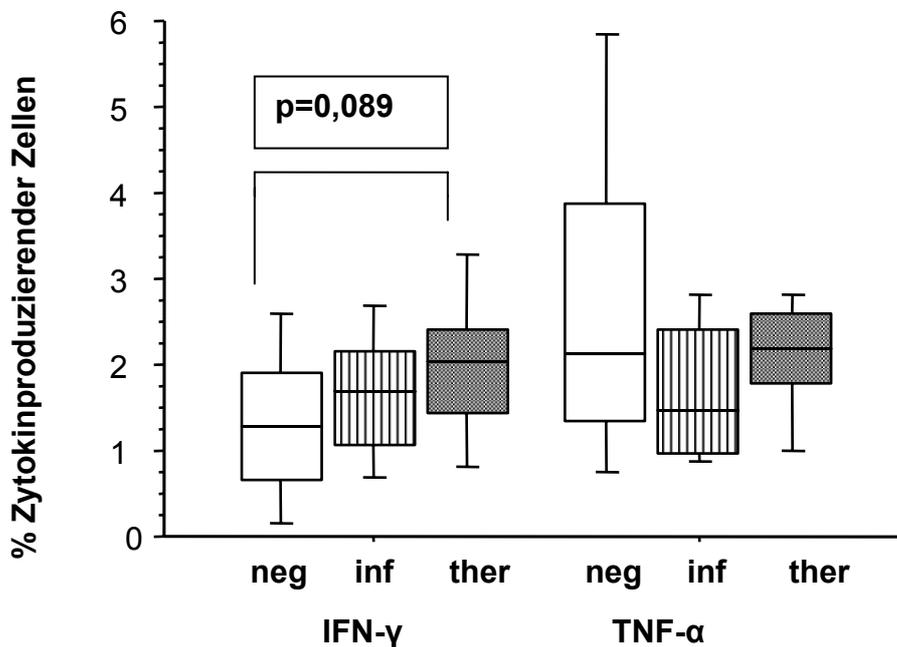
Im Nabelschnurblut (CBMC) der Neugeborenen wurde für IFN- γ eine signifikant höhere Zytokinaktivität der Kinder bei Geburt infizierter Mütter „inf“ und der therapierten Gruppe „ther“ gegenüber der negativen Gruppe „neg“ verzeichnet ($p=0.017$ / $p=0.006$). Für TNF- α lässt sich ein nicht-signifikanter Trend nachweisen ($p=0,079$) in Richtung höherer Zytokinlevel in der therapierten Gruppe verglichen mit der bei Geburt infizierten Gruppe.

Diagramme 7/ 8

Vergleich proinflammatorischer Zytokinaktivität nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin der NK-Zellen in PBMC (7) bzw. CBMC (8) unter Berücksichtigung einer Plasmodieninfektion

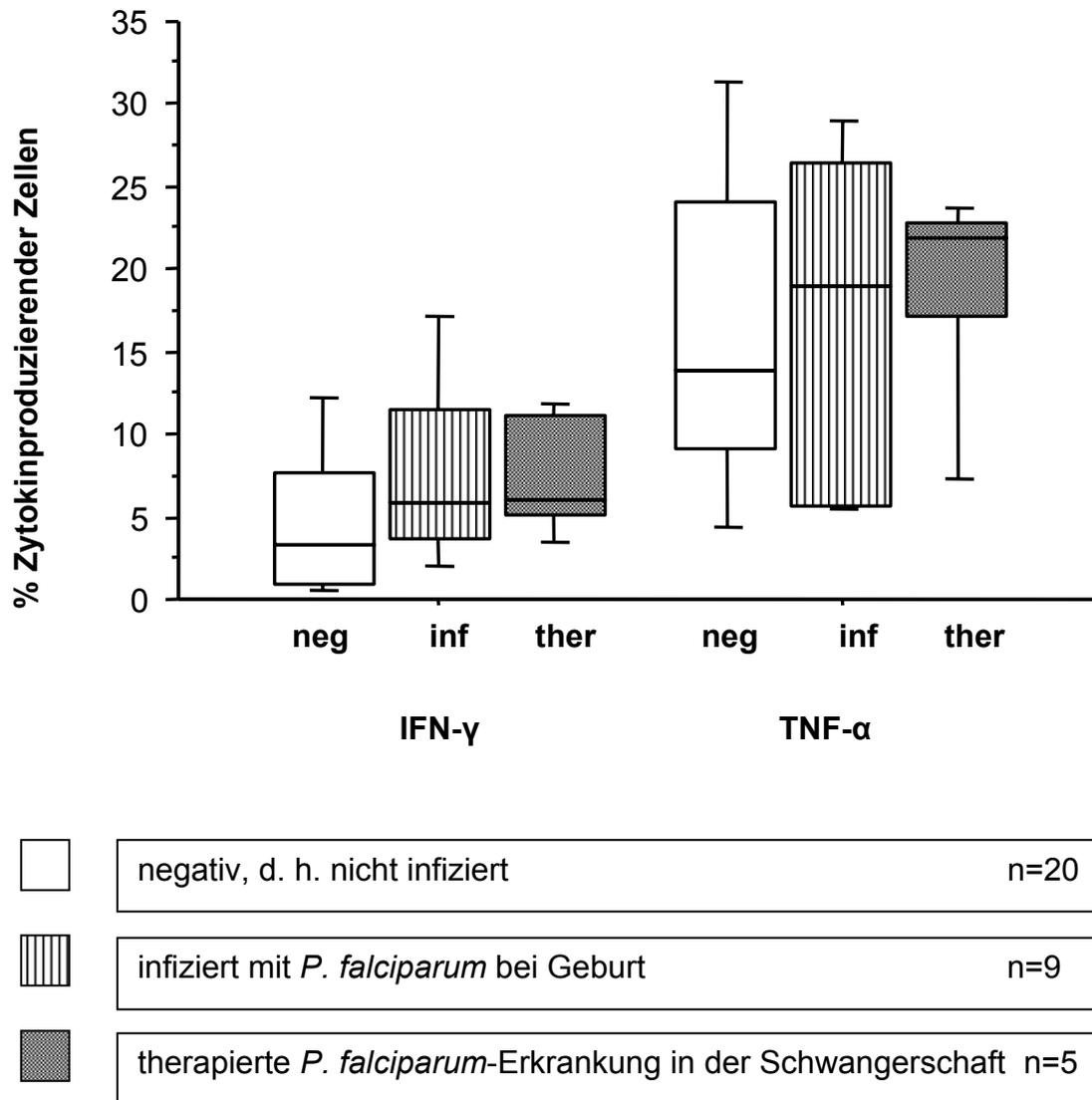
Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)

(7)



	negativ, d. h. nicht infiziert	n=20
	infiziert mit <i>P. falciparum</i> bei Geburt	n=9
	therapierte <i>P. falciparum</i> -Erkrankung in der Schwangerschaft	n=5

(8)



Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der prozentualen Anteile zytokinproduzierender NK-Zellen - weder in den Zellpopulationen des mütterlichen (PBMC) noch des kindlichen (CBMC) Blutes im Hinblick auf Malaria während der Schwangerschaft bzw. bei Geburt. Es zeigte sich lediglich ein nicht-signifikanter Trend in Richtung höherer Anteile IFN- γ -produzierender Zellen im PBMC von Müttern mit einer therapierten Malaria in der Schwangerschaft ($p=0.089$ versus negative Gruppe).

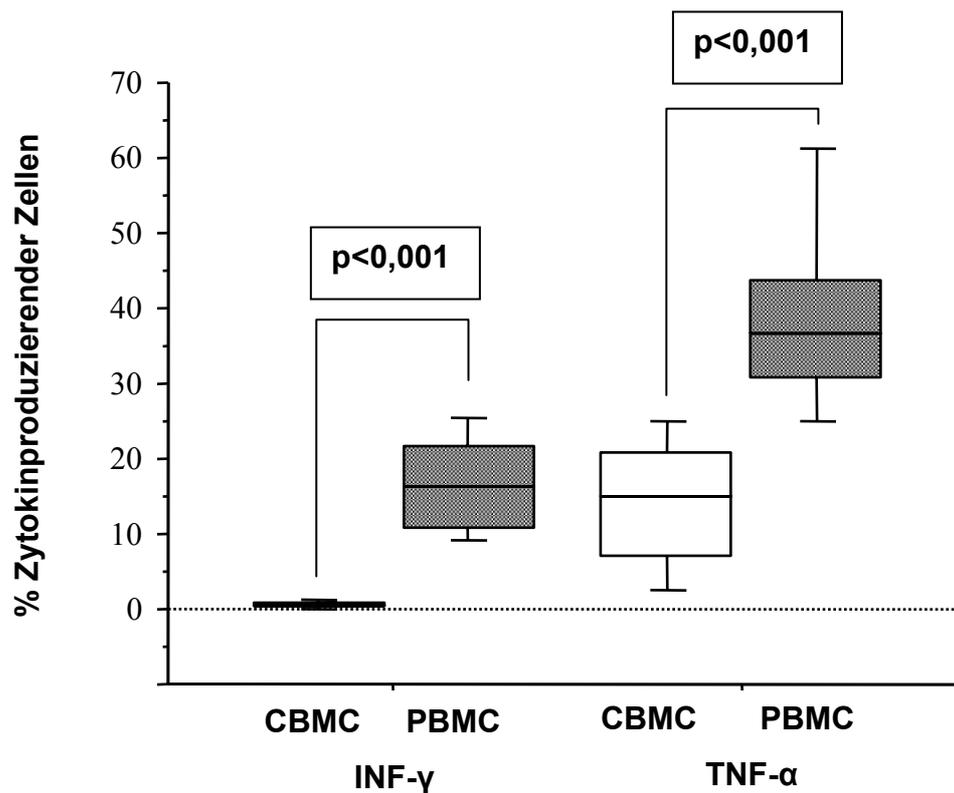
3.4 Zytokinmuster der Zellen der adaptiven Immunantwort PBMC/ CBMC nach Stimulation mit PMA & Ionomycin

3.4.1 Vergleich der Zytokinproduktion zwischen Müttern (PBMC) und Neugeborenen (CBMC)

Diagramm 9

Vergleich proinflammatorischer Zytokinaktivität der CD3⁺-T-Zellen in PBMC von Müttern bzw. im CBMC von Neugeborenen nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin

Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)



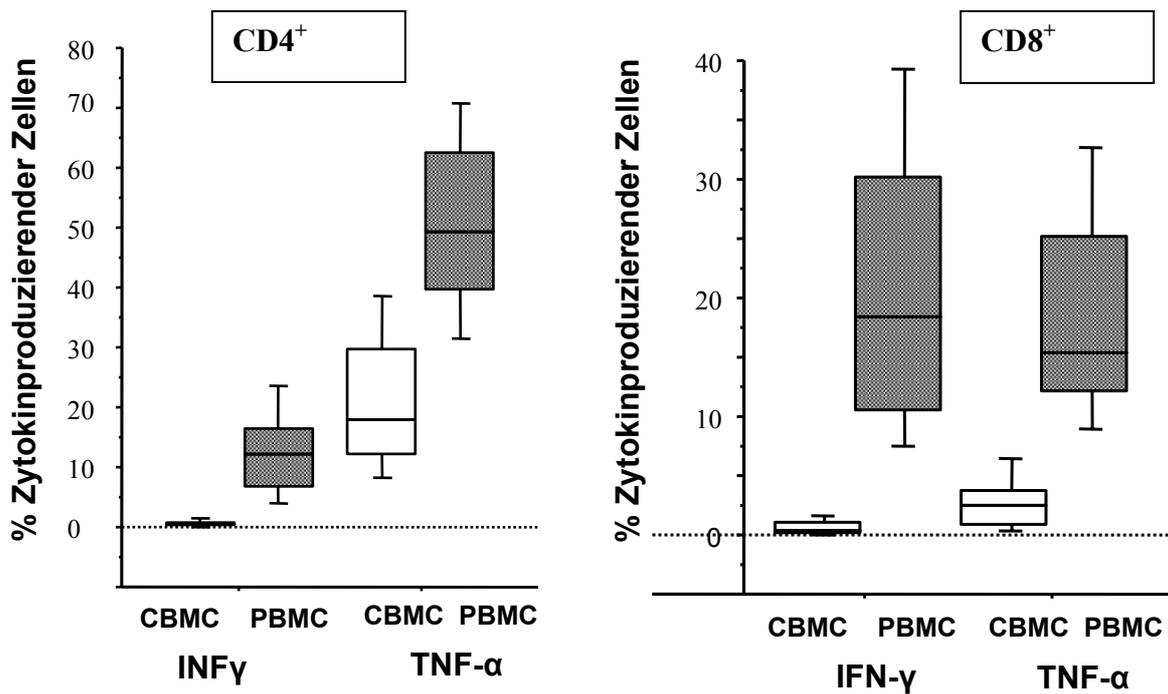
- CBMC, die Werte des Nabelschnurblutes n=34
- PBMC, die Werte der zugehörigen Mütter n=34

Im Folgenden werden zwei Subpopulationen der adaptiven Immunantwort, die CD4⁺-T-Zellen sowie die CD8⁺-T-Zellen gesondert betrachtet.

Diagramm 10/ 11 : CD4⁺-T-Zellen

Vergleich proinflammatorischer Zytokinaktivität der CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen in PBMC von Müttern bzw. in CBMC von Neugeborenen nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin

Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)



	CBMC, die Werte des Nabelschnurblutes	n=34
	PBMC, die Werte der zugehörigen Mütter	n=34

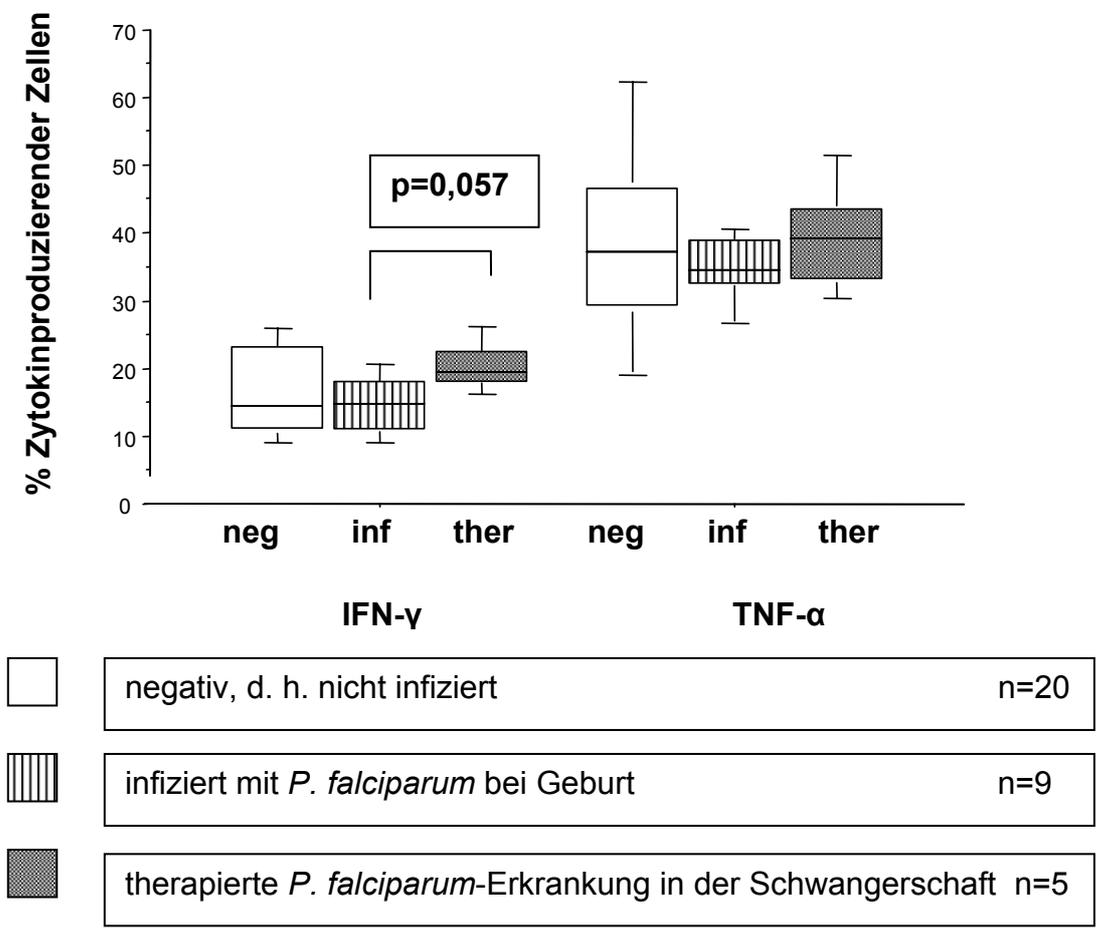
Der Unterschied der Zytokinproduktion sowohl für IFN- γ als auch für TNF- α zwischen Müttern und Neugeborenen ist signifikant für alle drei Zelltypen.

3.4.2 Vergleich der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion der Zellen des adaptiven Immunsystems zwischen den Gruppen entsprechend Plasmodieninfektionen während der Schwangerschaft im mütterlichen peripheren venösen Blut

Diagramm 12

Vergleich proinflammatorischer Zytokinaktivität nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin der CD3⁺-T-Zellen im PBMC von Müttern unter Berücksichtigung einer Plasmodieninfektion

Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)

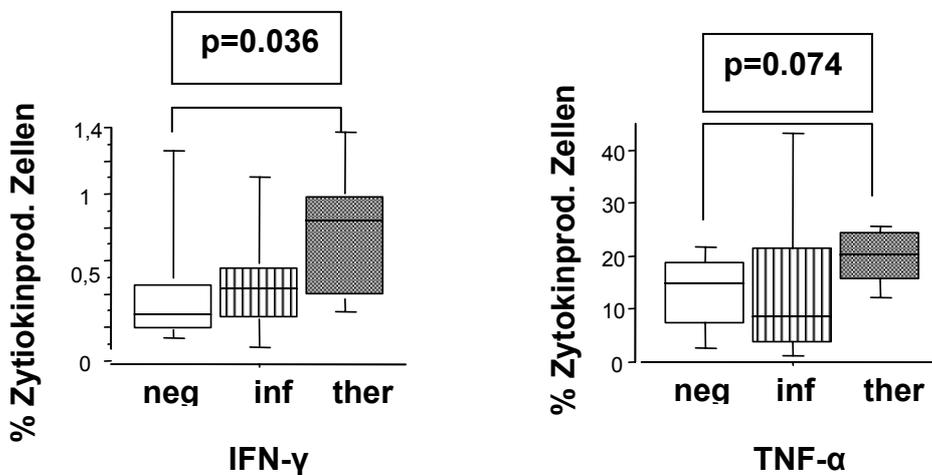


Wie schon bei den γ - δ -T-Zellen und den NK-Zellen zeigten sich die jeweils höchsten prozentualen Anteile zytokinproduzierender CD3⁺ Zellen im PBMC und CBMC der therapierten Gruppe. Für die mütterlichen PBMC waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant, es zeigte sich lediglich ein Trend der IFN- γ -produzierenden Zellen der therapierten Gruppe versus der bei Geburt infizierten Gruppe ($p = 0,057$).

Diagramm 13/ 14: CD3⁺-T-Zellen CBMC IFN- γ / TNF- α

Vergleich proinflammatorischer Zytokinaktivität nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin der CD3⁺-T-Zellen im CBMC unter Berücksichtigung einer Plasmodieninfektion der Mutter

Darstellung im Box-and-whiskers-Plot. (Box vom 1. zum 3. Quantil mit Einzeichnung des Medians, Whiskers zum 10. bzw 90. Perzentil ausgezogen)



□	negativ, d. h. nicht infiziert	n=20
▨	infiziert mit <i>P. falciparum</i> bei Geburt	n=9
■	therapierte <i>P. falciparum</i> -Erkrankung in der Schwangerschaft	n=5

In diesem Fall zeigte sich für die IFN- γ -produzierenden Zellen des CBMC ein signifikanter Unterschied der therapierten Gruppe gegenüber der negativen Gruppe ($p=0.036$).

Für die TNF- α -produzierenden Zellen des CBMC zeigte sich nur ein nicht signifikanter positiver Trend der therapierten Gruppe gegenüber der negativen Gruppe ($p=0.074$).

Für die Subpopulationen der CD4⁺-T-Zellen sowie der CD8⁺-T-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der pro-inflammatorischen Zytokinaktivität hinsichtlich der Zuordnung zu den Gruppen entsprechend einer Plasmodieninfektion in der Schwangerschaft. Daher wurde hier auf eine Darstellung im Diagramm verzichtet.

4 Diskussion

4.1 Infektionsstatus

Alle mikroskopisch gestellten positiven Diagnosen konnten jeweils durch PCR und HRP II-Antigen -ELISA konfirmiert werden. Mit Hilfe der PCR konnten 4 Fälle mikroskopisch zuvor nicht entdeckter Malariainfektionen bei Müttern erkannt werden. Mit diesem Verfahren wurde für *P. falciparum* ssRNA (small subunit ribosomal RNA) kodierende DNA nachgewiesen. Diese Frauen wurden dennoch aus der Studie ausgeschlossen, da die Erreger selbst mikroskopisch nicht nachgewiesen wurden und nicht klar ist, welche Relevanz Plasmodien-DNA für die Beeinflussung der Immunantwort hat.

In keinem Fall einer mütterlichen plazentaren Infektion fanden wir Plasmodien bzw. DNA der Erreger im Nabelschnurblut. Das spricht zumindest für Erkrankungen in der von uns untersuchten Region gegen die Annahme, dass Plasmodien die Plazentaschranke passieren und das Neugeborene direkt sensibilisieren.

4.2 Vergleich klinischer Daten

Das durchschnittliche Geburtsgewicht der Kinder von Frauen mit einer Malaria während der Schwangerschaft lag wie erwartet und schon in anderen Studien nachgewiesen unter dem der negativen Gruppe (Ordi et al. 2001, Dorman et al. 2002). Vor allem bei Infektionen in der frühen Schwangerschaft führt Malaria zu intrauteriner Wachstumsverzögerung und damit verbunden niedrigen Geburtsgewicht, während zum Ende der Schwangerschaft durch eine Malaria eine Frühgeburt ausgelöst werden kann (Moormann et al. 1999, Sullivan et al. 1999). Malaria trägt anscheinend sowohl direkt als auch indirekt (über Anämie) zu geringem Geburtsgewicht bei. Dabei wird vermutlich der Blutaustausch zwischen dem mütterlichen und dem kindlichen Teil der Plazenta gestört. Dafür wird die große Anzahl sequestrierter infizierter roter Blutzellen in den mütterlichen intervillösen Räumen des Synzytiotrophoblasten verantwortlich gemacht, die eine entsprechende Entzündungsreaktion hervorrufen. Hierbei handelt es sich um bestimmte Populationen von Parasiten, die die Fähigkeit haben, in der Plazenta zu adhären, indem sie dort an CSA (Chondroitinsulfat A) binden, welches auf der Oberfläche des Synzytiotrophoblasten exprimiert wird (Fried et al. 1998). Hauptsächlich gilt dies für Primigravidae, was hier nachvollzogen werden konnte.

Beim Vergleich der Hämoglobinkonzentrationen im peripher venösen Blut der Mütter fand sich für Primiparae in der negativen Gruppe ein durchschnittlicher Hämoglobinwert von 10,6 g/dl. In der bei Geburt infizierten Gruppe war der Durchschnittswert niedriger mit 9,9 g/dl. Es handelt sich um einen nichtsignifikanten Trend. Prinzipiell entspricht dies den Ergebnissen von Vorstudien, in denen nachgewiesen wurde, dass Malaria Ursache für mütterliche Anämien während der Schwangerschaft ist (Brabin and Piper 1997). In holoendemischen Gebieten haben Schwangere ein höheres Risiko an Malaria zu erkranken als Nichtschwangere (Mvondo et al. 1992). Der niedrigere Hämoglobinwert kann durch die Pathomechanismen der Malaria hinreichend erklärt werden. Wie oben beschrieben, entsteht die normochrome Anämie

durch Hämolyse und ist weiterhin bedingt durch eine Hemmung der Knochenmarksfunktion.

4.3 Vergleich der Zytokinmuster der γ - δ -T-Zellen und der NK-Zellen

4.3.1 Vergleich der Zytokinproduktion zwischen Müttern (PBMC) und Neugeborenen (CBMC)

Im Nabelschnurblut ist die pro-inflammatorische Zytokinaktivität gegenüber den entsprechenden Lymphozytenpopulationen im peripher venösen Blut Erwachsener deutlich vermindert. Für $CD4^+$, $CD8^+$ und NK-Zellen ist dieser Umstand bereits bekannt (Krampera et al. 2000) und konnte in dieser Studie bestätigt werden. Mit den vorliegenden Daten kann man diese Aussage auf die γ - δ -T-Zellen im Nabelschnurblut im Vergleich zum peripher venösen Blut Erwachsener ausdehnen.

γ - δ -T-Zellen

Es wurde die proinflammatorische Zytokinaktivität der γ - δ -T-Zellen im PBMC von Müttern bzw. im CBMC von Neugeborenen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin verglichen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Zytokinproduktion sowohl für IFN- γ als auch für TNF- α zwischen Müttern und Neugeborenen ($p < 0,001$ in beiden Fällen).

γ - δ -T-Zellen stellen eine T-Zell-Subpopulation mit entscheidendem Beitrag zur frühen Immunantwort bei Malaria dar. Sie sezernieren IFN- γ und TNF- α und hemmen auf diesem Weg das Parasitenwachstum bevor die adaptive Immunantwort zur Parasitenbekämpfung bereit steht. Wie hier zu sehen, ist diese Funktion beim Neugeborenen jedoch noch defizient. Bei Erwachsenen sind die häufigsten Subpopulationen im peripheren Blut die Zellen mit V γ 9- und V δ 2-Ketten im γ - δ -T-Zell-Rezeptor. Es liegen Zellen vom V δ 2-Typ mit mehr als 70% vor und solche vom V δ 1-Typ mit weniger als 30%. Neuere Studien haben gezeigt, dass V γ 9V δ 2-T-Zellen - größte Subpopulation bei Erwachsenen - auch fähig sind zur spezifischen Immunantwort im Sinne des immunologischen

Gedächtnisses (Shen et al. 2002). Sie besitzen bestimmte Oberflächenmarker, die typisch für „memory cells“ sind – bei V δ 1-Zellen, der kleineren Subpopulation im Erwachsenenalter, sind diese nicht zu finden.

Im Nabelschnurblut sind die Verhältnisse deutlich verschieden. Insgesamt ist der Anteil der γ - δ -T-Zellen wesentlich geringer (kleiner 2% der gesamten T-Zellen bei Geburt gegenüber bis zu 10% im 6. Lebensjahr). Des Weiteren exprimieren die neonatalen γ - δ -T-Zellen eine Vielfalt von verschiedenen γ - δ -T-Zell-Rezeptoren, in Kombinationen, die selten bei Erwachsenen beobachtet werden. Das Verhältnis der beiden Subpopulationen vom V δ 2-Typ und V δ 1-Typ ist hier mit 25% V δ 2-Zellen und etwa 50% V δ 1-Zellen umgekehrt (Haas et al. 1993). Weiterhin ist auffällig, dass die Expansion der γ - δ -T-Zellen mit zunehmendem Lebensalter hauptsächlich durch die Vermehrung bestimmter Subpopulationen, den V γ 9V δ 2-T-Zellen, erfolgt (Morita et al. 1994). Damit sind neonatale γ - δ -T-Zellen strukturell und auch funktionell verschieden von der Mehrzahl der adulten γ - δ -T-Zellen. Bei Afrikanern liegen zum Teil andere Verhältnisse der Subpopulationen vor. So fanden Hviid et al. (2001), dass bei gesunden Individuen in Gebieten endemisch für Malaria die V δ 1-Zellen dominieren. Zu den Subpopulationen lässt sich in unserem Falle keine Aussage machen. Jedoch bestätigen unsere Ergebnisse die funktionellen Unterschiede, aufgezeigt durch die deutlich geringere Zytokinaktivität der γ - δ -T-Zellen im Nabelschnurblut im Vergleich zum Blut Erwachsener bei polyklonaler Stimulation. Eine Erklärung dafür könnte in den strukturellen Unterschieden liegen.

γ - δ -T-Zellen entstehen aus Vorläufer-T-Zellen, zweigen in ihrer Entwicklung jedoch – wie die NK-Zellen – früh von der T-Zell-Linie ab, aus der später die Zellen der erworbenen Immunabwehr, die CD4⁺-, CD8⁺-Zellen entstehen. Die Muster der Zytokinaktivität ähneln im Vergleich dem beobachteten gravierenden Unterschied der Zytokinaktivität der Zellen der erworbenen Immunabwehr zwischen CBMC und PBMC, während bei den NK-Zellen andere Verhältnisse zu beobachten sind. Damit könnte man hinsichtlich der Funktion

vermuten, dass die $\gamma\delta$ -T-Zellen eine Stellung zwischen angeborener und erworbener Immunität einnehmen.

NK-Zellen

Es wurde die proinflammatorische Zytokinaktivität der NK-Zellen im PBMC von Müttern bzw. im CBMC von Neugeborenen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin verglichen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Zytokinproduktion für IFN- γ ($p < 0,001$). Kontrovers gegenüber der Studie von Krampera et al. (2000) fanden wir für TNF- α keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,122$). In o. g. Studie wurde bei gleicher Stimulationsweise eine höhere Zytokinproduktion im peripher-venösen Blut Erwachsener für beide Zytokine beschrieben, jedoch umgekehrt für die TNF- α –Zytokinaktivität als signifikant, für die IFN- γ -Zytokinaktivität als nicht signifikant. Bei unserer Studie handelte es sich im Gegensatz zur zitierten Studie um Blutproben von Personen aus holoendemischen Malariagebieten. Auch ist zu bedenken, dass wir Blut von Schwangeren mit ihrer besonderen Immunlage untersuchten. In der Schwangerschaft liegt eine allgemeine Immunsuppression der Th1- Antwort vor. Diese wichtigen Unterschiede betreffs der Auswahl der untersuchten Individuen können die leicht abweichenden Ergebnisse zu der zitierten Studie erklären.

Beide untersuchten Zytokine werden von den Zellen der angeborenen Immunantwort früh nach Kontakt mit infizierten roten Blutzellen gebildet (Artanavanis-Tsakonas et al. 2002). TNF- α induziert zusammen mit IL-12 eine hohe IFN- γ -Produktion der NK-Zellen, was zum Eindämmen von Infektionen vor T-Zellen-Aktivierung führt, also gerade in der frühen Phase der Abwehr von intrazellulären Pathogenen wichtig ist. Eine global geringere Fähigkeit zur Produktion dieser pro-inflammatorischen Zytokine scheint ein spezifisches Merkmal von Nabelschnurblut zu sein, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass eine Th1- Immunantwort bei Neugeborenen deutlich weniger effizient ausfällt als bei Erwachsenen, hier auch gegenüber Schwangeren.

Hohe Konzentrationen von TNF- α nach Stimulation der PBMC im Blut Erwachsener können für hohe IFN- γ -Konzentrationen verantwortlich sein. Die Mechanismen, die die Zytokinproduktion induzieren sind sehr komplex und beeinflussen sich wechselseitig. Damit kann bei geringer T-Zell-Aktivierung im Nabelschnurblut auch eine niedrigere Zytokinaktivität der Zellen der natürlichen, d. h. angeborenen Immunabwehr bedingt sein.

4.3.2 Vergleich der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion der Zellen des angeborenen Immunsystems zwischen den Gruppen entsprechend Plasmodieninfektionen während der Schwangerschaft im mütterlichen peripheren venösen Blut

PBMC/ γ - δ -T-Zellen

Es zeigte sich nach PMA/ Ionomycin-Stimulation, dass die PBMC von Müttern mit einer nachgewiesenen und therapierten Malariaerkrankung die höchste prozentuale Anzahl von IFN- γ - sowie TNF- α -produzierenden γ - δ -T-Zellen enthielten. Für IFN- γ ist die Zytokinaktivität signifikant höher in der Gruppe der Frauen mit therapierter Malaria-Episode während der Schwangerschaft („treat“) gegenüber der Gruppe mit plazentarer *P. falciparum* -Infektion bei Geburt („inf“) ($p=0,008$). Auch für TNF- α ist die Zytokinproduktion signifikant erhöht in der Gruppe der therapierten Mütter gegenüber der bei Geburt infizierten Gruppe ($p=0,005$).

Das bedeutet also, dass nach hier vorliegenden Ergebnissen, die Zytokinaktivität der γ - δ -T-Zellen nach durchgemachter und therapierter Erkrankung höher ist, als bei Infektion der Plazenta (die in den meisten Fällen auch mit dem Vorliegen einer peripheren Parasitämie verbunden war) zum Zeitpunkt der Geburt. Über die Rolle der γ - δ -T-Zellen in der Abwehr der Malaria gibt es bereits mehrere Studien (Hviid et al 1996, Troye-Blomberg et al. 1999). Es ist bekannt, dass während der akuten *P. falciparum* -Infektion der Anteil der γ - δ -T-Zellen an den gesamten T-Zellen von ca. 5% auf 30-40% ansteigt. Das trifft auf das periphere Blut zu, aber auch für die Milz, die Ort der Elimination der

zirkulierenden Blutstadien der Parasiten ist. Es wird angenommen, dass γ - δ -T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Elimination spielen, sowohl durch eigene zytolytische Aktivität als auch durch Aktivierung von Makrophagen über die Produktion der Th1- Zytokine IFN- γ und TNF- α (Langhorne, 1996). Gegen die Annahme, dass γ - δ -T-Zellen zur Verstärkung der Pathologie der Malaria beitragen spricht, dass in der Rekonvaleszenz ohne Pathologie eine höhere Anzahl zytokinproduzierender γ - δ -T-Zellen vorliegt, als bei akuter Infektion. Diese Erhöhung hält auch nach Infektion noch ca. 3-4 Monate an (Langhorne, 1996), was unserem Ergebnis entspricht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine erfolgreich therapierte *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft zu erhöhter proinflammatorischer Zytokinaktivität der γ - δ -T-Zell-Population führt.

Hviid et al. (1996) fanden bei afrikanischen Kindern in Ghana stark erhöhte Frequenzen sowie absolute Anzahlen von γ - δ -T-Zellen am 2. Tag nach Therapiebeginn, während vor Therapiebeginn erkrankte Kinder gleiche prozentuale Anteile der γ - δ -T-Zellen an den gesamten T-Zellen wie gesunde Kinder aufwiesen. Dem können wir hinzufügen, dass in der Rekonvaleszenz nach therapiertem Infektion die Zytokinaktivität dieser Zellpopulation höher ist als bei akuter bzw. persistierender subakuter Infektion bei schwangeren Frauen zum Zeitpunkt der Geburt.

CBMC/ γ - δ -T-Zellen

Ein ähnliches Muster wurde für die prozentuale Anzahl von IFN- γ - sowie TNF- α -produzierenden γ - δ -T-Zellen im Nabelschnurblut (CBMC) beobachtet. Für IFN- γ ist eine signifikant höhere Zytokinaktivität der bei Geburt infizierten und der therapierten Gruppe gegenüber der negativen Gruppe zu verzeichnen ($p=0.017$ / $p=0.006$). Für TNF- α lässt sich ein nicht-signifikanter Trend nachweisen in Richtung höherer Zytokinlevel in der therapierten Gruppe verglichen mit den anderen zwei Gruppen.

Damit zeigt sich, dass sich der Effekt einer erfolgreich therapierten Malaria während der Schwangerschaft auf die γ - δ -T-Zellen, der bei den Müttern zu

verzeichnen war, auch auf die Zellen des fetalen angeborenen Immunsystems erstreckt. Für die Zellen der erworbenen Immunantwort des fetalen Immunsystems ist eine infektionsassoziierte in utero Sensibilisierung gegen Plasmodienantigene bekannt (Xi et al. 2003, King et al. 2002). Mit unseren Ergebnissen lässt sich zum einen vermuten, dass eine Sensibilisierung auch für das angeborene Immunsystem – hier speziell für die γ - δ -T-Zellen - durch Parasitenantigene stattfindet. Diese Sensibilisierung erstreckt sich offensichtlich anhaltend über einen längeren Zeitraum der fetalen Entwicklung (therapierte gegenüber negativer Gruppe). Diese Beobachtungen unterstützen zum zweiten die Vorstellung, dass es unter den γ - δ -T-Zellen einen „Memory-Phänotyp“ gibt und diese Zellart damit eine Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellt (Chen et al. 2003). Ob die in utero Aktivierung dieser Zellen einen Einfluss auf den Verlauf zukünftiger Plasmodieninfektionen der Kinder hat, ist Gegenstand laufender Studien.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass in keinem Fall eine Infektion des Nabelschnurblutes mit *P. falciparum* nachgewiesen werden konnte, weder mikroskopisch noch durch andere, sehr sensitive Methoden, die unter anderem mikroskopisch nicht nachweisbare mütterliche Infektionen entdeckten. Damit gibt es offensichtlich bisher unerklärte geographische Unterschiede betreffs der Inzidenz von Parasitämie im Nabelschnurblut. Im Senegal beispielsweise wurden in 3-5% parasitierte rote Blutzellen im Nabelschnurblut gefunden, die gleiche Forschungsgruppe fand keinen Anhalt für solche Infektionen in großen Untersuchungsserien im Kamerun (Deloron et al., bisher unveröffentlichte Daten). Letzteres entspricht unseren Beobachtungen im benachbarten Gabun. Somit lässt sich aus unseren Ergebnissen schlussfolgern, dass die erhöhte Zytokinaktivität von γ - δ -T-Zellen im Nabelschnurblut nicht durch direkte Stimulation von Parasiten oder parasitierten Erythrozyten hervorgerufen wird, sondern von transplazentarer Übertragung der Parasitenantigene von der Mutter auf den Fetus. Das Auftreten von Parasitenantigenämie im Nabelschnurblut wurde bereits in anderen Studien beschrieben (Jakobsen et al. 1998). Es handelt sich damit bei unseren

Beobachtungen vermutlich um eine parasitenantigen-induzierte Sensibilisierung der Immunzellen des Nabelschnurblutes – auch wenn zum Zeitpunkt der Geburt im Nabelschnurblut kein HRP II Antigen nachweisbar war.

Die niedrige Zytokinantwort in der Gruppe der Neugeborenen von Müttern mit einer plazentaren *P. falciparum* -Infektion bei Geburt stimmt mit den Beobachtungen einer neueren Studie in Gambia überein (Ismaili et al. 2003). Dort wurden reduzierte IFN- γ -Antworten der Immunzellen des Nabelschnurblutes beschrieben, möglicherweise verursacht durch Veränderungen der Funktion antigenpräsentierender Zellen (APC) im Zusammenhang mit einer aktiven plazentaren *P. falciparum* -Infektion.

Eine signifikant niedrigere prozentuale Anzahl von IFN- γ - sowie TNF- α -produzierenden γ - δ -T-Zellen fand sich jedoch in den CBMC des Nabelschnurblutes der Gruppe ohne Nachweis einer Malariainfektion gegenüber der therapierten Gruppe. Auch diese Beobachtung entspricht dem Konzept einer möglichen transplazentaren in utero Sensibilisierung der Immunzellen des Nabelschnurblutes bei Infektion der Mutter während der Schwangerschaft.

PBMC/ NK-Zellen

Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der prozentualen Anteile zytokinproduzierender NK-Zellen - weder in den Zellpopulationen des mütterlichen (PBMC) noch des kindlichen (CBMC) Blutes im Hinblick auf Malariainfektion während der Schwangerschaft bzw. bei Geburt. Es zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend in Richtung höherer Anteile IFN- γ -produzierender Zellen im PBMC von Müttern mit einer therapierten Malaria in der Schwangerschaft ($p = 0.089$ versus negative Gruppe).

NK-Zellen werden hauptverantwortlich gemacht für die frühe IFN- γ -Produktion bei Kontakt der Zellen des Immunsystems mit Malariaerregern. Artavanis et al. (2002) stimulierten periphere weißen Blutzellen (PBMC) nichtimmuner Spender

mit infizierten roten Blutzellen (IRBC). Die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen war bei Co-Kultur mit IRBC bereits nach 6 Stunden signifikant erhöht. Das weist auf eine wichtige Rolle der NK-Zellen als frühe Quelle von IFN- γ hin, dem Zytokin das nachgewiesenermaßen ein Mediator für verschiedene antiparasitäre Effekte ist. Nach Co-Kultur der PBMC mit IRBC über 24 Stunden zeigte sich, dass die signifikant erhöhten IFN- γ -Level zu ca. 60% von den NK-Zellen des Spenders produziert wurden, der Rest von den CD3⁺-T-Zellen. Allerdings wurde dort bereits eine individuell sehr verschieden ausgeprägte NK-Zell-Antwort auf Malariaparasiten beschrieben (Artavanis et al. 2002). Diese individuellen verschiedenen Immunantworten könnten erklären, weshalb wir keine signifikanten Unterschiede entsprechend des Infektionsstatus mit *P. falciparum* in der Zytokinproduktion der NK-Zellen der Mütter finden konnten. Auch ist zu bedenken, dass es sich in unserer Studie um schwangere, ausnahmslos afrikanische semiimmune Frauen handelte. Wie bereits erwähnt, stellt die Schwangerschaft eine besondere immunologische Situation dar. Eine vorübergehende Unterdrückung der zellulären Immunantwort verhindert die Abstoßung des Feten. Das wirkt sich auch auf die Abwehrmechanismen der Mutter bei Infektionen aus. Eine plazentare Plasmodieninfektion verschiebt die vorherrschende Th2-Situation einer normalen Schwangerschaft in Richtung Th1 (Fried et al. 1998, Okoko et al. 2003). Das ließe erwarten, eine erhöhte TNF- α - und IFN- γ -Produktion in der bei Geburt infizierten Gruppe zu finden – was sich weder für die Zellen der angeborenen noch der erworbenen Immunantwort zeigen ließ. Jedoch entsprechen unsere Ergebnisse wiederum den Beobachtungen anderer Studien (Moormann et al 1999), dass entsprechende Zytokinspiegel der Plazenta nicht ebenso peripher zu finden sind. Weiterhin beschrieben bereits andere Gruppen, dass die in vitro Aktivierung der NK-Zellen mit IRBC bei semiimmunen Personen deutlich geringer ausfällt als bei nichtimmunen (Mavoungou et al. 2003). Da wir ausnahmslos semiimmune Patienten untersuchten, kann das erklären, weshalb die Unterschiede hier nicht signifikant waren. Es wurde nachgewiesen, dass hohe IFN- γ -Level mit einer größeren Resistenz gegen Reinfektionen korrelieren und vor klinisch manifesten Erkrankungen schützen (Luty et al. 1999). Jedoch ist im Falle der

Semiimmunität möglicherweise eine andere Subpopulation als die NK-Zellen hauptverantwortlich für erhöhte IFN- γ -Level.

CBMC/ NK-Zellen

Für Immunzellen des Nabelschnurblutes wurde eine vorherrschende Th2-Situation beschrieben, ebenso wie für schwangere Mütter (Krampera et al. 2000). Hier jedoch glaubt man die Erklärung darin zu sehen, dass die Immaturität des neonatalen Immunsystems eine geringe Fähigkeit zur Th1-Differenzierung bedingt. Dies wird weniger einem Defekt der T-Zellen zugeschrieben als vielmehr einem funktionellen Defekt der antigenpräsentierenden Zellen, u. a. der dendritischen Zellen und der Monozyten. Eine Plazentainfektion mit Malariaerregern führt zu verminderten IL-12-Produktion was wiederum niedrigen IFN- γ -Level bedingt (Ismaili et al. 2003). In der Studie von Artavanis et al. (2002) wurde die NK-Zellantwort als IL-12 abhängig beschrieben. Weiterhin wurde gezeigt, dass zur Induktion der natürlichen Immunantwort in vitro der direkte Kontakt zwischen infiziertem Erythrozyten und Leukozyt notwendig ist, ein Parasitenlysate löste keine signifikant erhöhte Zytokinproduktion bei NK-Zellen aus. Von einem direkten Kontakt der Zellen des Immunsystems mit infizierten Erythrozyten kann bei den Proben Nabelschnurblutes unserer Studie nicht ausgegangen werden – in keinem Fall wurde eine *P. falciparum* -Infektion des Nabelschnurblutes bei gleichzeitig vorliegender Plazenta-Infektion der Mutter nachgewiesen. Damit lässt sich das Fehlen signifikanter Unterschiede der Zytokinproduktion des Nabelschnurblutes zwischen den Gruppen mit verschiedenem Infektionsstatus erklären.

4.4 Vergleich der Zytokinmuster der Zellen der adaptiven Immunantwort

4.4.1 Vergleich der Zytokinproduktion zwischen Müttern (PBMC) und Neugeborenen (CBMC)

CD4⁺-T-Zellen/ CD8⁺-T-Zellen

Es wurde die proinflammatorische Zytokinaktivität der CD4⁺-/ CD8⁺-T-Zellen im PBMC von Müttern bzw. im CBMC von Neugeborenen nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin verglichen. Es zeigt sich in Übereinstimmung mit früheren Studien (Krampera et al. 2000) ein signifikanter Unterschied der Zytokinproduktion sowohl für IFN- γ als auch für TNF- α zwischen Müttern und Neugeborenen ($p < 0,001$ in beiden Fällen) für beide T-Zell-Arten. Es ist bekannt, dass der Prozentsatz der IFN- γ -produzierenden CD4⁺-/ CD8⁺-T-Zellen mit dem Lebensalter zunimmt. So fand sich in vorangehenden Studien am selben Studienort ein deutlich erhöhter Anteil IFN- γ -produzierender CD4⁺-/ CD8⁺-T-Zellen bei Erwachsenen gegenüber Kleinkindern (Winkler et al. 1999). Unsere Ergebnisse bestätigen, dass die T-Zell-Immunantwort – vorherrschende Immunantwort bei Erwachsenen - im Nabelschnurblut weniger effizient ausfällt, wie schon mehrfach nachgewiesen (Cohen et al. 1998, Chipeta et al. 1999). Die Reifung der Th1- Immunantwort schreitet mit dem Lebensalter fort. CD4⁺-/ CD8⁺-T-Zellen bedürfen der Stimulation durch Antigenpräsentation der Klasse II/ I MHC-Moleküle. Diese Funktion wird unter anderem von B-Zellen übernommen, die bei Neugeborenen deutlich schwächere Signale an T-Zellen senden und vermutlich damit unter der notwendigen Schwelle für die Aktivierung der T-Zellen bleiben. Da die entsprechende Co-Stimulation also fehlt, kann es zu keiner produktiven Interaktion zwischen B- und T-Zellen bei Neugeborenen kommen (Marshall-Clarke et al. 2000). Unsere Ergebnisse bestätigen die geringe Reaktivität der Zytokinproduktion von Nabelschnur-T-Zellen nach polyklonaler Stimulation.

4.4.2 Vergleich der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion der Zellen des adaptiven Immunsystems zwischen den Gruppen entsprechend Plasmodieninfektionen während der Schwangerschaft im mütterlichen peripheren venösen Blut

PBMC

Wie schon bei den γ - δ -T-Zellen und den NK-Zellen zeigten sich die jeweils höchsten prozentualen Anteile zytokinproduzierender CD3⁺ Zellen im PBMC der bei Geburt infizierten Gruppe. Für die mütterlichen PBMC fand sich außerdem ein nicht-signifikanter Trend der IFN- γ -produzierenden Zellen der bei Geburt infizierten gegenüber der therapierten Gruppe ($p=0,057$).

Man weiß, dass CD4⁺-/ CD8⁺-T-Zellen in der Abwehr der Blutstadien und bei Entwicklung der Semiimmunität eine Rolle spielen. Sie erkennen parasitäre Antigene wie CS (circumsporozoite protein) und TRAP (thrombospondin related adhesiv protein). Somit besteht ein Schutz durch antigen-spezifische Antikörper, der durch dauernde Exposition akkumuliert und zur oben beschriebenen Semiimmunität beiträgt. Es wird angenommen, dass die Malariaparasiten aktiv das Immunsystem des Wirtes modulieren und damit eine spezifische Immunantwort verhindern. Die T-Zell-Antwort wird als generell supprimiert während der Malariaerkrankung beschrieben. Im Falle von CD8⁺-T-Zellen wird dies einer Störung der Induktion der protektiven T-Zell-Antwort durch APL (altered peptid ligand) vermittelte Antagonismen zugeschrieben. Dadurch entstehen defekte Effektor-T-Zellen, die die Fähigkeit zur Proliferation besitzen, aber nicht zur Abtötung der Parasiten und zur erhöhten Produktion der zur Abwehr der Leberstadien notwendigen protektiven Zytokine IFN- γ und TNF- α (Plebanski et al. 2000). Zum anderen wurden bei akuter Malaria im zirkulierenden Blut niedrigere Anteile von IFN- γ -produzierenden CD4⁺-T-Zellen beschrieben, was darauf zurückgeführt wird, dass diese Zellen in den peripheren Blutgefäßen sequestrieren. Dafür spricht auch, dass sie nach erfolgreicher Chemotherapie wieder in normalen Anteilen im zirkulierenden Blut nachweisbar sind (Winkler et al. 1999). Das wird im Fall der IFN- γ -produzierenden Zellen von unseren Ergebnissen bestätigt: dies kann erklären,

dass in der therapierten Gruppe höhere Anteile IFN- γ -produzierender T-Zellen zu finden waren als in der bei Geburt infizierten Gruppe.

Neugeborene

Auch hier fanden sich, wie bei den Zellen des natürlichen Immunsystems, die höchsten prozentualen Anteile zytokinproduzierender CD3⁺-T-Zellen im CBMC der therapierten Gruppe. Der Prozentsatz der IFN- γ -produzierenden Zellen war signifikant höher gegenüber der negativen Gruppe ($p=0.036$). Eine mögliche Erklärung dafür ist eine anzunehmende in utero Sensibilisierung auch der CD3⁺-T-Zellen durch Malaria während der Schwangerschaft.

Im Hinblick auf die Gruppe der Neugeborenen von Müttern mit plazentarer *P. falciparum* -Infektion bei Geburt ist folgendes anzumerken: Plazentare Malaria ist assoziiert mit einer erhöhten Anfälligkeit für Malaria in früher Kindheit und mit verminderter Immunantwort im plazentaren Kompartiment (Le Hesran et al.1997). IL-10 unterdrückt unter anderem die Produktion von Zytokinen wie TNF- α und IFN- γ in der Plazenta. Es wird angenommen, dass erhöhte antiinflammatorische IL-10-Level im plazentaren Kompartiment einen ähnlichen Effekt auf die Immunantwort der Nabelschnurblutzellen haben (Rasheed et al. 1995). Das konnte hier nur teilweise nachvollzogen werden. Für TNF- α ist die Zytokinproduktion der Nabelschnurblutzellen am niedrigsten in der Gruppe mit plazentarer Malaria bei Geburt, jedoch nicht signifikant. Auffälliger ist, wie oben erwähnt, die höhere Zytokinaktivität in der Gruppe der Neugeborenen von Müttern mit einer therapierten Malariaerkrankung während der Schwangerschaft gegenüber der negativen Gruppe. Diese Beobachtungen sprechen für eine in utero-Sensibilisierung durch *P. falciparum* -Antigene, die sich auch auf die Zellen der erworbenen Immunantwort des Neugeborenen ausdehnt.

5 Zusammenfassung

P. falciparum-Malaria ist weltweit eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten mit hoher Morbidität und Mortalität. Trotz jahrzehntelanger Forschung und verschiedenen klinischen Studien ist es bisher nicht gelungen, einen zuverlässigen Impfschutz gegen die Blutstadien der Malaria-Erreger zu finden. Bisher konzentrierte man sich hauptsächlich auf die Rolle der erworbenen Immunantwort, die angeborenen Immunmechanismen gegen Malaria fanden wenig Beachtung. Studien in jüngerer Vergangenheit (Luty et al. 1999, Dodo et al. 2002) haben wiederholt gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine, speziell IFN- γ und TNF- α , essentielle Mediatoren der protektiven Immunität gegen die erythrozytären Stadien der Parasiten sind. Diese Zytokine werden sowohl von Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems gebildet.

In dieser Studie ging es um den Einfluss mütterlicher *P. falciparum* -Infektion während der Schwangerschaft auf die zelluläre Immunantwort der peripheren mononukleären Zellen im Blut der Mütter und speziell der mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes. Dazu wurden Mütter und Neugeborene nach unterschiedlicher Vorgeschichte betreffs Malariainfektion in Gruppen aufgeteilt und die aus den entnommenen Blutproben gewonnenen PBMC/ CBMC unspezifisch stimuliert. Anschließend erfolgte eine Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion. Damit sollte am Beispiel von TNF- α und IFN- γ eine Aussage über die Fähigkeit zur Immunantwort der einzelnen Subpopulationen der Zellen des Immunsystems getroffen werden. Spezielles Augenmerk lag auf den Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allem den γ - δ -T-Zellen, denen eine bedeutende Rolle in der Abwehr der Malariaerreger und für die Erlangung der Semiimmunität bei regelmäßig wiederkehrenden Infektionen zugeschrieben wird. Mit einem besseren Verständnis der einzelnen Details der Immunmechanismen, wird versucht herauszufinden, welche Art der Immunantwort für einen Schutz vor klinisch manifesten Malariaerkrankungen

verantwortlich ist und wie man diese Antwort eventuell durch einen Impfstoff induzieren kann.

Aus unseren Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass eine chemotherapeutische Therapie einer mütterlichen Malaria zum einen zu einer vergrößerten, schnell reagierenden γ - δ -T-Zell-Population führt, und zum zweiten sich dieser Effekt auf die Zellen des fetalen Immunsystems ausdehnt. Damit verstärkt sich die Annahme, dass die Zellen des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Malariaerkrankung spielen.

Zum zweiten zeigt die Aktivierung der Zellen des Nabelschnurblutes in Abwesenheit des Nachweises von *P. falciparum* -Erregern, dass hier eine infektionsassoziierte in utero Sensibilisierung gegenüber Plasmodienantigenen vorliegt. Dies ist am auffälligsten für die γ - δ -T-Zellen, aber im Falle von IFN- γ ebenso signifikant für die Zellen des neonatalen erworbenen Immunsystems, die CD3⁺-T-Zellen.

Weiterhin lassen sich durch diese Studie Annahmen verstärken, was die Stellung und Funktion der γ - δ -T-Zellen im menschlichen Immunsystem betrifft. Klassischerweise als Zellen des angeborenen, natürlichen Immunsystems betrachtet, zeigt sich hier, dass γ - δ -T-Zellen in der Lage sind, ihre Kapazität zur verstärkten Immunantwort nach Sensibilisierung während der Fetalperiode durch mütterliche Infektion über einen Zeitraum von einigen Monaten bis zur Geburt aufrecht zu erhalten. Diese Beobachtungen stimmen mit der Annahme überein, dass bestimmte γ - δ -T-Zellen eine Erinnerungsfunktion besitzen und damit eine Sonderstellung einnehmen zwischen den Zellen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr. Ob die Aktivierung dieser Zellen in utero einen Einfluss auf die Abwehrlage des Immunsystems nach Geburt hat, stellt sich als wichtige Frage, die in weiteren Studien in Lambaréné untersucht werden wird.

6 Verwendete Materialien

5.1 Materialien für die Diagnostik

Lichtmikroskope	Zeiss, Deutschland
Blutbild:Quantitative Buffy coat Hämocytometer (einschliesslich entsprechen- de Kapillaren und Zentrifuge)	QBC, Becton Dickinson, USA
Giemsa-Lösung:	
- Giemsalösung, verdünnt 1 : 5 mit	Sigma, USA
- Triphosphatpuffer (pH 7,2)	Merck, Deutschland
Powder-Free Latex Exam Gloves	Kimberly-Clark
Objektträger 76 x 26mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipetten 2-20/ 20-200/ 100-1000µl Labmate	ABIMEDAnalysen-Technik
Pipettenspitzen gelb, blau	Greiner bio-one

6.2 Materialien für die wissenschaftlichen Analysen

S-Monovette 9ml Ammoniumheparin (15 I.E. Heparin/ml Blut)	Sarstedt, Deutschland
Multiadapter und Butterfly	Sarstedt, Deutschland
Zentrifuge	Beckmann, TRG
Sterile Arbeitsbank	Haereus Instruments
Inkubator	Haereus Instruments
Tiefkühltruhe (-80°C)	Revco
Stripetten 1ml/5ml/10ml/25ml Costar®	Corning Incorporated
accu-jet® Pipettierhilfe	BRAND
1,8ml Gefrieröhrchen	Nunc

PP-Röhrchen 15ml steril	Greiner bio-one, Deutschland
Falcontube 50ml Blue Max™	Becton Dickinson, USA
Leukosep Röhrchen 50ml	Greiner bio-one, Deutschland
Flaschen 500ml, Glas	Schott Duran
Sterilfilter	Millipore, Molsheim, Frankreich
Gewebekulturflaschen 50ml/25cm ²	Greiner bio-one
Zählkammer Neubauer Improved (0,100mm Tiefe/ 0,0025mm ²)	Neubauer
FACSCalibur flow cytometer	Becton Dickinson, USA
CellQuest software	Becton Dickinson, USA

Chemikalien

Ficoll-Paque Plus endotoxin tested	Amersham Biosciences, Sweden
Dubecco's Phosphat Bufferd Saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypan blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
UC-Kulturmedium aus	
- UltraCulture Medium 500ml	Bio Whittaker, USA
- L-Glutamin	Sigma, USA
- 2-Mercaptoethanol	Merck, Deutschland
- Gentamicinsulfat (GIBCO, 50mg/ml)	Invitrogen Corp.
Phosphate Buffered Saline PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Brefeldin A	Sigma, USA
PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate)	Sigma, USA
Ionomycin	Sigma, USA
Formaldehyd 37%	Merck, Deutschland
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Sodium Azide NaN_3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bovine Serum Albumine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Malaria antigen CELISA	Cellabs, Australia
PCR kit	Qiagen, Deutschland
Saponin	Sigma, USA
Monoklonale Antikörper (mAb):	
- FITC-anti-IFN- γ mAb	Becton Dickinson, USA
- PerCP-anti-CD3 mAb	Becton Dickinson, USA
- PerCP-anti-CD4 mAb	Becton Dickinson, USA
- PerCP-anti-CD8 mAb	Becton Dickinson, USA
- APC-anti-TCR $\gamma\delta$ mAb	Becton Dickinson, USA
- PE-anti TNF- α mAb	Pharmingen, Deutschland
- APC-anti-CD94 mAb	Pharmingen, Deutschland

7 Literaturverzeichnis

- Artavanis-Tsakonas K, Riley E M (2002)
Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN- γ from Human NK Cells by Live *P. falciparum* -Infected Erythrocytes
J of Immunol 169, 2956-2963
- Brabin and Piper (1997)
Anemia and malaria-attributable low birthweight in two populations in Papua New Guinea
Ann Hum Biol 24(6), 547-555
- Chen Z W, Letvin N L (2003)
Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2 T cells: a new paradigm
Trends Immunol. 24, 213-219
- Dodoo D, Omer F M, Todd J, Akanmori B D, Koram K A, Riley E M (2002)
Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *P. falciparum* malaria
J Infect Dis. 185, 971-979
- Dorman E K, Shulman C E, Kingdom J, Bilmer J N, Mwenda J, Peshu N, Marsh K (2002)
Impaired uteroplacental flow in pregnancies complicated by falciparum malaria
Ultrasound in Obstr & Gyn 19(2), 165-170
- Fievet N, Ringwald P, Bickii J, Dubois B, Maubert B, Le Hesran J Y, Cot M, Deloron P (1996)
Malaria cellular immune responses in neonates from Cameroon
Parasite Immunol 18, 483-490
- Fried M, Muga R O, Misore A O, Duffy P E (1998)
Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes
J Immunol 160, 2523-2530
- Haas W, Pereira P, Tonegawa S (1993)
Gamma/Delta Cells
Ann Review Immunol 11, 637-685
- Hensmann M, Kwiatkowski D (2001)
Cellular basis of early cytokine response to *P. falciparum*
Infect immunol 69, 2364-2371

Hill A V S, Allsopp C E M, Kwiatkowski D, Anstey N M, Twumasi P, Rowe P A, Bennett S, Brewster D, McMichael A J and Greenwood B M (1991)
Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria
Nature 352, 595-600

Hill A V S, Weatherall D J (1998)
Host genetic factors in resistance to Malaria
In: Sherman IW: Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection
AMS Press Washington, D.C.

Hviid L, Kurtzhals J A, Dodoo D, Rodrigues O, Ronn A, Commey J O, Nkrumah F K Theander T G (1996)
The gamma/delta T-cell response to *P. falciparum* malaria in a population in which malaria is endemic
Infect Immunol 64, 4359-4362

Hviid L, Kurtzhals J A, Adabayeri V, Loizon S, Kemp K, Goka B Q, Lim A, Mercereau-Puijalon O, Akanmori B D, Behr C (2001)
Perubation and Proinflammatory Type Activation of V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T Cells in African Children with *P. falciparum* Malaria
Infect Immunol 69, 3190-3169

Ismaili J, Van Der Sande M, Holland MJ, Sambou I, Keita S, Allsopp C, Ota M O, Mcadam K P W J, Pinder M (2003)
P. falciparum infection of the placenta affects newborn immune responses
Clin Exp Immunol 133, 414-421

King C L, Malhotra I, Wamachi A, Kioko J, Wahab S A, Koech D, Zimmermann P, Ouma J, Kazura J W (2002)
Acquired immune responses to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in the human fetus
Journ Immunol. 168, 356-364

Krampera M, Tavecchia L, Benedetti F, Nadali G, Pizzolo G (2000)
Intracellular cytokine profile of cord blood T-, NK-cells and monocytes
Haematol 85, 675-679

Kremsner P G, Zotter, G M, Feldmeier, Graninger W, Rocha R M, Jassen-Rosseck R, Bienzle U (1990)
Immune response in patients during and after *P. falciparum* infection
J Infect. Dis. 161, 1025-1028

Langhorne J (1996)
 $\gamma\delta$ T Cells in Malaria Infections
Parasitology Today 12/5, 200-203

Larkin G L, Thuma P E (1991)

Congenital malaria in a hyperendemic area
Am J Trop Med Hyg 45, 587-592

Le Hesran J Y, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B, Beyemé M, Boudin C, Deloron P (1997)
Maternal Placental Infection with *P. falciparum* and Malaria Morbidity during the First 2 Years of Life
Am J Epidemiol 146/10, 826-831

Luty A J F, Lell B Schmidt-Ott, Lehmann L G, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Migot-Nabias F, Deloron P, Nussenzweig R S, Kremsner P G (1999)
Interferon- γ Responses are associated with resistance to reinfection with *P. falciparum* in young African children
J Infect. Dis. 179, 980-988

Mavoungou E, Luty A J F, Kremsner P G (2003)
Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of Plasmodiumfalciparum-infected human red blood cellsin vitro
Eur Cytokine Netw. 14, 134-142

May J, Lell B, Luty A J F, Meyer C G, Kremsner P G (2000)
Plasma interleukin-10: Tumor necrosis facto (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications
J Infect. Dis. 182, 1570-1573

Mendez C, Ordi J, Ismail M R, Ventura P J, Aponte J J, Kahigwa E, Font F, Alonso P L (2000)
The Impact of placental malaria on gestational age and birth weight
J Infect Dis. 181, 1740-1745

Miller L H, Smith J D (1998)
Motherhood and malaria
Nature Medicine 4/11, 1244-1245

Morita C T, Parker C M, Brenner M B, Band H (1994)
TCR Usage and Functional Capabilities of Human $\gamma\delta$ T Cells at Birth
J Immunol 22, 3979-3988

Plebanski M, Hill A V S (2000)
The immunology of malaria infection
Curr Opin Immunol. 12, 437-441
Okoko B J, Ewere G, Ota M O
The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis
Acta trop 87(2), 193-205

Shen Y, Zhou D, Qui L, Lai X, Simon M, Shen L, Kou Z, Wang Q, Jiang L, Estep J, Hunt R, Clagett M, Seghal P K, Li Y, Zeng X, Morita C T, Brenner M B, Letvin N L, Chen Z W (2002)

Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections

Science 295, 2255-2258

Sylla E H K, Kun J F J, Kremsner P G (2000)

Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon

Tran R Soc Trop Med Hyg 94, 652-656

Troye-Blomberg M, Worku S, Tangteerawatana P, Jamshaid R, Sonderstrom K, Elghazali G, Moretta L, Hammarstrom M, Mincheva-Nilsson L (1999)

Human gamma delta T cells that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the *P. falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules

Scand J Immunol 50, 642-650

Weatherall D J, Clegg J B Higgs D R, Wood W G (1995)

The Hemoglobinopathies 3417-3484

In: Scriver C R Beaudet A L, Sey W S, Valle D

The metabolic and molecular

Bases of inherited disease, Volume III (4605pp)

7.Auflage Mc Graw – Hill Inc, New York

Wilding E, Winkler S, Kremsner P G, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer W H (1995)

Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogooué, Gabon

Trop Med Parasitol. 46, 77-82

Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A, Graninger W, Kremsner P G (1998)

Reciprocal Regulation of Th1- and Th2- Cytokine-Producing T Cells during Clearance of Parasitemia in *P. falciparum* Malaria

Infect Immun 66/12, 6040-6044

World Health Organisation

<http://www.who.int/ctd/html/malariadat.html>

Xi G, Leke R G, Thuita L W, Zhou A, Leke R J, Mbu R, Taylor D W (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 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter Kremsner und Herrn Dr. Adrian J. F. Luty für die hervorragende Betreuung während der Arbeit in Lambaréné und bei der Auswertung der Daten in Tübingen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Labors in Lambaréné, die die Durchführung dieser Untersuchungen ermöglichten und insbesondere Ilka Engelmann für die Unterstützung während der gesamten Arbeit und die Hilfe beim Korrigieren.

9 Lebenslauf

Andrea Santamaria geb. Brückner

Geboren am 26.01.1969 in Berlin

Eltern Regina Gerlach, Versicherungsfachfrau
Uwe Brückner, Dipl.-Ingenieur

Schulbildung 1975-1983 Allgemeine Oberschule, Berlin
1983-1987 Heinrich-Hertz-Gymnasium, Berlin

Studium	1997-2004	Studium der Medizin an der Universität Tübingen
	03/1999	Physikum
	03/2000	Erstes Staatsexamen Medizin
	04/2002	Zweites Staatsexamen Medizin
	05/2002-04/2003	Forschungsaufenthalt am Hospital Albert Schweitzer in Lambaréné, Gabun
	2002-2003	Praktisches Jahr -1.Tertial (Innere Medizin) Hospital Albert Schweitzer, Université des Sciences de la Santé, Libreville, Gabon -2.Tertial (Pädiatrie) Hospital Albert Schweitzer, Université des Sciences de la Santé, Libreville, Gabon -3.Tertial (Chirurgie) Universitätsklinik, Tübingen
	05/11/2004	Drittes Staatsexamen Medizin