

INFEKTION MIT *PLASMODIUM FALCIPARUM*
IN DER SCHWANGERSCHAFT
Pathogenese, Immunologie und Impfstoffentwicklung

SYSTEMATISCHE ÜBERSICHTSARBEIT

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Johanna Seitz

geboren am 19. September 1991 in Nürnberg

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Udo Markert, Klinik für Geburtsmedizin, Universitätsklinikum Jena**
- 2. Prof. Dr. Jürgen Rödel, Institut für Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena**
- 3. Prof. Dr. Henning Schneider, Emeritus, ehemaliger Chefarzt der
Universitätsfrauenklinik Bern**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.03.2019

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT	Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (Artemisinin-based combination therapy)
AK	Antikörper
ANG	Angiopoetin
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
C5a	aktivierter Komplementfaktor 5
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSA	Chondroitinsulfat A
CSC	Chondroitinsulfat C
EMA	European Medicine Agency
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HA	Hyaluronsulfat
Hb	Hämoglobin
HLA	Humanes Leukozytenantigen (Human Leukocyte Antigen)
i.d.R.	in der Regel
IFN γ	Interferon gamma
IGF	Insuline-like Growth Factor
IgG/M	Immunglobulin G/M
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton (Atomare Masseneinheit)
K _D	Dissoziationskonstante
M.	Malaria
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
P.	Plasmodium
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PfEMP-1	<i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein-1
PGE2	Prostaglandin E2
sog.	sogenannte/s/r
SSW	Schwangerschaftswoche

Tab.	Tabelle
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor beta
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UN	United Nations
VAR2CSA	Variant surface antigen 2 Chondroitinsulfat A
VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
vgl.	vergleiche
VLP	Virusartige Partikel (virus-like particles)
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

Übersicht zu den unterschiedlichen Malariaformen

Tab. I Malariaerreger und Malariaformen

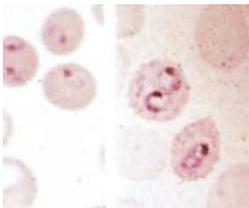
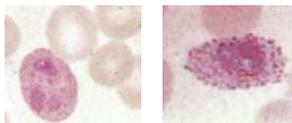
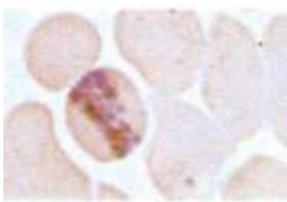
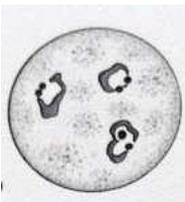
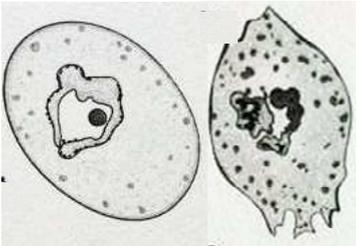
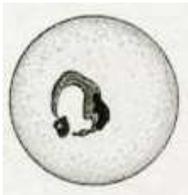
Erreger	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax, P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
Erkrankung	Malaria tropica	Malaria tertiana	Malaria quartana
Inkubationszeit	7 – 30 Tage (evtl. länger)	12 Tage bis > 1 Jahr	18 – 50 Tage (evtl. länger)
Dauer der Blutschizogonie	48 h (oft asynchron)	48 h (meist synchron)	72 h (meist synchron)
Fieberrhythmus	Irregulär	48 h*	72 h
Parasitämie	Unbegrenzt	Max. 2%	Max. 1 – 2%
Bevorzugte Erythrozyten	Alle	Junge (Retikulozyten)	Alte
Symptomatik	Irreguläres Fieber, Organkomplikationen	Fieber jeden 2. Tag*	Fieber jeden 3. Tag
Rezidive/ Rekrudescenz	Keine	Rezidive (Hypnozoiten)	Rekrudescenz
Diagnostik Mikroskopie: Trophozoit im Blutausstrich (Ringformen – amöboide Form)		 P. vivax P. ovale	
			
Therapie	ACT	ATC/ Chloroquin + Primaquin (gegen Hypnozoiten)	ACT/ Chloriquin

Tabelle nach Löscher und Burchard 2010, Abbildungen aus „Atlas of Tropical Medicine and Parasitology“ (Peters und Pasvol 2006), ACT: Artemisinin-basierte Kombinationstherapie, h: Stunde, *bei *P. vivax* und bei zwei verschiedenen Parasitengenerationen auch tägliches Fieber möglich

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
Übersicht zu den unterschiedlichen Malariaformen.....	IV
Inhaltsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Malaria.....	3
2.1.1 Definition und Klassifikation.....	3
2.1.2 Entwicklungszyklus der Plasmodien.....	4
2.1.3 Epidemiologie	6
2.1.4 Allgemeine Pathogenese.....	7
2.1.5 Immunologie	10
2.1.6 Klinisches Bild	12
2.1.7 Diagnostik.....	13
2.1.8 Therapie	14
2.1.9 Bekämpfung und Prävention	16
2.2 Schwangerschaft	17
2.2.1 Die Plazenta	17
2.2.2 Immunologie der Schwangerschaft	20
2.3 Antikörper und aktive Immunisierung.....	22
2.3.1 Antikörper: Struktur, Antigenbindung und Funktion	22
2.3.2 Aktive Immunisierung	25
2.4 Malaria und Schwangerschaft.....	29
2.4.1 Epidemiologie	30
2.4.2 Folgen für Mutter und Kind	31
2.4.3 Infektion mit <i>P. vivax</i> in der Schwangerschaft	33
2.4.4 Diagnostik, Therapie und Prävention.....	34
3 Ziele der Arbeit	36
4 Methoden	38
5 Ergebnisse.....	40
5.1 Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta	40
5.1.1 Chondroitinsulfat A: Funktion, Vorkommen und Struktur.....	41
5.1.2 VAR2CSA: Struktur, Funktion und Polymorphismus	43
5.1.3 Interaktion von VAR2CSA und CSA	47

5.1.4	Weitere relevante Bindungsstrukturen.....	51
5.2	Pathogenese und Folgen der plazentaren Inflammation.....	53
5.2.1	Histologische Veränderungen der Plazenta	53
5.2.2	Plazentare Entzündungsreaktion.....	54
5.2.3	Pathogenese des erniedrigten Geburtsgewichts	57
5.2.4	Pathogenese der mütterlichen Anämie.....	60
5.3	Entwicklung einer natürlichen Immunität gegen Malaria in der Schwangerschaft	63
5.3.1	Korrelation von Parität mit Parasitämie und klinischen Parametern	63
5.3.2	Korrelation von natürlichen Antikörpern mit Parität, parasitologischen und klinischen Parametern	65
5.3.3	Analyse der natürlichen Antikörper gegen VAR2CSA	68
5.3.4	Weitere relevante Antikörper	72
5.4	Identifizieren von immunogenen Epitopen innerhalb von VAR2CSA.....	74
5.4.1	Induktion von Antikörpern gegen einzelne Domänen von VAR2CSA....	74
5.4.2	Induktion von Antikörpern gegen Multidomänen von VAR2CSA.....	78
5.4.3	Studiendesign und Probleme des Studienvergleiches.....	81
6	Diskussion	84
6.1	Grundlagenforschung	86
6.1.1	VAR2CSA als Impfstoffkandidat.....	86
6.1.2	Plazentare Inflammation.....	89
6.1.3	Entwicklung einer natürlichen Immunität	92
6.2	Immunogene Regionen von VAR2CSA als Impfstoffkandidaten	93
6.2.1	Der N-terminale Bereich als Basis eines Impfstoffes.....	93
6.2.2	Kombination mit weiteren Bereichen von VAR2CSA.....	97
6.2.3	Kombination von verschiedenen Genotypen	101
6.2.4	Verwenden von virusartigen Partikeln als Träger für einen Impfstoff...	102
6.3	Weitere Herausforderungen und Blick in die Zukunft.....	102
7	Schlussfolgerung	104
8	Literatur- und Quellenverzeichnis	105
9	Anhang.....	135
	Abbildungsverzeichnis.....	135
	Tabellenverzeichnis.....	136
	Überblick Boxen	137
	Ehrenwörtliche Erklärung	139

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Malaria während der Schwangerschaft stellt in tropischen und subtropischen Gebieten noch immer eine besondere medizinische Herausforderung dar. Von den fünf humanpathogenen Erregerarten führt vor allem die Infektion mit *Plasmodium falciparum* zu fulminanten Verläufen mit massiver Beeinträchtigung der Schwangerschaft. Schwere Anämie der Mutter und Fehl-/Totgeburt sowie erniedrigtes Geburtsgewicht beim Kind sind häufige Komplikationen, die jährlich zu 10.000 mütterlichen und 200.000 perinatalen Todesfällen führen. Die Entdeckung, dass *P. falciparum* über die Expression des Oberflächenantigens VAR2CSA in der Plazenta adhären kann und Frauen in Endemiegebieten mit zunehmender Schwangerschaftszahl (Parität) eine gewisse Immunität gegen VAR2CSA-tragende Parasiten entwickeln, hat das Verständnis der Schwangerschaftsmalaria neu geprägt und lässt die Frage nach der Entwicklung eines effektiven Impfstoffes aufkommen. Die folgende Arbeit gibt einen Überblick über pathogenetische und immunologische Vorgänge bei Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft. Darauf aufbauend werden Möglichkeiten sowie Probleme und Herausforderungen im Bereich der Impfstoffentwicklung diskutiert.

Methoden: Eine Literaturrecherche zum Thema „Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft“ wurde in Form einer systematischen Übersichtsarbeit durchgeführt, wobei der Schwerpunkt auf den Gebieten Pathogenese, Immunologie und Impfstoffforschung lag. Als Hauptliteraturquelle diente die medizinische Onlinedatenbank PubMed. Außerdem wurden medizinische Fachbücher sowie aktuelle Berichte, Empfehlungen und Leitlinien der WHO hinzugezogen.

Ergebnisse: Plazentare *P. falciparum*-Stämme exprimieren das Oberflächenantigen VAR2CSA auf den infizierten Erythrozyten, welches spezifisch an Chondroitinsulfat A (CSA) im intervillösen Raum der Plazenta bindet. Die Adhäsion infizierter Erythrozyten führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die das immunprotektive Milieu beeinflusst, Plazentawachstum und Nährstofftransport beeinträchtigt und fetale Entwicklungsstörungen begünstigt. Ein erhöhter Erythrozytenabbau in Kombination mit einer verminderten bzw. gestörten Erythrozytenneubildung trägt zur Entwicklung der mütterlichen Anämie bei. In Endemiegebieten nimmt mit zunehmender Parität die Häufigkeit von plazentaren wie peripheren Parasitämien ab. Dies wird auf die Bildung

von Antikörpern gegen VAR2CSA-tragende Parasitenstämme zurückgeführt. Solche Antikörper sind (I) geschlechtsspezifisch und paritätsabhängig, (II) mit verminderten Infektions- und Komplikationsraten assoziiert, (III) kreuzreaktiv gegen verschiedene plazentare Stämme wirksam und hemmen (IV) *in vitro* die CSA-Bindung. VAR2CSA ist ein großes und komplex aufgebautes Oberflächenprotein, das aus mehreren Domänen mit zahlreichen Polymorphismen besteht. Daher steht die Identifizierung kleinerer immunogener VAR2CSA-Abschnitte, die eine effektive Immunantwort mit kreuzreaktiven und bindungshemmenden Antikörpern hervorrufen, im Zentrum der Impfstoffforschung. Mittels kinetischer Studien kann die minimale CSA-Bindungsregion in N-terminalen Multidomänen von VAR2CSA lokalisiert werden. Bei der Analyse der natürlichen Antikörper können keine Epitope ausfindig gemacht werden, die stärker immunogen sind als andere. In Labortieren hervorgerufene Antikörper zeigen, dass die Domäne DBL4 sowie N-terminale Multidomänen, wie DBL1-2 und ID1-ID2a, die CSA-Bindung *in vitro* hemmen können.

Diskussion und Schlussfolgerung: Da die aktuellen Präventionsmaßnahmen gegen Malaria in der Schwangerschaft einige Grenzen aufweisen, wäre eine Impfung ein guter Weg, um Frauen in Endemiegebieten effektiv vor Komplikationen zu schützen. Ein auf VAR2CSA-basierender Impfstoff bietet dabei einen vielversprechenden Ansatz. Allerdings stellen vor allem Größe und Polymorphismus des Proteins ein Hauptproblem dar. N-terminale Multidomänen, wie DBL1-2 und ID1-ID2a, haben sich in präklinischen Studien bewährt und sind Bestandteil zweier Impfstoffe, die sich in Phase I der klinischen Prüfung befinden. Da die natürliche Immunität aber höchstwahrscheinlich durch die Konfrontation mit verschiedenen VAR2CSA-Domänen und -Varianten entsteht, stellt sich die Frage, ob ein relativ kleiner Abschnitt eines einzigen Stammes eine ausreichende Immunantwort hervorrufen kann. Sollte die Wirkung der Impfstoffe bezüglich Bindungshemmung, Kreuzreaktivität oder Immunogenität nicht hinreichend sein, werden verschiedene Möglichkeiten der Impfstoffoptimierung herausgearbeitet. So könnten die N-terminalen Bereiche (I) mit weiteren Domänen, insbesondere DBL4, kombiniert, (II) aus mehreren Genotypen zusammengesetzt oder (III) an Träger, die eine potentere Immunantwort induzieren, wie virusartige Partikel (VLPs), gebunden werden. Intensive Grundlagenforschung, zahlreiche präklinische Studien und verschiedene Optimierungsoptionen geben Anlass zur Hoffnung, dass effektive Impfstoffe gegen Schwangerschaftsmalaria entwickelt werden können.

2 Einleitung

2.1 Malaria

„Malaria is preventable and curable.“

(WHO 2016c)

Malaria, die bedeutendste parasitäre und am weitesten verbreitete Infektionskrankheit der Menschheit, ist laut WHO vermeidbar und heilbar. Umfangreiche Programme zur Eindämmung von Malaria stützen diese Behauptung: zwischen den Jahren 2010 und 2015 sank die Inzidenz von Malaria um 21%, die Mortalität um 29% weltweit. Doch trotz rückläufiger Zahlen und guter präventiver sowie therapeutischer Maßnahmen sterben jährlich noch immer knapp eine halbe Millionen Menschen an dieser Krankheit. Neben Kindern sind schwangere Frauen eine besondere Risikogruppe (WHO 2016b).

2.1.1 Definition und Klassifikation

„Unter Malaria versteht man eine Gruppe von Infektionskrankheiten, die durch bestimmte, von Stechmücken der Gattung Anopheles übertragene Protozoen (Plasmodien) hervorgerufen werden und in der Regel einen typischen Fieberverlauf zeigen.“ (Winke 1993)

Protozoen sind einzellige, zellkernhaltige (eukaryote) Organismen, die bereits dem Tierreich zugeordnet werden (Hof und Dörries 2014). Zu den humanpathogenen Protozoen der Familie der Plasmodien gehören *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi*. Malaria tropica, verursacht durch *P. falciparum*, ist die mit Abstand häufigste und infolge lebensbedrohlicher Komplikationen gefährlichste Malariaform. Malaria tertiana mit meist typischem Fieber im 48-h-Rhythmus wird durch *P. vivax* und seltener durch *P. ovale* hervorgerufen, Malaria quartana mit Fieber im 72-h-Rhythmus durch *P. malariae* (Gill und Beeching 2011). Infektionen mit *P. falciparum* und *P. vivax* können in der Schwangerschaft zu schweren Komplikationen führen (McLean et al. 2015). *P. knowlesi*, eine erst 2004 als bedrohlich erkannte, in Südostasien vorkommende Plasmodienart, scheint bei Schwangeren dagegen keine Probleme zu verursachen (Barber et al. 2015, Singh et al. 2004). Auch Infektionen mit *P. ovale* und *P. malariae* besitzen in der Schwangerschaft nur bei Koinfektion mit *P. falciparum* klinische Relevanz (Williams et al. 2016a, Walker-Abbey et al. 2005).

Zyklus im Menschen: Schizogonie

Über die Blutbahn dringen die vorwiegend intrazellulär lebenden Sporozoiten schon nach kurzer Zeit aktiv in die Leberparenchymzellen ein. Hier vermehren sie sich mitotisch zu Schizonten (Gewebschizonie), aus denen wiederum je nach Plasmodienart 2.000 – 30.000 Merozoiten entstehen (Löscher und Burchard 2010). Eine Besonderheit sind die bei *P. vivax* und *P. ovale* vorkommenden Sporozoiten, die in einzelligem Ruhezustand in den Hepatozyten persistieren. Diese sog. Hypnozoiten können auch nach Wochen bis Jahren mit der Schizogonie beginnen und so die für Malaria tertiana typischen Rezidiven auslösen (Meyer 2007).

Die Merozoiten werden nun sukzessive aus den Hepatozyten in die Blutbahn abgegeben, wo sie die zirkulierenden Erythrozyten befallen. *P. falciparum* kann in alle Erythrozyten eindringen, während *P. vivax* und *ovale* vorwiegend junge Erythrozyten (Retikulozyten), *P. malariae* insbesondere alte Erythrozyten infizieren. Somit ist die Parasitämie bei Malaria tropica quantitativ nicht begrenzt (Löscher und Burchard 2010). Im Stroma der roten Blutzellen differenzieren die Merozoiten zu jungen Trophozoiten, die sich lichtmikroskopisch als typische Siegelringe mit zentraler Nahrungsvakuole und an den Rand gedrängten Kern darstellen. Die Trophozoiten entwickeln sich zu Blutschizonten, welche sich wiederum in mehrere Merozoiten teilen (Hof und Dörries 2014). Mit der Ruptur der Erythrozyten kommt es zur Freisetzung der Merozoiten, die erneut rote Blutzellen befallen. Daneben werden Gametozyten gebildet, die beim Stich von der Anophelesmücke aufgenommen werden und in ihr die sexuelle Fortpflanzung beginnen. Damit ist der Kreislauf der Malariaparasiten geschlossen (Winke 1993).

2.1.3 Epidemiologie

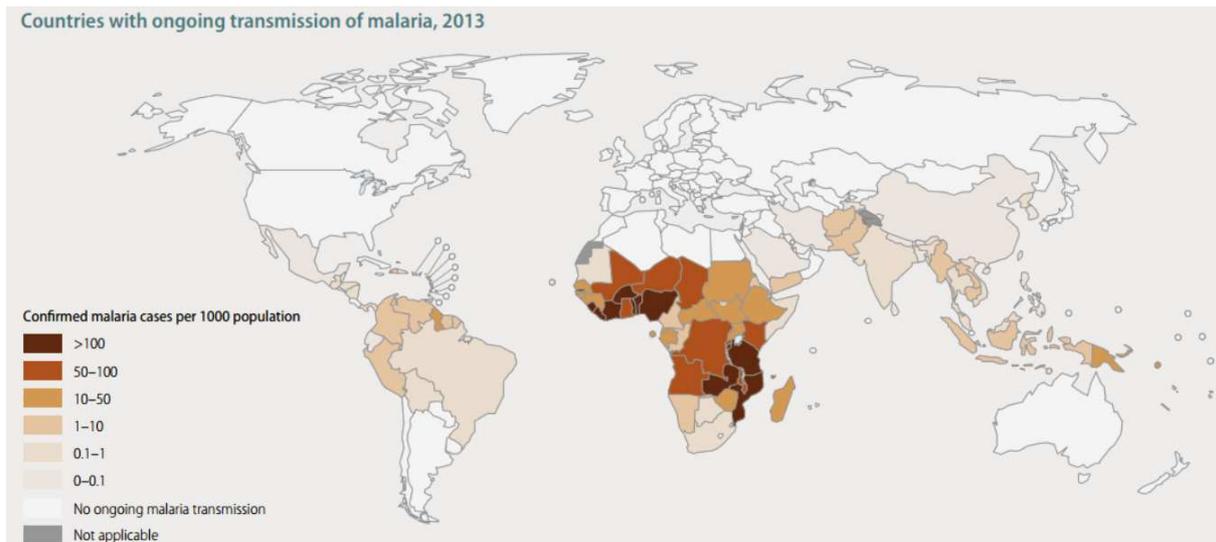


Abb. 2 Inzidenz der Malariaerkrankungen pro 1000 Einwohnern, 2013 (WHO 2014)

Dem „World Malaria Report 2014“ zufolge lebt mit derzeit ca. 3,3 Milliarden Menschen beinahe die Hälfte der Weltbevölkerung in Gebieten mit Malariatransmission. Über ein Drittel davon lebt unter „hohem Risiko“ (Erkrankungsinzidenz über 1/1000 pro Jahr) (WHO 2014). Im Jahr 2013 wurden von der WHO die Erkrankungen an Malaria auf etwa 198 Millionen, die Zahl der Todesfälle auf etwa 584.000 weltweit geschätzt. Betroffen sind vor allem Kinder unter fünf Jahren und schwangere Frauen in der Subsahara-Region (WHO 2014). Malaria tropica, verursacht durch *P. falciparum*, macht weltweit 70 – 80%, in Afrika sogar 90% der Malariainfektionen aus und ist für beinahe alle Todesfälle verantwortlich (Löscher und Burchard 2010). Abbildung 2 veranschaulicht die Malariainzidenz pro 1000 Einwohner im Jahr 2013 (WHO 2014).

Zur klassischen Endemizitätsbestimmung dient die sogenannte Milzrate. Da die Milz maßgeblich an der Eliminierung infizierter roter Blutzellen beteiligt ist, ist die Splenomegalie ein typisches Merkmal bei Malariainfektion. Der prozentuale Anteil an Zwei- bis Neunjährigen mit tastbar vergrößerter Milz bestimmt die Einteilung in hypo-, meso-, hyper- und holoendemische Regionen. Daneben wird auch zwischen Gebieten mit „Stabiler Malaria“ (hohe, ganzjährige Transmission) und „Instabiler Malaria“ (niedrige, saisonal schwankende Transmission) unterschieden. Regionen mit Stabiler Malaria entsprechen hyper- und holoendemischen Gebieten, in denen während der Kindheit eine gewisse Immunitätsbildung beobachtet wird. Regionen mit Instabiler Malaria sind vergleichbar mit meso- und hypoendemischen Bereichen; die Immunität der Bevölkerung ist hier eher gering (vgl. Tab. 1) (Löscher und Burchard 2010).

Tab. 1 Epidemiologische Einteilung von Malariagebieten, angelehnt an Löscher und Burchard 2010

Malariaendemizität	Milzrate (%)*	Stabilität	Immunität
Hypoendemisch	0 – 10	Instabil	Meist nichtimmun
Mesoendemisch	11 – 50		Gemischte Immunität
Hyperendemisch	51 – 75	Stabil	Meist semiimmun
Holoendemisch	> 75		

*prozentualer Anteil an Zwei- bis Neunjährigen mit tastbar vergrößerter Milz

2.1.4 Allgemeine Pathogenese

Die Interaktionen zwischen den Parasiten und dem Wirt sind komplex. Als zentrale pathogenetische Vorgänge werden die Erythrozyteninvasion, der Parasitenmetabolismus und die Endotheladhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten nachfolgend genauer untersucht. Daneben spielt auch die Reaktion des Körpers auf den Erreger eine entscheidende Rolle (Miller et al. 2013).

Erythrozyteninvasion und Erythrozytenruptur

Frei im menschlichen Blut zirkulierende *P. falciparum*-Merozoiten binden an Glycophorin A auf der Erythrozytenoberfläche und dringen in mehreren Schritten in die Blutkörperchen ein (Löscher und Burchard 2010). Dabei spielen zahlreiche weitere Interaktionen und Signaltransduktionswege eine Rolle. Parasitären Liganden, wie beispielsweise RH5 (reticulocyte homology 5), parasitäre Peptide, wie RON2 (rhytry neck protein 2) und AMA1 (apical membrane antigen 1), oder die parasitäre Proteinkinase A (PKA) sind laut Miller et al. an der Penetration beteiligt und eignen sich als mögliche Strukturen für künftige Antimalariamedikamente (Miller et al. 2013). Bei der Erythrozytenruptur werden neben den Merozoiten sog. Malariatoxine wie Hämozoin (sog. Malariapigment) und GPI (Glycosylphosphatidylinositol) freigesetzt. Sie werden von Endothel- und Immunzellen über spezifische Rezeptoren, sog. Toll-like Rezeptoren, erkannt und lösen eine Entzündungsreaktion des Körpers aus (Ndungu et al. 2005). Die dabei sezernierten proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 werden für die Fieberanfälle verantwortlich gemacht (Warrell und Gilles 2002). Zusätzlich werden bei der intravasalen Hämolyse Substanzen frei, die die Stickstoffmonoxid-Bildung (NO-Bildung) behindern. NO ist ein wichtiger Regulator des Gefäßtonus, der Gefäßintegrität sowie der Koagulation und Inflammation (Alberts et al. 2011). Eine verminderte Bioverfügbarkeit kann folglich zu endothelialer Dysfunktion führen und zur Pathogenese eines schweren Verlaufs beitragen (Miller et al. 2013).

Parasitenmetabolismus

Die Energie und Bausteine für ihre Proteinsynthese beziehen die Parasiten aus dem proteolytischen Abbau des Hämoglobins im Erythrozytenstroma. Dabei entsteht für die Plasmodien toxisches Hämatin (Fe(III)-protoporphyrin IX), das sie sofort in atoxisches kristallines Hämozoin (sog. Malariapigment) umwandeln (Cook 1996). Dieser essentielle Prozess bietet eine Bandbreite von Angriffspunkten für Antimalariamittel. Bekannte Medikamente wie Chloroquin und Piperaquin sowie Chinin, Mefloquin und Lumefantrin greifen aktiv in diesen Vorgang ein (Mutschler et al. 2012). Parasiten-spezifische Organellen, Nährstoffkanäle und Proteinkinasen werden aktuell als potentielle, neue Angriffsstellen genauer untersucht (Miller et al. 2013).

Endotheladhäsion *P. falciparum* infizierter Erythrozyten

P. falciparum bewirkt die Expression von hoch variablen Oberflächenantigenen, die der Erythrozyt in seine Membran einbaut. Das bekannteste dieser Antigene ist das „*P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1“ (PfEMP-1). Es dient der Zytoadhärenz infizierter Erythrozyten am Endothel und somit der Umgehung ihrer Eliminierung in der Milz (Hviid und Jensen 2015). Abb. 3 zeigt gemeinsame Struktur motive des variablen Proteins (Smith et al. 2001, Ndungu et al. 2005).



Abb. 3 Aufbau von *P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1, PfEMP-1 (Smith et al. 2001)

NTS: N-terminales Segment, DBL1-5/ α - ϵ : Duffy-binding-like Domänen 1-5/ α - ϵ , CIDR α / β : zysteinreiche Interdomänen α / β (cysteine-rich interdomain region α / β), C2: konstante Domäne 2 (constant 2), TM: Transmembrandomäne, ATS: saures terminales Segment (acidic terminal segment)

Die intrazelluläre Domäne ATS ist hoch konserviert und verankert das Protein in der Erythrozytenmembran. Der extrazelluläre Teil ist äußerst variabel, wird aber von vier Strukturmotiven geprägt: mehrere Duffy-binding-like Domänen (DBL; α - ϵ), eine oder zwei zysteinreiche Interdomänen (CIDR; α , β), eine konstante Domäne (C2) und ein N-terminales Segment (NTS) (Ndungu et al. 2005). PfEMP-1 wird von ca. 60 verschiedenen Genen (sog. var-Genen) codiert, von denen immer nur eines zur selben Zeit exprimiert wird. Mit jedem Zyklus kommt es zu epigenetischen Modifikationen. Kleine Subpopulationen der Parasiten können zusätzlich auf die Expression alternativer Formen von PfEMP-1 umschalten („switching“), sobald das Immunsystem Antikörper gegen das bei der Population aktuell vorliegende PfEMP-1-Protein

entwickelt (Pasternak und Dzikowski 2009, Paget-McNicol et al. 2002). Über die Adhäsionsdomänen des PfEMP-1 binden infizierte Erythrozyten an endotheliale Rezeptoren wie CD36 (cluster of differentiation 36) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) oder an plazentare Rezeptoren wie CSA (Chondroitinsulfat) (vgl. Abb. 4). Dadurch akkumulieren sie in peripheren Blutgefäßen, im Gehirn und in der Plazenta und entziehen sich so der Eliminierung in der Milz. Dieser Vorgang wird als **Sequestration** bezeichnet (Smith et al. 2001). Zudem besitzen infizierte Erythrozyten die Fähigkeit, an nicht-infizierte über Rezeptoren wie beispielsweise CR1 (Complementrezeptor 1) oder IgM (Immunglobulin M) zu binden (Schmidt et al. 2015, Stevenson et al. 2015) (vgl. Abb. 4). Dieser als **Rosetting** bezeichnete Prozess kann zu Mikroobstruktion führen, er schirmt die infizierten Erythrozyten vor Antikörpern ab und erleichtert die Reinvation in die umliegenden nicht-infizierten Erythrozyten (Wang und Hviid 2015). Sequestration, Rosetting und hämodynamische Veränderungen der Erythrozyten führen zu mikrovaskulären Zirkulationsstörungen und endothelialer Dysfunktion. Unter anderem bedingt durch die reaktive Inflammation des Körpers kann es zum Verlust der Gefäßintegrität und zur Aktivierung der Koagulation kommen (Miller et al. 2013, Riedl et al. 2016). Diese Prozesse sind charakteristisch für schwere Verläufe wie bei zerebraler und schwangerschaftsassoziierter Malaria (Kraemer und Smith 2006).

In der Schwangerschaft bindet eine spezielle Variante des PfEMP-1, das sog. VAR2CSA-Protein, an Chondroitinsulfat A in der Plazenta (Pasternak und Dzikowski 2009). Beim Vorhandensein einer Plazenta switcht eine *P. falciparum*-Subpopulation auf die Expression des var2csa-Gens, eines der 60 var-Gene von PfEMP-1, um (Scherf et al. 1998). Die genauen Mechanismen hierfür sind noch nicht vollständig verstanden. Das var2csa-Gen scheint einen eigenen regulatorischen Bereich, der die Information für die aktive Hemmung der Proteintranslation bei nicht-schwangeren Personen enthält, zu besitzen; außerhalb der Schwangerschaft wird somit kein VAR2CSA exprimiert (Amulic et al. 2009, Kraemer et al. 2007). Spezielle Initiations- und Translationsfaktoren, wie beispielsweise der „*P. falciparum* translation enhancing factor“ (PTEF), scheinen durch Reize aus der Umwelt diesen Prozess zu beeinflussen und die Translation von VAR2CSA in Anwesenheit einer Plazenta zu fördern (Bancells und Deitsch 2013, Chan et al. 2017). Auf die Struktur und Funktion von CSA und VAR2CSA wird in den Kapiteln 5.1.2 und 5.1.3 näher eingegangen.

Abb. 4 veranschaulicht die verschiedenen Interaktionen.

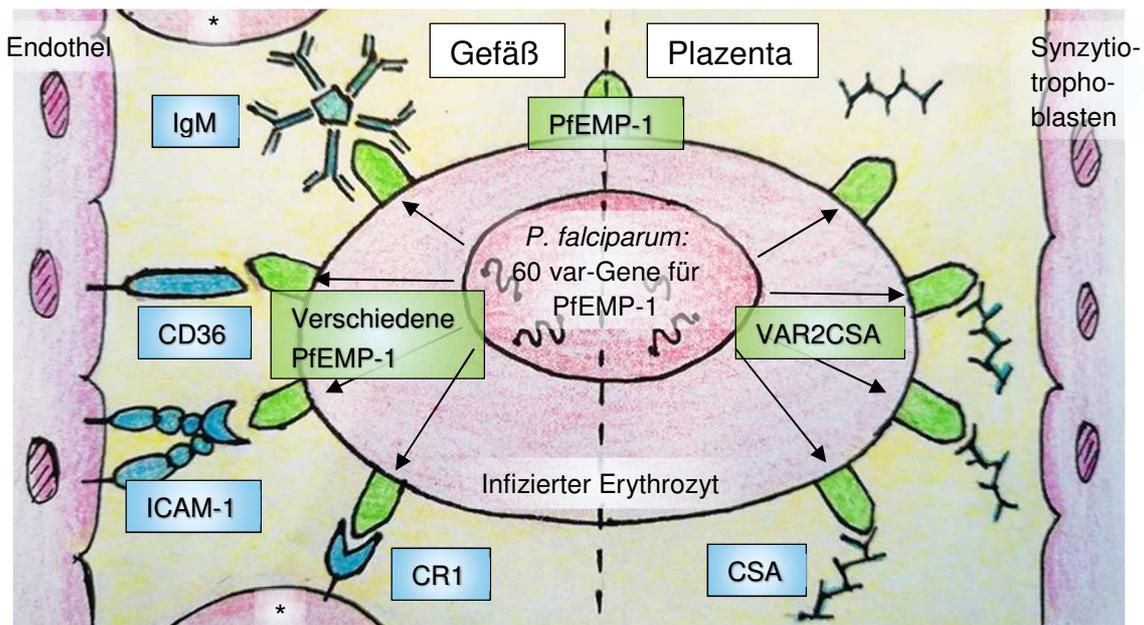


Abb. 4 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen PfEMP-1 und verschiedenen endothelialen und placentaren Rezeptoren.

P. falciparum-infizierte Erythrozyten exprimieren PfEMP-1 auf ihrer Oberfläche. Dieses bindet an endotheliale Rezeptoren wie CD36 (cluster of differentiation 36) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), sodass es zu „Sequestration“ in peripheren - auch zerebralen - Gefäßen kommen kann. Über Rezeptoren wie CR1 (Komplementrezeptor 1) und IgM (Immunglobulin M) kann PfEMP-1 zudem an nicht-infizierte Erythrozyten binden, was als „Rosetting“ bezeichnet wird. Beim Vorhandensein einer Plazenta kommt es durch exogene Reize zur Expression von VAR2CSA, einer speziellen Variante von PfEMP-1, die an CSA (Chondroitinsulfat) in der Plazenta binden kann. * nicht-infizierter Erythrozyt

2.1.5 Immunologie

Eine Reihe von angeborenen Erkrankungen, die eine Veränderung im Aufbau der Erythrozyten bedingen, führen zu einer gewissen natürlichen Resistenz gegenüber Malaria. An erster Stelle ist hier die Sichelzellanämie zu nennen, die in Afrika gehäuft beobachtet wird - vermutlich aufgrund eines Selektionsvorteils von heterozygoten Trägern bei Malariainfektion (Cholera et al. 2008, Malowany und Butany 2012). Weitere genetisch bedingte Variationen, die eine partielle Resistenz bewirken, sind die Thalassämie (Gendefekt mit verminderter Globinkettenbildung), Hämoglobinopathien (HbC und HbE) und ein Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (Löscher und Burchard 2010). Auch fetales Hämoglobin (HbF) schützt in Kombination mit diaplazentar übertragenen maternalen Antikörpern das Neugeborene in den ersten Lebensmonaten weitestgehend vor Malaria. Amaratunga et al. zeigen, dass HbF durch Veränderung von PfEMP-1 die Zytoadhärenz der infizierten Erythrozyten behindern kann (Amaratunga et al. 2011). Als einzige vollständige Resistenz gegenüber *P. vivax*-

Infektionen galt lange Zeit das Fehlen des Duffy-Blutgruppenantigens (Fy(a-b-)), das *P. vivax* zum Eindringen in die roten Blutkörperchen benötigt. Neuere Studien belegen jedoch, dass *P. vivax*-Malaria auch bei Duffy-negativen Bevölkerungsgruppen auftreten kann (Woldearegai et al. 2013, Mendes et al. 2011).

Weiterhin sind viele komplexe Abwehrmechanismen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems an der Bekämpfung der Malaria beteiligt. In Gebieten mit hyper- bis holoendemischer Malariatransmission wird im Kindesalter unter ständigen Neuinfektionen die Entwicklung einer Teilimmunität beobachtet (Cook 1996, Hviid 2005). Da es sich hierbei um sehr langsame Prozesse mit ständig erhöhten Parasitenraten handelt, ist die Kindersterblichkeit in diesen Regionen sehr hoch und kann bis zu 20% betragen (WHO 2014). Auch Frauen in Hochendemiegebieten sind trotz bereits erworbener Teilimmunität in ihrer ersten Schwangerschaft wieder anfälliger für Infektionen (McLean et al. 2015). Welche Mechanismen genau zur Bildung einer Teilimmunität führen, ist in vielen Punkten noch unklar (Stanisic et al. 2015). Folgende Komponenten scheinen jedoch beteiligt zu sein:

- Bildung von spezifischen und kreuzreaktiven Antikörpern gegen verschiedene PfEMP-1-Oberflächenantigene (Bull und Marsh 2002, Chattopadhyay et al. 2003, Hviid 2005); folglich kommt es zu einer verminderten Sequestration und zu einem vermehrten Abbau in der Milz.
- Bildung von Antikörpern gegen Malariatoxine wie Hämozoin; dadurch werden Entzündungsreaktion und damit verbundene Organkomplikationen vermindert (Löscher und Burchard 2010, Tyberghein et al. 2014).
- Bildung von Antikörpern gegen Proteine von frei im Blut zirkulierenden Sporozoiten und Merozoiten (Sennang et al. 2014, Rouhani et al. 2015). Das Circumsporozoite-Protein (CSP), ein Oberflächenprotein der Sporozoiten, ist Bestandteil des bislang einzig zugelassenen Impfstoffes (RTS,S) gegen Malaria (Fernandez-Arias et al. 2015).

Das Hauptproblem bei der Immunitätsbildung und der Entwicklung von Impfstoffen ist, dass sich der Malariaparasit aktiv und passiv den natürlichen Abwehrmechanismen des Körpers entzieht. Durch Sequestration in der peripheren Blutbahn entgeht *P. falciparum* dem Eliminierungsprozess in der Milz, antigenetische Variationen erschweren die Antikörperbildung und zahlreiche Interaktionen zwischen infizierten Blutzellen und Zellen des Immunsystems führen zur Modulation der protektiven

Immunantwort (Ndungu et al. 2005). Zur Elimination von intrazellulären Erregern ist der Körper außerdem auf die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen angewiesen. Diese erkennen Peptide von infizierten Zellen, die von allen kernhaltigen Zellen mittels MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche präsentiert werden. Da die kernlosen Erythrozyten keine MHC-I-Moleküle und auch Hepatozyten nur verhältnismäßig geringe Mengen tragen, ist die Immunreaktion des Körpers auf Plasmodien-befallene Zellen begrenzt (Murphy et al. 2009).

Genetische Variationen sowie vielschichtige Reaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems auf Seiten des Wirts, antigenetische Vielfalt sowie zahlreiche Mechanismen zur Immunevasion auf Seiten des Erregers prägen die Immunologie der Malaria.

2.1.6 Klinisches Bild

Eine Zusammenfassung zu den verschiedenen Erregerarten und Malariaformen befindet sich in Tabelle I (Malariaerreger und Malariaformen), die der Arbeit vorangestellt ist. Im Folgenden wird nur die durch *P. falciparum* ausgelöste Malaria tropica näher erläutert.

Im Gegensatz zu den übrigen Malariaformen zeichnet sich die Malaria tropica nicht durch einen synchronen Fiebrerrhythmus aus, sondern durch irreguläre Fieberschübe (Warrell und Gilles 2002). Daneben können Allgemeinsymptome wie Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Myalgien und Durchfälle auftreten. Weiterhin sind als häufige Begleiterscheinungen Anämie und Hepatosplenomegalie zu beobachten (Parry et al. 2004). Die ersten Symptome treten ca. sieben bis 30 Tage nach Infektion auf. Der Krankheitsverlauf ist abhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und des Therapiebeginns sowie der Virulenz des Erregerstammes und der Suszeptibilität des Patienten. Bei frühzeitiger Behandlung können Komplikationen und Todesfälle meist verhindert werden und die Erkrankung heilt nach zwei bis vier Tagen ab (sog. unkomplizierte Malaria tropica) (Löscher und Burchard 2010). Insbesondere bei Nichtimmunen, Kleinkindern und Schwangeren können sich allerdings bereits nach wenigen Tagen lebensbedrohliche Organkomplikationen entwickeln. Die WHO definiert die sog. komplizierte Malaria tropica als das Auftreten einer oder mehrerer der folgenden Komplikationen unter *P. falciparum*-Parasitämie:

Bewusstseinsstörung, ausgeprägte Schwäche, mehrfache Krampfanfälle (>2 in 24h), Azidose (Basendefizit >8mmol/l), Hypoglycämie (Blutzucker <40mg/dl), schwere Anämie (Hb <7g/dl), Nierenversagen (Kreatinin >3mg/dl), Ikterus (Bilirubin >3mg/dl), Lungenödem, Spontanblutungen, Kreislaufversagen bzw. Schock, Hyperparasitämie (P. falciparum Parasitämie >10%) (WHO 2015b).

Bei nicht immunen Erwachsenen gehören zerebrale Malaria, respiratorische Insuffizienz und Nierenversagen zu den häufigsten Komplikationen. Bei Schwangeren stehen schwere Anämien, zerebrale Symptome, Lungenödeme und Hypoglykämien im Vordergrund. Zudem kann es zu massiver Beeinträchtigung der Schwangerschaft mit fetalen Entwicklungsstörungen, Früh-, Fehl- und Totgeburten sowie erhöhter Säuglingssterblichkeit kommen (Warrell und Gilles 2002).

2.1.7 Diagnostik

Da eine frühzeitige Diagnosestellung für Therapie und Prognose maßgeblich ist, ist jedes unklare Fieber in den Tropen so lange auf Malaria verdächtig, bis das Gegenteil erwiesen ist (Meyer 2007). Jeder klinische Verdacht soll vor Therapiebeginn durch einen diagnostischen Test (Mikroskopie oder Schnelltest) gesichert werden (WHO 2015b). Grundlage der Diagnostik bildet noch immer der direkte mikroskopische Erregernachweis mit Giemsa gefärbtem „Dicken Tropfen“ und Blutausstrich (WHO 2016a). Der „Dicke Tropfen“ dient als einfaches und schnelles Verfahren dem Screening von Nativblut; die Spezies-Differenzierung anhand der unterschiedlichen intraerythrozytären Morphologie folgt im Blutausstrich (Winke 1993). Neben der Mikroskopie kommt auch dem Malaria-Schnelltest eine immer größere Bedeutung zu (WHO 2015a). Er basiert auf dem immunchromatographischen Nachweis von Plasmodien-spezifischen Antigenen, wie das für *P. falciparum* spezifische „histidine rich protein 2“ (HRP-2) und die Plasmodien-Laktatdehydrogenase (pLDH) für alle humanpathogenen Erreger (Meyer 2007). Der Schnelltest hat den Vorteil, dass er einfach durchzuführen und leicht zu interpretieren ist sowie kosteneffizient verlässliche Ergebnisse liefert (Wongsrichanalai et al. 2007, WHO 2015a). Da allerdings niedrige *P. falciparum*-Parasitämien sowie nicht *P. falciparum*-Infektionen übersehen werden können und sich der Test nicht zur Verlaufskontrolle eignet, kann dieser die Mikroskopie nicht ersetzen (Laban et al. 2015, Löscher und Burchard 2010). Hinsichtlich Spezifität und Sensitivität erzielen molekularbiologische

Nachweisverfahren, wie beispielsweise die „real time-PCR“ (RT-PCR), die besten Ergebnisse (Roth et al. 2015, Khan et al. 2013). Allerdings sind diese Verfahren im Vergleich zu den vorherigen zeitaufwändig, kostenintensiv und erfordern hochqualifiziertes Personal, was ihre Anwendung in vielen Entwicklungsländern limitiert (Uneke 2008b).

2.1.8 Therapie

Die Therapie der Malaria richtet sich nach der Malariaart, dem Schweregrad der Infektion sowie dem Vorliegen von Medikamentenresistenzen. In allen Fällen, besonders in Regionen mit Resistenz gegen Chloroquin, empfiehlt die WHO als Mittel der Wahl eine Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT) (WHO 2015b). Für die Entdeckung von Artemisinin erhielt unter anderem die Chinesin Youyou Tu im Oktober 2015 den Nobelpreis für Medizin (The Nobel Assembly at Karolinska Institutet 2015). In Tabelle 2 befindet sich eine Zusammenstellung der empfohlenen Malariatherapie mit den fünf heute angewendeten ACT-Kombinationen. Die Artemisinin-Komponente wirkt schnell und gezielt gegen Plasmodien in den Erythrozyten (blutschizontozid) und gegen Gametozyten (gametozid), die zweite Medikamentenkomponente wirkt länger, beseitigt so die übrigen Blutschizonten und verhindert die Resistenzbildung gegen Artemisinin (Stefan 2015).

Therapie der unkomplizierten Malaria tropica:

Bei unkomplizierter Malaria tropica empfiehlt die WHO eine über drei Tage durchgeführte Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (WHO 2015b). Während des ersten Trimenons der Schwangerschaft wird aufgrund der fehlenden Datenlage bezüglich der Sicherheit von ACT-Präparaten aktuell eine siebentägige Therapie mit Chinin und Clindamycin empfohlen. Allerdings können immer mehr Studien zu diesem Thema keine negativen Folgen und eine zum Teil geringere Fehlgeburtsrate bei ACT-Präparaten feststellen, sodass ein baldiger Wechsel zu ACT auch im 1. Trimester zu erwarten ist (Moore et al. 2016, Manyando et al. 2015, McGready et al. 2012, Moshia et al. 2014). Für das 2. und 3. Trimenon ist gut belegt, dass ACT gegenüber herkömmlichen Präparaten hinsichtlich Effektivität und Verträglichkeit Vorteile bietet (Sinclair et al. 2009, Burger et al. 2016). Die Standardtherapie besteht nach Empfehlung der WHO aus der sechsmaligen Gabe von Artemether und Lumefantrin (WHO 2015b).

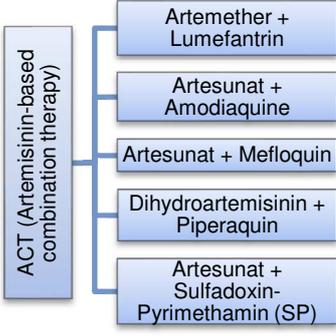
Therapie der komplizierten *Malaria tropica*:

Die Mortalitätsrate der unbehandelten schweren *Malaria tropica* liegt bei nahezu 100% und kann durch symptomatische Maßnahmen sowie hochwirksame Medikamente auf 10-20% gesenkt werden (WHO 2015b). Als Mittel der Wahl wird von der WHO die parenterale Gabe von Artesunat über 24h, gefolgt von einer dreitägigen Therapie mit oralen ACT-Präparaten, empfohlen. Falls Artesunat nicht verfügbar ist, kann alternativ Artemether oder Chinin intramuskulär gegeben werden (WHO 2015b). Neben dem Abtöten der Parasiten spielt die Behandlung der Komplikationen eine wichtige Rolle (Löscher und Burchard 2010). Schwangere Frauen erhalten dieselbe Therapie (WHO 2015b).

Therapie der *M. tertiana* und *M. quartana*:

In Regionen ohne Chloroquin-Resistenz wird mit Chloroquin oder ACT, in Regionen mit Resistenz nur mit ACT therapiert. Schwangere im 1. Trimenon sollen anstelle von ACT-Präparaten Chinin einnehmen (WHO 2015b). Bei Infektion mit *P. vivax* oder *P. ovale* wird zusätzlich eine 14-tägige Therapie mit Primaquin empfohlen, da Primaquin als einziges Medikament gegen Hypnozoiten wirksam ist und so Rezidiven vorbeugt (Mutschler et al. 2012). In der Schwangerschaft und Stillzeit sowie bei Kindern unter sechs Monaten ist Primaquin kontraindiziert (WHO 2015b).

Tab. 2 Übersicht über die von der WHO 2015 empfohlenen Malariatherapien

Malariaart	First-Line Therapie	Resistenzen o. Therapieversagen	Besonderheiten bei Schwangeren
Unkomplizierte <i>M. tropica</i>	3 Tage: eines der folgenden ACT 	Alternatives ACT	<u>1. Trimenon:</u> Chinin + Clindamycin (7 Tage) <u>2./3. Trimenon:</u> ACT (Artemether + Lumefantrin)
Komplizierte <i>M. tropica</i>	Artesunat (24h parenteral), dann ACT (3 Tage oral)	Arthemeter/ Chinin (intramuskulär)	Vgl. First-Line
<i>M. tertiana</i>	Chloroquin/ACT + Primaquin (gegen Hypnozoiten)	Alternatives ACT	KEIN Primaquin <u>1. Trimenon:</u> Chinin
<i>M. quartana</i>	Chloroquin/ACT		<u>2./3. Trimenon:</u> ACT

2.1.9 Bekämpfung und Prävention

Um die Malaria weltweit einzudämmen, ist es wichtig, an vielen verschiedenen Stellen anzusetzen. Die adäquate Behandlung Einzelner, die Kontrolle des Vektors und die Entwicklung wirksamer Impfstoffe spielen dabei eine zentrale Rolle.

Voraussetzung für eine schnelle Therapie sind flächendeckende Einrichtungen und die Verfügbarkeit von guten diagnostischen und therapeutischen Mitteln, die innerhalb von 24 – 48 h ab Beginn der Malariasymptome erreichbar sein sollten (WHO 2015b). Der Einsatz von mit Insektiziden imprägnierten Moskitonetzen (insecticide-treated nets, ITN), - als Kombination aus physischer Barriere und insektiziden Effekten - trägt vor allem bei Schwangeren und Kindern maßgeblich zur Reduktion der Malariainzidenz bei. Freier Zugang und flächendeckende Nutzung bleiben wichtige Ziele der WHO (WHO 2013). Daneben spielen die Anwendung von Insektiziden und das Trockenlegen von Feuchtgebieten zur Vektorkontrolle eine wichtige Rolle (Löscher und Burchard 2010).

Intensiv wird an der Entwicklung von wirksamen Impfstoffen gegen Malaria geforscht. Der bisher vielversprechendste Wirkstoff, RTS,S/AS01, konnte in einer Phase III-Studie in sieben afrikanischen Ländern eine Reduktion der *P. falciparum*-Infektionen bei Babys und Kleinkindern von 26 - 36% über einen Zeitraum von vier Jahren zeigen (Agnandji et al. 2015). Nach Einschätzung der Europäischen Arzneimittel Agentur überwiegt trotz der eher niedrigen Effektivität der Nutzen gegenüber den Risiken (EMA 2015). Die Impfung ist allerdings als komplementär zu sehen und kann herkömmliche Bekämpfungsmaßnahmen nicht ersetzen (Benstetter 2015).

Zahlreiche Initiativen zur Kontrolle und Bekämpfung der Malaria haben zur Reduktion der Inzidenz und Mortalität bis 2015 beigetragen. Unter den bekanntesten sind Programme der Vereinten Nationen (Millenniumsziele der UN), der WHO und der Roll Back Malaria Partnership (RBM). Neue Ziele bis 2030 sind unter anderem die Reduktion der Malariainzidenz und –mortalität um mind. 90% sowie die vollständige Malaria-Eliminierung aus mind. 35 Ländern (RBM 2015, WHO 2015c).

„Zwischen 2000 und 2015 sank die weltweite Malaria-Inzidenzrate um schätzungsweise 37 Prozent, die weltweite Sterblichkeitsrate um 58 Prozent. Damit ist das globale Millenniumsziel für Malaria erreicht. [...] Dennoch ist die Malaria mit weltweit schätzungsweise 214 Millionen Fällen und 472.000 Todesfällen 2015 weiter eine große Herausforderung für die öffentliche Gesundheit. [...] Dauerhaftes politisches Engagement, eine berechenbare Finanzierung und strategische Investitionen in die Gesundheitssysteme, die Überwachung der Krankheit und neue Instrumente sind notwendig, um erneute Ausbrüche und die mit Malaria verbundene Krankheitslast in den kommenden Jahren zu reduzieren.“ (UN 2015)

2.2 Schwangerschaft

„Die Schwangerschaft ist der Zeitraum, in dem eine befruchtete Eizelle im Körper der Frau zu einem Kind heranwächst. Die Schwangerschaft dauert beim Menschen von der Befruchtung der Eizelle bis zur Geburt des Kindes durchschnittlich 267 Tage und wird in drei Abschnitte zu je drei Monaten aufgeteilt.“ (Moore und Persaud 1996)

Ein Verständnis über Aufbau und Funktion der Plazenta sowie über immunologische und hormonelle Vorgänge während der Schwangerschaft ist unerlässlich, um den Einfluss einer Infektion mit *P. falciparum* auf die Schwangerschaft zu verstehen.

2.2.1 Die Plazenta

„Die Plazenta stellt eine Art passive Filtermembran dar, die mütterliches und fetales Blut voneinander trennt, aber dennoch einen gegenseitigen physiologischen Austausch ermöglicht.“ (Moore und Persaud 1996)

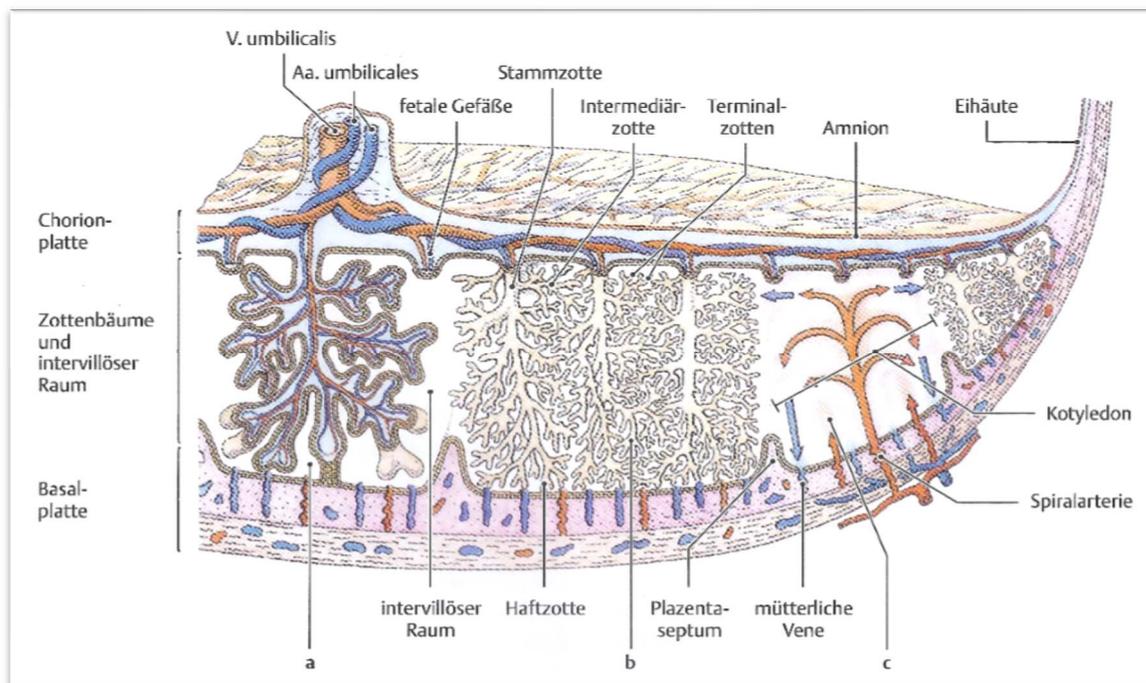


Abb. 5 Aufbau der Plazenta (Ulfig 2005)

a) junge Plazenta (ca. 4 Wochen); **b)** reife Plazenta (ab 4. Monat); **c)** Aufbau eines Kotyledons
fetale Komponente: Chorionplatte und Zottenbäume; mütterliche Komponente: Basalplatte und intervillöser Raum.

Aufbau und Entwicklung

Die Plazenta gliedert sich in eine fetale und eine mütterliche Komponente, wobei der fetale Anteil aus Chorionplatte und Zottenbäumen, der maternale Anteil aus Basalplatte und intervillösem Raum besteht (vgl. Abb. 5) (Ulfig 2005).

Die Chorionplatte grenzt an die Fruchtblase (Amnionhöhle) und wird aus Amnionepithel, Bindegewebe und fetalen Ernährungszellen (Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten) gebildet. In der Bindegewebsschicht verlaufen die Nabelschnurgefäße, die sich verzweigen und als kleine Äste in die Zottenbäume ziehen. Die kindlichen Zotten ragen in den intervillösen Raum, der von mütterlichem Blut durchströmt wird. Zwischen mütterlichem und fetalem Blutkreislauf liegt die Plazentaschranke, die für den kontrollierten Stoffaustausch zuständig ist. Bis etwa zur 20. Woche besteht sie aus vier Schichten: einer Synzytiotrophoblastenschicht an der Oberfläche der Zotten, einer Zytotrophoblastenschicht, dem Zottenbindegewebe und dem Endothel der fetalen Blutgefäße. Zur Effizienzsteigerung des fetero-maternalen Austausches nimmt die Schrankendicke im weiteren Verlauf durch Zytotrophoblastendegeneration und Verlagerung der Kapillaren direkt unter den Synzytiotrophoblasten immer weiter ab (Moore und Persaud 2007). Im Zottenbindegewebe lassen sich zudem plazentaspezifische Makrophagen, sogenannte Hofbauerzellen, und homogenes extrazelluläres Material (sog. Fibrinoid) an Stellen von degenerierten Synzytiotrophoblasten ausmachen (Ulfig 2005).

Das mütterliche Blut gelangt über Spiralarterien des Endometriums in den intervillösen Raum, umfließt die fetalen Zottenbäume, an denen es zum fetero-maternalen Stoffaustausch kommt, und drainiert über Venen an der Basalplatte. Innerhalb der Basalplatte treffen fetales und mütterliches Gewebe an der sogenannten Verbindungszone zusammen: die extravillösen Zytotrophoblastenzellen (EVT) des Fetus dringen beim Plazentawachstum in die mütterliche Dezidua basalis, dem funktionell und strukturell umgebauten Endometrium, ein (Reister 2007).

Die Infiltration der Trophoblasten findet in der ersten Hälfte der Schwangerschaft sowohl über Gefäße (endovaskulär) als auch über das Interstitium statt und führt zum Remodelling mütterlicher uteriner Spiralarterien (Kaufmann et al. 2003). Dieser Vorgang ist essentiell für die plazentare Blutversorgung sowie die fetale Entwicklung und muss daher genau reguliert sein. Verschiedene Wachstums- und Angiogenesefaktoren, wie Insuline-like Growth Factor (IGF), Angiopoetin (ANG-1,

ANG-2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und sein löslicher Rezeptor (sVEGFR), tragen unter anderem zum kontrollierten Wachstum der Plazenta bei (Umbers et al. 2011a, Umbers et al. 2011b). Veränderte Konzentrationen dieser Faktoren und eine gestörte Trophoblasteninvasion werden mit intrauteriner Wachstumsretardierung und Präeklampsie assoziiert (Silver et al. 2010, Kaufmann et al. 2003, Lala und Chakraborty 2003, Conroy et al. 2013, Umbers et al. 2011b).

Am Ende einer gesunden Schwangerschaft hat die Plazenta die Form einer Scheibe mit 15 – 25 cm Durchmesser und etwa 3 cm Dicke und wiegt 500 – 600 g. Auf der mit Amnion bedeckten fetalen Seite ziehen kleine Gefäße zur Nabelschnur hin. Auf der mit Dezidua basalis bedeckten mütterlichen Seite lassen sich 15 – 20 erhabene Areale, die Kotyledonen, erkennen (Sadler 2014).

Funktion

Die Hauptaufgaben der Plazenta bestehen im Stoff- und Gasaustausch, in mechanischer Barrierefunktion und Hormonproduktion.

Über die Plazentaschranke werden zur Versorgung des Fetus Sauerstoff und Nährstoffe wie Glucose, Aminosäuren, Vitamine und Eisen transportiert, während Abfallprodukte des Fetus wie Kohlendioxid, Harnstoff und Harnsäure in den mütterlichen Kreislauf eliminiert werden. Spezielle Transporter wie GLUT-1 für Glucose und verschiedene Aminosäure-Transporter sorgen für einen gerichteten Nährstoffaustausch. Auch maternale IgG-Antikörper können die Plazentaschranke überwinden und dem Neugeborenen eine gewisse passive Immunität verleihen. Neben Stoff- und Gastransport besitzt die Plazenta Barrierefunktion und dient dem Schutz vor mechanischen und infektiösen Schäden (Moore und Persaud 2007).

Außerdem fungiert die Plazenta als endokrines Organ und synthetisiert in den Synzytiotrophoblasten eigene Protein- und Steroidhormone. Das in der Plazenta gebildete humane Choriongonadotropin (hCG) ist für die Stimulation des Gelbkörpers (Corpus luteum) zuständig, der unter anderem Progesteron bildet, bis die Plazenta am Ende des 1. Trimenons selbst diese Aufgabe übernimmt. Progesteron wirkt als sogenanntes Schwangerschaftsschutzhormon insgesamt wehenhemmend und schwangerschaftserhaltend. Östrogene wie Estriol und Estradiol induzieren typische Schwangerschaftsveränderungen und dienen der Vorbereitung auf die Geburt. Sie werden im Ovar, in der Nebennierenrinde und während der Schwangerschaft auch in der Plazenta gebildet (Reister 2007).

2.2.2 Immunologie der Schwangerschaft

Das Immunsystem nimmt während der Schwangerschaft eine besondere Rolle ein, denn einerseits muss es vor Infektionen schützen, andererseits darf es nicht zu einer Abstoßreaktion des Embryos kommen. Als sog. intrauterines Allotransplantat besteht der Embryo zu 50% aus väterlichen, fremden Erbanlagen und lässt daher eine Abwehrreaktion des mütterlichen Immunsystems erwarten (Moore und Persaud 2007). Eine entscheidende Komponente zur Nichtabstoßung bildet das antiinflammatorische und immunregulatorische Milieu in der Plazenta. Dieses wird durch eine vorübergehende Unterdrückung der Th-1-Immunantwort (T-Helfer-1-Antwort) zugunsten der Th-2-Antwort (T-Helfer-2-Antwort) erreicht (Robinson und Klein 2012).

Die **Th-1** Immunreaktion wird auch zelluläre Reaktion genannt, da sie mithilfe von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IFN γ und TNF zu einer Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen führt. Auf diese Weise können intrazelluläre Parasiten und Krebszellen leichter eliminiert werden (Murphy et al. 2009). Zur Abwehr von Infektionskrankheiten, wie beispielsweise Malaria, ist die Th-1-Antwort daher sehr wichtig. Andererseits ist die entzündungsfördernde, zelluläre Th-1-Reaktion für Abstoßungsreaktionen verantwortlich und wird daher zum Schutz des Embryos/Fetus unterdrückt (Robinson und Klein 2012). Eine zu starke Th-1-Immunantwort ist bei Mäusen nicht mit einer erfolgreichen Schwangerschaft vereinbar (Raghupathy 1997). Bei Menschen ist eine übermäßige Th-1-Reaktion mit spontanem Abort, Frühgeburt und mütterlicher Anämie assoziiert (Kwak-Kim et al. 2005). Im Blut von Frauen mit Neigung zu Aborten können zudem vergleichsweise höhere Th-1-Zytokine gemessen werden (Kwak-Kim et al. 2003, Makhseed et al. 2001).

Die **Th-2** oder humorale Immunreaktion stimuliert B-Zellen bzw. Plasmazellen und führt zur Antikörperproduktion (Murphy et al. 2009). Th-2-Zellen setzen dabei Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-10) frei, die auch implantations- und invasionsfördernd auf den Embryo wirken (Reister 2007). Weiterhin sorgen von der Plazenta lokal gebildete immunsuppressive Moleküle für ein immunprotektives Milieu, darunter IL-10, Prostaglandin E₂ (PGE₂) und der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF β). Es konnte gezeigt werden, dass PGE₂ aus der Dezidua die Aktivierung mütterlicher T-Zellen und NK-Zellen blockiert (Moore und Persaud 2007). Die Immunaktivität in der Plazenta wird außerdem von spezialisierten, sog. regulatorischen T-Lymphozyten (**T_{reg}**-Zellen) kontrolliert. Sie unterdrücken die Aktivierung von Immunreaktionen und

erhöhen die Selbsttoleranz (Murphy et al. 2009). Bereits im frühen ersten Trimester können sie erhöht im mütterlichen Blut nachgewiesen werden und akkumulieren in der Dezidua (Guerin et al. 2009). Eine verminderte Anzahl oder Funktionsstörungen wurden in mehreren Studien mit Komplikationen wie Fehlgeburt und Präeklampsie assoziiert (Aluvihare et al. 2004, Yang et al. 2008, Steinborn et al. 2008, Sasaki et al. 2007, Steinborn et al. 2012).

Induziert und kontrolliert werden die immunologischen Veränderungen auf transkriptioneller Ebene von den Schwangerschaftshormonen Estradiol, Estriol und Progesteron sowie von Glucocorticoiden (Robinson und Klein 2012). Besonders Progesteron wird eine antiinflammatorische Wirkung mit Unterdrückung der Th-1- und Förderung der Th-2-Immunantwort zugeschrieben (Piccinni et al. 2000). Durch Aktivierung von Glucocorticoidrezeptoren wirkt es zusätzlich entzündungshemmend (Jones et al. 2010). Abb. 6 fasst die wichtigsten immunologischen Veränderungen zusammen.

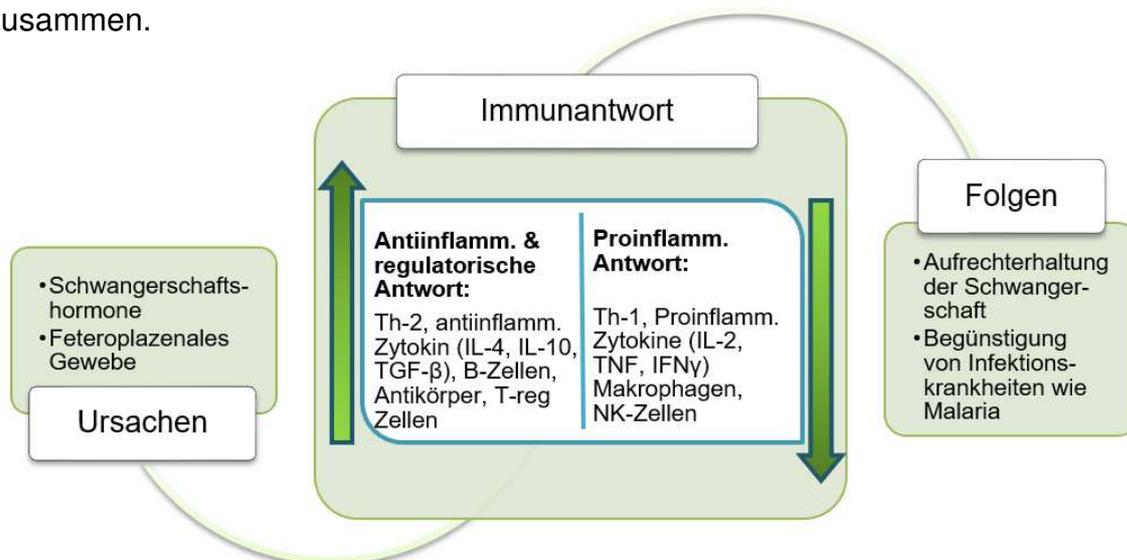


Abb. 6 Immunologische Veränderungen während der Schwangerschaft und Folgen (angelehnt an Robinson und Klein 2012)

Th-2: T-Helfer-2-Zellen, Th-1: T-Helfer-1-Zellen, IL-2/-4/-10: Interleukin-2/-4/-10, TGF-β: Transforming growth factor β, TNF: Tumornekrosefaktor, IFNγ: Interferon γ, NK-Zellen: Natürliche Killerzellen, T-reg-Zellen: regulatorische T-Zellen, anti-/proinflamm.: anti-/proinflammatorisch

Folgende Mechanismen tragen zusätzlich zum Schutz des heranreifenden Kindes bei:

- Die fetalen Trophoblastzellen exprimieren HLA-G. Dieses nicht-polymorphe Klasse-I-MHC-Antigen wird im Gegensatz zu klassischen HLA-Antigenen nur schwer als fremd erkannt. Durch Bindung an HLA-G werden mütterliche Immunzellen aktiv gehemmt oder zur antiinflammatorischen Zytokinproduktion angeregt (Hunt et al. 2005).

- Apoptoseinduzierende Fas-Liganden auf der Trophoblastenoberfläche treiben aktivierte mütterliche Abwehrzellen in den Zelltod (Bogovic Crncic et al. 2005).
- Je nach Signalen aus der Mikroumwelt dienen NK-Zellen in der Dezidua basalis zwei entgegengesetzten Funktionen: dem Schutz vor Infektionen und Invasion des fetalen Allotransplantats einerseits, der Unterstützung der Einnistung des Fetus andererseits (Zhang et al. 2016).
- Das intrazelluläre Enzym Indolamin-2,3-Deoxygenase (IDO) führt zu einer lokalen Unterdrückung der T-Zell-vermittelten entzündlichen Reaktion und zur Bildung von T_{reg}-Zellen (Chen et al. 2008, Munn et al. 1998). Die Inhibition von IDO bewirkt bei schwangeren Mäusen eine erhebliche Immunimbalance (Wang und Wang 2014).
- Als mechanischer Schutz schirmt Fibrinoid Stellen zugrunde gegangener Synzytiotrophoblasten vor mütterlichen Immunzellen ab (Kaufmann et al. 1996).

Im Allgemeinen besteht während der Schwangerschaft keine „Immunsuppression“ im pathologischen Sinne, sondern vielmehr eine vorübergehende Toleranz, die für den Fruchterhalt notwendig ist. Das antiinflammatorische Milieu behindert jedoch die adäquate Bekämpfung von Infektionskrankheiten wie Malaria. Schwangere Frauen sind daher anfälliger für *P. falciparum*-Infektion als nicht-schwangere (Rogerson et al. 2007b). Die Kontrolle und Beseitigung der Erreger erfordert eine erhöhte inflammatorische Reaktion, die wiederum negative Folgen für den Fetus mit sich bringt (Robinson und Klein 2012).

2.3 Antikörper und aktive Immunisierung

2.3.1 Antikörper: Struktur, Antigenbindung und Funktion

„Immunglobuline oder Antikörper sind Glykoproteine, die spezifische Strukturen auf Antigenen erkennen und viele Effektorfunktionen im Immunsystem ausüben.“ (Rink et al. 2012)

„Membrangebundenes Immunglobulin auf der B-Zell-Oberfläche dient als Antigenrezeptor der Zelle und heißt B-Zell-Rezeptor (BCR). Immunglobuline derselben Spezifität werden von ausdifferenzierten B-Zellen – den Plasmazellen – als Antikörper sezerniert.“ (Murphy et al. 2009)

Struktur von IgG-Antikörpern

Antikörper sind große, Y-förmige Moleküle. Sie bestehen aus je zwei identischen schweren und leichten Ketten, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind. Weiterhin lassen sich zwei funktionell unterschiedliche Bereiche ausmachen: die aminoterminalen variablen V-Regionen der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) sowie die carboxyterminalen konstanten C-Regionen (C_{H1-3} und C_L) (Edelman 1970, Harris et al. 1998). Die variablen Regionen bilden die Antigenbindungsstelle. Die konstanten Regionen der schweren Ketten bestimmen die Effektorfunktion und teilen die Antikörper in fünf Immunglobulinklassen (Isotypen) ein: IgM, IgD, IgG, IgE und IgA (Murphy et al. 2009). Da die für Malaria in der Schwangerschaft relevanten Antikörper vom IgG-Typ sind, wird nur auf diesen Isotyp näher eingegangen (Megnekou et al. 2005). Durch das Enzym Papain lassen sich Antikörper in drei Bereiche spalten: zwei identische Antigen-bindende Fragmente (F_{ab}), die Arme des Y, und ein der konstanten schweren Kette (C_{H2} , C_{H3}) entsprechendes kristallisierbares Fragment (F_c), das Bein des Y (Porter 1973). Abb. 7 stellt die IgG-Struktur schematisch dar.

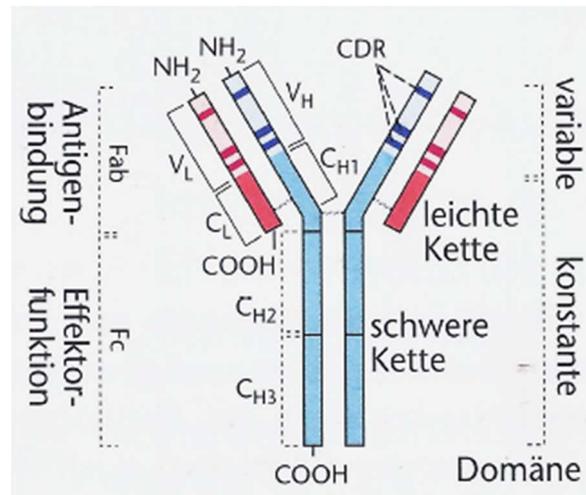


Abb. 7 Schematische Darstellung der IgG-Struktur (Barthlott et al. 2006)

F_{ab} = Antigenbindendes Fragment, F_c = kristallisierbares Fragment, $V_{H/L}$ = variable Bereiche der schweren („heavy“) bzw. leichten („light“) Kette, $C_{H1-3/L}$ = konstante Bereiche der schweren/leichten Kette, CDR = Komplementaritätsdeterminanten, NH_2 = Aminoterminus, $COOH$ = Carboxyterminus

Antigen-Antikörper-Bindung

Der variable Teil eines Antikörpers erkennt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip einen kleinen spezifischen Antigenabschnitt, ein sogenanntes **Epitop** (Barthlott et al. 2006). Innerhalb des variablen Bereichs befinden sich drei hypervariable Regionen, die komplementär zu den Bindungsstrukturen des Antigens sind und daher auch als „complementarity determining regions“ (CDR) bezeichnet werden. Sie weisen eine hohe Variabilität in der Aminosäuresequenz auf und sind entscheidend für die Spezifität der Antigenbindung (Johnson und Wu 2000, Wu und Kabat 1970). CDRs bilden komplementäre Taschen, Falten oder Flächen aus, an denen sie ihr Antigen nicht-kovalent mittels elektrostatischen Kräften, Wasserstoffbrücken, hydrophoben

Wechselwirkungen oder Van-der-Waals-Kräften binden (Wilson und Stanfield 1994, Braden et al. 1998, Braden und Poljak 1995).

Die Bindungskraft wird als **Affinität** bezeichnet und mittels Dissoziationskonstante (K_D) gemessen. Dieser Wert spiegelt die in freier Lösung notwendige Antigen-Konzentration wider, die benötigt wird, um die Hälfte der Antikörper-Bindungsstellen zu besetzen. Ein kleiner K_D -Wert impliziert daher eine hohe Affinität. Da IgG-Antikörper zwei Antigen-Bindungsstellen aufweisen, können sie gleichzeitig zwei gleiche Epitope binden (divalente Bindung). Die dabei entstehende Kraft wird als **Avidität** bezeichnet und ist größer als die Summe der beiden Bindungsaffinitäten (Barthlott et al. 2006). Erkennen und binden Antikörper auch strukturell ähnliche Epitope, so kommt es zu einer **Kreuzreaktion** (Rink et al. 2012).

Funktion von IgG-Antikörpern

IgG-Antikörper lassen sich in vier Subklassen unterteilen (IgG1-IgG4). Sie sind als einzige Immunglobulinklasse plazentagängig und verleihen dem Neugeborenen in den ersten Lebenswochen eine Immunität (Rink et al. 2012). Daneben besitzen sie folgende Funktionen:

1. Neutralisierung: Durch Bindung der Antikörper an funktionell wichtige Antigene verlieren Erreger ihre Pathogenität, da sie beispielweise nicht mehr mit Oberflächenrezeptoren interagieren oder in die Zielzelle eindringen können. Alle IgG-Subtypen besitzen diese Funktion (Murphy et al. 2009). Bei Malaria in der Schwangerschaft hemmen IgG-Antikörper die Bindung von infizierten Erythrozyten an CSA in der Plazenta (Beeson et al. 2004, Elliott et al. 2005, Maubert et al. 1999, Ricke et al. 2000, Staalsoe et al. 2001, Duffy und Fried 2003).

2. Aktivierung des Komplementsystems: Binden mindestens zwei IgG-Antikörper in räumlicher Nähe auf der Oberfläche eines Pathogens, kann durch Interaktion ihrer F_c -Teile mit dem Komplementfaktor C1q der klassische Weg der Komplementkaskade ausgelöst werden (Cooper 1985). Hier kommt es durch eine Reihe proteolytischer Spaltungen zur Bildung eines membranangreifenden Komplexes, der die Lyse bestimmter Erreger und Zellen zur Folge hat. Daneben können aktivierte Komplementfaktoren wie C3a und C5a als Entzündungsmediatoren Immunzellen anlocken und C3b Pathogene opsonieren und ihre Phagozytose fördern. Außer IgG4 können alle Subtypen das Komplementsystem aktivieren (Murphy et al. 2009).

3. Opsonierung: Antikörper markieren die über den F_{ab} Teil gebundenen Pathogene für Immunzellen, die spezifische Rezeptoren für den konstanten F_c Teil (sog. F_{cy} Rezeptoren) auf ihrer Oberfläche besitzen (Barthlott et al. 2006). Je nach Effektorzelle und Funktion gibt es unterschiedliche F_{cy} Rezeptoren. Die F_{cy} Rezeptoren I und II, die sich unter anderem auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, aktivierten Granulozyten und dendritischen Zellen befinden, führen beispielsweise bei Bindung zur Phagozytose des markierten Erregers und zur Stimulation einer Entzündungsreaktion (Murphy et al. 2009). Der F_{cy} Rezeptor III sitzt vor allem auf NK-Zellen und vermittelt die Freisetzung zytoplasmatischer Granula, die die Zielzelle abtötet (Leibson 1997, Sulica et al. 2001). Diese als „Antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität“ bezeichnete Reaktion scheint auch bei der Bekämpfung von Tumorzellen und viralen Infektionen von großer Bedeutung zu sein (Wang et al. 2015, Isitman et al. 2016). Insbesondere die Subtypen IgG1 und IgG3 besitzen opsonierende Eigenschaften (Murphy et al. 2009).

2.3.2 Aktive Immunisierung

„Das Auslösen von schützenden Immunantworten gegen häufig vorkommende pathogene Mikroorganismen bezeichnet man als Impfung. [...] Als Immunogen wird eine Substanz bezeichnet, die eine Immunantwort auslösen kann.“ (Murphy et al. 2009)

Bedingungen für einen erfolgreichen Impfstoff

Ein effektiver Impfstoff muss folgende Kriterien erfüllen (Ada 1991, Murphy et al. 2009):

- Wirkung gegen die „richtigen“ Epitope: Zahlreiche Epitope lösen die Bildung von Antikörpern aus, von denen jedoch nur manche einen Schutz z.B. durch Neutralisierung gewährleisten, während andere funktionslos sind oder sogar eine pathologische Entzündungsreaktion hervorrufen.
- Sicherheit: Der Impfstoff selbst darf nicht Krankheit oder Tod bewirken.
- Schutz: Der Impfstoff muss vor der Krankheit, die durch Kontakt mit lebenden Erregern ausgelöst wird, schützen.
- Dauerhaftigkeit des Schutzes: Der Schutz vor der Krankheit muss mehrere Jahre anhalten, es müssen also sowohl B- als auch T-Zellen aktiviert werden.
- Praktische Gesichtspunkte: Niedrige Kosten pro Dosis, biologische Stabilität, einfache Verabreichung und geringe Nebenwirkungen müssen gegeben sein.

Das immunologische Gedächtnis

Die Impfung macht sich die Fähigkeit unseres Immunsystems, ein Gedächtnis für Antigene zu entwickeln, zu Nutze. Nach dem ersten Kontakt mit einem Antigen kommt es zur Bildung von Gedächtnis- bzw. Memory-Zellen, die beim wiederholten Kontakt mit dem gleichen Erreger schneller und effektiver reagieren, sodass die Erkrankung nicht oder nur in abgeschwächter Form ausbricht (Rink et al. 2012). B-Zellen liegen entweder als langlebige antikörperproduzierende Plasmazellen im Knochenmark oder als B-Gedächtniszellen mit spezifischem B-Zell-Rezeptor in den sekundär lymphatischen Organen vor. T-Gedächtniszellen werden in Effektor-Memory-T-Zellen, die in der Peripherie patrouillieren, und Central-Memory-T-Zellen, die vor allem in den sekundär lymphatischen Organen vorliegen, unterschieden (Spiess et al. 2011). Da B-Zellen co-stimulierende Signale von T-Zellen benötigen und diese zwei Zelltypen miteinander interagieren, sollte ein Impfstoff sowohl eine effektive B- als auch eine effektive T-Zell-Antwort hervorrufen (Murphy et al. 2009).

Formen von Impfstoffen

Attenuierte Lebendimpfstoffe: Lebendimpfstoffe bestehen aus abgeschwächten (attenuierten) Erregern, die replikationsfähig sind, aber die Fähigkeit verloren haben, eine Infektionskrankheit auszulösen (Spiess et al. 2011). Impfungen mit Lebendimpfstoffen sind im Allgemeinen wirksamer als mit Totimpfstoffen und bieten einen langen Schutz. Für Menschen mit Immunschwäche können sie jedoch ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen mit sich bringen und sind in diesem Fall nicht indiziert. Auch die Schwangerschaft stellt aufgrund einer möglichen Infektionsgefahr des Fetus eine Kontraindikation dar. Beispiele für Lebendimpfstoffe sind die Varizellen- und die MMR- (Masern, Mumps, Röteln) Impfung (Murphy et al. 2009).

Totimpfstoffe: Totimpfstoffe bestehen aus inaktivierten, nicht replikationsfähigen Erregern bzw. aus deren Bestandteilen. Sie besitzen ein geringeres Risikopotential als Lebendimpfstoffe, lösen aber auch eine schwächere und kürzer anhaltende Immunantwort aus (Spiess et al. 2011). In der Schwangerschaft sind solche Impfungen im Allgemeinen unbedenklich (Murphy et al. 2009). Totimpfstoffe lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Vollimpfstoffe enthalten ganze, abgetötete Erreger (z.B. Influenza-Ganzvirusimpfstoff, weniger gut verträglich), Spaltimpfstoffe enzymatisch zerkleinerte Erreger (z.B. Influenza-Spaltimpfstoff, gut verträglich) und Subunit-Impfstoffe gereinigte oder rekombinant hergestellte Antigene (z.B. Hepatitis-surface-

Antigen, HBsAg, sehr gut verträglich) (Rink et al. 2012). **Toxoide** sind inaktivierte Bakterientoxine, die beispielsweise in der Tetanus- und Diphtherieimpfung eingesetzt werden. Polysaccharid-Antigene von bekapselten Bakterien, wie Pneumokokken, Meningokokken und Haemophilus influenzae Typ b, lösen selbst nur eine beschränkte Immunantwort aus, da es sich bei ihnen um T-Zell-unabhängige Antigene handelt. Die Kopplung solcher Antigene an Proteinträgermoleküle, die starke T-Zell-Antigene sind, führt durch das Zusammenwirken von B- und T-Zellen zu einer verbesserten Immunantwort. Solche Impfstoffe werden als **Konjugatimpfstoffe** bezeichnet (Murphy et al. 2009). Auch gereinigte oder rekombinant hergestellte Antigene sind an sich nur gering immunogen. Um eine verstärkte Immunreaktion zu erzielen, werden sie an sog. **Adjuvanzien** (Wirkverstärker) gebunden (Rink et al. 2012). Zu Forschungszwecken wird bei Labortieren oft das stark immunogene, bei Tierschützern umstrittene Freund-Adjuvans, eine Wasser-in-Öl-Emulsion mit abgetöteten Mykobakterien, angewendet (Nicklas et al. 1997). Beim Menschen ist Aluminiumhydroxid das am häufigsten eingesetzte Adjuvans (Dekker et al. 2008). Es bewirkt eine erhöhte Antigenaufnahme durch antigenpräsentierende Zellen, eine gesteigerte Antigenpräsentation und eine verlängerte Interaktion zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen (Ghimire et al. 2012, McKee et al. 2013). Eine Liste aller bis 2008 am Menschen untersuchten Adjuvanzien kann in einem Bericht des US-amerikanischen National Vaccine Advisory Committee (NVAC) eingesehen werden (Dekker et al. 2008).

Neuere Entwicklungen: Die Kopplung von Antigenen an virusartige Partikel (virus-like particles, **VLPs**) ist eine weitere Möglichkeit, um die Immunogenität von Impfstoffen zu erhöhen (Thrane et al. 2016). VLPs bestehen aus viralen Oberflächenproteinen, die für die Zellpenetration verantwortlich sind, enthalten jedoch kein genetisches Material zur Virusreplikation. Auf diese Weise stellen sie den Eintritt in Wirtszellen sicher, die die Antigene prozessieren, mittels MHC-Molekülen Immunzellen präsentieren und so eine potente humorale und zelluläre Immunantwort bewirken (Chroboczek et al. 2014). In den Impfstoffen gegen Humane Papillom Viren (HPV) und Hepatitis B haben sich VLPs als Träger der Antigene bereits bewährt (Mohsen et al. 2017). VLPs zeichnen sich durch eine hohe Effektivität, Sicherheit und kostengünstige Produktion aus (Kushnir et al. 2012). **DNA-Impfstoffe** bestehen i.d.R. aus Plasmiden mit genetischem Material, das für Antigene von Pathogenen codiert und in Zellen des Impflings exprimiert wird (Khan 2013). Die Zellen präsentieren über MHC-I- und MHC-II-Moleküle Fragmente des Antigens, die von Immunzellen als fremd

erkannt werden (Robinson und Pertmer 2000). So wird neben einer humoralen auch eine starke zelluläre Immunantwort induziert (Fowler und Barnett 2012, Robinson und Pertmer 2000, Gurunathan et al. 2000). Weitere Vorteile sind die einfache, kostengünstige Herstellung, die Stabilität und Sicherheit des Impfstoffes (Robinson und Pertmer 2000, Sasaki et al. 2003, Sun et al. 2010). Aufgrund der Insertion in das Genom der Wirtszelle bestehen jedoch Bedenken bezüglich der Entwicklung von Tumoren (Khan 2009). Aktuell sind mehrere DNA-Impfstoffe beispielsweise gegen Influenzaviren, Humane Papillom Viren (HPV) und Humane Immundefizienz-Viren (HIV) in der frühen Phase der klinischen Prüfung (Ferraro et al. 2011, Khan 2013).

Nicht-klinische und klinische Prüfung von Impfstoffen

Die Herstellung von Impfstoffen wird von der EMA (European Medicine Agency) umfassend kontrolliert (EMA 2006). Bevor klinische Studien durchgeführt werden, werden in Tierversuchen die Immunogenität und die lokale bzw. systemische Toxizität des Impfstoffes nach unterschiedlichen Impfdosen untersucht (Spiess et al. 2011). Ist der Impfstoff präklinisch wirksam und sicher, kommt es nach einer Risikobewertung zur Erstanwendung am Menschen (Pfleiderer und Wichmann 2014). Hier werden vier Phasen der klinischen Prüfung durchlaufen (vgl. Tab. 3): In den Phasen I und IIa werden an einer relativ kleinen Anzahl an Probanden die Verträglichkeit und Immunogenität getestet und die adäquate Dosierung bzw. Anzahl der Teildosen ermittelt, die eine protektive Immunantwort auslöst. Die Phasen IIb und III beinhalten groß angelegte Verträglichkeitsstudien, die auch seltene Nebenwirkungen (1-10/10.000) erfassen und das Nutzen-Risiko-Verhältnis bestimmen lassen. Phase III dient außerdem dem Zweck, die Wirksamkeit z.B. über randomisierte, kontrollierte und verblindete Studien zu untersuchen. Phase IV beginnt nach erteilter Zulassung. Dabei wird der Impfstoff bei Anwendung in epidemiologischen Studien, Effizienzstudien und Studien in Risikogruppen beobachtet und ggf. neu bewertet (Spiess et al. 2011).

Tab. 3 Klinische Prüfphasen bei der Entwicklung von Impfstoffen (Spiess et al. 2011)

Phase		Zahl der Probanden
Phase I (a/b)	Abschätzen der Immunogenität und Verträglichkeit	< 100
Phase II (a/b)	Dosisfindung und Verträglichkeit	> 100
Phase III	Konsistenz des Herstellungsverfahrens, Bestimmung der Verträglichkeit, Immunogenität und Wirksamkeit	1.000 – 10.000
Phase IV	Anwendungsbeobachtung nach erteilter Zulassung	100 – 10.000

2.4 Malaria und Schwangerschaft

Schwangere Frauen sind anfälliger für Infektionen mit *P. falciparum*, wobei die Infektionen sowohl häufiger auftreten als auch schwerer verlaufen als bei nicht Schwangeren (Brabin 1983). Die Wahrscheinlichkeit an schweren Malariainfektionen zu erkranken ist drei Mal so hoch - mit einer Mortalitätsrate von bis zu 50% (Schantz-Dunn und Nour 2009, WHO 2006). Weitere Komplikationen sind schwere Anämie, zerebrale Malaria und massive Beeinträchtigung der Schwangerschaft (Desai et al. 2007).

Die erhöhte Suszeptibilität wird zwei Hauptkriterien zugeschrieben: zum einen physiologischen Prozessen in der Schwangerschaft, wie der veränderten Hormonkonstellation mit Unterdrückung von bestimmten Immunreaktionen oder der erhöhten Körperwärme, die Schwangere für Anophelesmücken attraktiver erscheinen lässt (Robinson und Klein 2012, Lindsay et al. 2000); zum anderen der Sequestration von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten in der Plazenta (Rogerson et al. 2007b).

In Anwesenheit einer Plazenta exprimiert *P. falciparum* ein spezielles PfEMP-1-Oberflächenprotein, das VAR2CSA-Antigen, das an Chondroitinsulfat A (CSA) im intervillösen Raum binden kann. Frauen in Endemiegebieten, die bereits eine gewisse Immunität gegen verschieden PfEMP-1-tragende *P. falciparum*-Stämme gebildet haben, besitzen vor ihrer Erstschwangerschaft aufgrund fehlender Exposition zu VAR2CSA keine Antikörper gegen dieses spezielle PfEMP-1-Antigen, sodass sie wieder stärker gefährdet sind. Infektionen in weiteren Schwangerschaften verlaufen durch vermehrten Kontakt mit VAR2CSA-tragenden *P. falciparum*-Stämmen und zunehmender Immunität gegen VAR2CSA meist weniger schwer (Rogerson et al. 2007a).

Durch Akkumulation in der Plazenta entzieht sich *P. falciparum* zudem Eliminierungsprozessen in der Milz. In Endemiegebieten kann bei bereits bestehender Teilimmunität gegen *P. falciparum* die periphere Infektion meist kontrolliert werden, während die Plasmodien unentdeckt in der Plazenta persistieren und mütterliche Anämie sowie fetale Entwicklungsstörungen hervorrufen können (Warrell und Gilles 2002).

Neben *P. falciparum* führt auch *P. vivax* zu einer negativen Beeinträchtigung der Schwangerschaft; die Folgen sind aber im Allgemeinen weniger gravierend (McLean et al. 2015, Desai et al. 2007).

Durch verschiedene Maßnahmen kann Malaria während der Schwangerschaft vorgebeugt werden. In allen von Malaria betroffenen Regionen sind frühzeitige Diagnose und Behandlung sowie die Verwendung von INTs (insecticide-treated nets) entscheidend, in Regionen mit Stabiler Malaria wird zusätzlich eine intermittierende präventive Behandlung (IPTp) empfohlen (WHO 2007). Zudem erhofft man sich durch die Identifizierung der am stärksten immunogen wirkenden Epitope des VAR2CSA-Antigens Fortschritte im Hinblick auf die Impfstoffentwicklung gegen *P. falciparum*-Malaria in der Schwangerschaft (Saveria et al. 2015).

2.4.1 Epidemiologie

85 Millionen Schwangerschaften wurden im Jahr 2007 in Gebieten mit Risiko für *P. falciparum*-Malaria erfasst, etwa 2/3 davon (54,7 Mio.) in Regionen mit Stabiler Malaria (Dellicour et al. 2010). In diesen Gebieten zeigen sich bei jeder vierten Frau zum Zeitpunkt der Geburt Hinweise auf plazentare Infektion (Desai et al. 2007). Allein in Sub-Sahara-Afrika wurde Malaria laut WHO bis 2009 jährlich für über 10.000 mütterliche und 200.000 perinatale Todesfälle verantwortlich gemacht (Schantz-Dunn und Nour 2009). Walker et al. schätzen, dass 900.000 Neugeborene an durch plazentare Infektion bedingtem erniedrigten Geburtsgewicht leiden (2015). Genaue Inzidenzzahlen zum Auftreten von Malaria in der Schwangerschaft sind bis heute nicht bekannt. Abbildung 8 verdeutlicht die Verteilung von *P. falciparum* und die entsprechende Zahl an Schwangerschaften auf den verschiedenen Kontinenten im Jahr 2007 (Dellicour et al. 2010). Neuere Studien bezüglich Inzidenz und Veränderungen in den letzten Jahren wären wünschenswert.

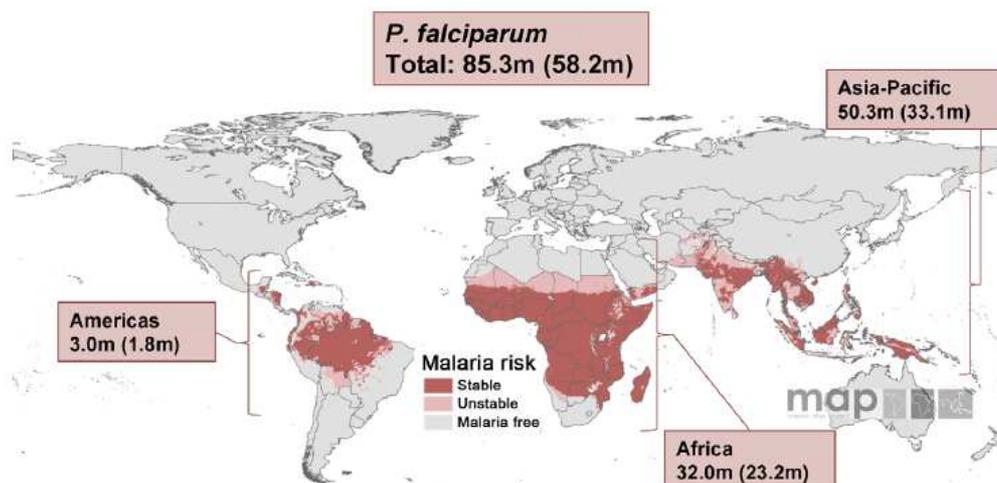


Abb. 8 *P. falciparum*-Risikogebiete und entsprechende Anzahl an Schwangerschaften auf den verschiedenen Kontinenten im Jahr 2007 (Dellicour et al. 2010)

m: Millionen, in Klammern: Anzahl an Lebendgeburten

2.4.2 Folgen für Mutter und Kind

Das klinische Erscheinungsbild einer *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft hängt wesentlich von dem Immunstatus der Frau und somit von der Region ab. Besitzt die Frau bereits einen gewissen Immunschutz, was in der Regel in Gebieten mit stabiler Malaria der Fall ist, verläuft die Infektion häufig asymptomatisch. Hohes Fieber und Komplikationen wie Zerebrale Malaria, Hypoglykämien oder Lungenödem treten selten auf. Allerdings sind Frauen vor allem in der Erstschwangerschaft nicht gegen plazentare Infektion geschützt. Da die Infektion unentdeckt persistiert, kann es zu ausgeprägter mütterlicher Anämie und schwerwiegenden Folgen für das Ungeborene kommen. In Regionen mit instabiler Malaria ist kein Immunschutz vorhanden und eine Infektion ist mit extrem hohem Risiko für mütterliche und perinatale Sterblichkeit verbunden. Auch Organkomplikationen sind häufig (vgl. Tab. 4) (Warrell und Gilles 2002). Zudem scheinen junge Mütter besonders anfällig für schwere Infektionen zu sein (Uneke 2008a, Orish et al. 2012).

Tab. 4 Folgen von Malaria in der Schwangerschaft in Regionen unterschiedlicher Transmission (Warrell und Gilles 2002)

	<i>Instabile Malaria</i>	<i>Stabile Malaria</i>
Mutter		
Todesfälle	Ja	Ja, sek. durch Anämie
Schwere Anämie	Ja	Ja
Hohes Fieber	Ja	Oft asymptomatisch
Zerebrale Malaria	Ja	Selten
Lungenödem	Ja	Selten
Hypoglykämie	Ja	Selten
Fetus		
Fehl-/ Totgeburt	Ja	Unbekannt
Frühgeburt	Ja	Ja
Erniedrigtes Geburtsgewicht	Ja	Ja
Intrauterine Wachstumsverzögerung	Unbekannt	Ja

Da erniedrigtes Geburtsgewicht und schwere mütterliche Anämie in Regionen mit stabiler Malaria die Hauptkomplikationen darstellen, werden sie im Folgenden näher untersucht.

Erniedrigtes Geburtsgewicht: Erniedrigtes Geburtsgewicht (definiert als Geburtsgewicht < 2.500 g) stellt den größten Risikofaktor für Säuglings- und Kindersterblichkeit in Afrika dar (WHO 2012). Das Risiko innerhalb des ersten Lebensmonats zu versterben wird von Guyatt und Snow auf das Neunfache von normalgewichtigen Neugeborenen geschätzt. In Afrika sterben etwa 100.000 Kinder an den Folgen von malariaassoziiertem erniedrigtem Geburtsgewicht (Guyatt und Snow 2004). Ursachen für Gewichtsreduktion sind Frühgeburten und intrauterine Wachstumsretardierung des Fetus (Oraneli et al. 2013). Neben Malariainfektion ist Malnutrition der Mutter einer der Hauptrisikofaktoren für erniedrigtes Geburtsgewicht in Entwicklungsländern (Unger et al. 2015, Ilunga et al. 2016, Cates et al. 2017). Welche pathogenetischen Mechanismen der fetalen Entwicklungsstörung zu Grunde liegen, wird im Kapitel 5.2.3 untersucht.

Schwere Anämie: Schwere Anämie (definiert als Hb < 7 g/dl) stellt die Hauptkomplikation von *P. falciparum*-Infektionen mütterlicherseits in Regionen mit stabiler Malaria dar. In der Sub-Sahararegion entwickeln Schätzungen zufolge zwischen 200.000 und 500.000 Schwangere eine malariaassoziierte schwere Anämie (Steketee et al. 2001, Guyatt und Snow 2001, Uneke 2008a). Schwere Anämie kann schon bei geringem Blutverlust während der Geburt zum Tod führen. Auch Zirkulationsstörungen mit erhöhtem Risiko für Herzinsuffizienz und Lungenödem können auftreten (Warrell und Gilles 2002, Schantz-Dunn und Nour 2009). In einigen Studien wird zudem ein Zusammenhang zwischen mütterlicher Anämie und fetalen Entwicklungsstörungen festgestellt (Adam et al. 2011, Uneke 2008a, Kidanto et al. 2009). Neben Malaria müssen weitere Ursachen für Anämie wie Eisen-, Vitamin- und Spurenelement-Mangel sowie Wurminfektionen mitberücksichtigt werden (Achidi et al. 2005, Adam et al. 2011, van den Broek und Letsky 2000). Die Entstehung der Malariaanämie ist vielschichtig und wird im Kapitel 5.2.4 dargestellt.

Malariainfektion bei Neugeborenen: Durch Mikroverletzungen in der Plazenta oder während der Geburt kann es zur Übertragung von Parasiten in den kindlichen Blutkreislauf kommen. Kongenitale Malaria manifestiert sich allerdings nur in Einzelfällen (Enweronu-Laryea et al. 2013). Auch in den ersten drei bis sechs Lebensmonaten wird Malaria bei Kindern selten beobachtet; Infektionen sind gekennzeichnet durch extrem niedrige Parasitämie und durch das Fehlen von Symptomen und Komplikationen (Covell 1950, Snow et al. 1998). Dies wird zum einen dem Schutz diaplazentar übertragener IgG-Antikörpern, v.a. gegen PfEMP-1, zum

anderen dem kindlichen HbF zugeschrieben (Amaratunga et al. 2011). Große Studien zu diesem Thema fehlen jedoch und gerade bei nicht- oder semi-immunen Müttern darf Malaria bei Neugeborenen nicht vernachlässigt werden (Goel et al. 2013, Menendez und Mayor 2007).

2.4.3 Infektion mit *P. vivax* in der Schwangerschaft

Neben *P. falciparum* spielt auch *P. vivax* in der Schwangerschaft eine Rolle und wird mit negativen Folgen wie Anämie und niedrigem Geburtsgewicht assoziiert (Desai et al. 2007, Poespoprodjo et al. 2008). Ob *P. vivax*-infizierte Erythrozyten in der Plazenta sequestrieren können, ist bisher unklar. In manchen Studien werden unter *P. vivax*-Infektion histologische Veränderungen innerhalb der Plazenta gefunden (McGready et al. 2004, Souza et al. 2013). Jüngste *in vitro*-Studien können zudem eine Interaktion von *P. vivax*-infizierten Erythrozyten mit plazentaren Glykosaminoglykanen, wie CSA und Hyaluronsäure, zeigen - allerdings ist der Bindungsgrad etwa zehnfach niedriger als bei *P. falciparum* (Carvalho et al. 2010, Chotivanich et al. 2012). *In vivo* werden *P. vivax*-infizierte Erythrozyten und Inflammationszeichen in der Plazenta nur selten gefunden (Mayor et al. 2012, Carmona-Fonseca et al. 2013, Souza et al. 2013). Komplikationen in der Schwangerschaft werden daher eher den umfassenden peripheren Effekten einer Infektion, wie mütterlicher Anämie, Fieber und systemischer Inflammation, zugeschrieben (Poespoprodjo et al. 2008, McLean et al. 2015). Im Vergleich zu einer Infektion mit *P. falciparum* reagiert der Körper auf *P. vivax* mit einer höheren Fieber- und Entzündungsreaktion (Yeo et al. 2010, Hemmer et al. 2006). Bei Schwangeren kann dies verfrühte Wehen auslösen und Früh-, Fehl- und Totgeburten begünstigen (Warrell und Gilles 2002). Außerdem wird bei *P. vivax* die Zytoadhärenz infizierter Erythrozyten, das sog. Rosetting, vermehrt beobachtet, welches zu Organschäden und Anämie führen kann (Lee et al. 2014, Marin-Menendez et al. 2013). Die Morbiditäts- und Mortalitätsrate einer *P. vivax*-Infektion in der Schwangerschaft ist nicht zu vernachlässigen (Anstey et al. 2012). Im Vergleich zu *P. falciparum* sind negative Folgen aber seltener und weniger ausgeprägt (McLean et al. 2015).

Die plazentare Sequestration von *P. falciparum* ist für die schweren Verläufe verantwortlich, bietet jedoch auch Interventionsmöglichkeiten. Die folgende Arbeit befasst sich daher nur mit *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft. „Malaria in der Schwangerschaft“ wird synonym dazu verwendet.

2.4.4 Diagnostik, Therapie und Prävention

Die Diagnose einer Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft stellt ein besonderes Problem dar. Da die infizierten Erythrozyten in der Plazenta sequestrieren, ist die Mikroskopie des peripheren Blutes trotz persistierender Infektion häufig unauffällig (Uneke 2008b). Zudem wird die Parasitämie aufgrund der physiologischen Zunahme des intravasalen Volumens während der Schwangerschaft relativ verringert (Fried et al. 2012). „Submikroskopische“, im peripheren Blut unerkannte Infektionen sind daher in der Schwangerschaft häufig. In Gebieten mit stabiler Malaria erschwert außerdem die fehlende Klinik die Diagnosestellung, da Infektionen häufig zunächst asymptomatisch – allerdings mit negativen Folgen für das Ungeborene und die Mutter – verlaufen (Nosten et al. 2004).

Als „Goldstandard“ zur Diagnose von Malaria in der Schwangerschaft für Forschungs- und epidemiologische Zwecke wird die Plazentabiopsie mit Histologie gesehen (Uneke 2008b). Zur klinischen Diagnostik eignet sich die Histologie nicht, da sie postpartal erfolgt und arbeits- sowie kostenintensiv ist (Rogerson et al. 2003a). PCR und Schnelltest können, verglichen mit der Mikroskopie, *P. falciparum*-Infektionen sensitiver nachweisen (Kattenberg et al. 2011). In einigen Studien wurden durch PCR mehr als doppelt so viele infizierte Schwangere erkannt (Adegnika et al. 2006, Walker-Abbey et al. 2005, Malhotra et al. 2005, Adam et al. 2005, Mockenhaupt et al. 2006, Mockenhaupt et al. 2000) (geprüft in Uneke 2008b). Allerdings ist die PCR aufgrund logistischer und finanzieller Hindernisse nicht zur Routinediagnostik geeignet (Uneke 2008b). Eine Alternative bietet der weniger aufwändige Schnelltest mit Nachweis des HRP-2 (histidine-rich protein-2) Antigens, das von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten ins Blut freigesetzt wird. Die Sensitivität ist gegenüber der PCR zwar geringer, verglichen mit Mikroskopie aber deutlich höher (Malhotra et al. 2005, Mockenhaupt et al. 2006, Mockenhaupt et al. 2000, Singer et al. 2004). Außerdem bleibt fraglich, inwieweit die von der PCR erkannten submikroskopischen Infektionen klinische Relevanz besitzen. In einigen Studien können negative Folgen, wie mütterliche Anämie und erniedrigtes Geburtsgewicht, nachgewiesen werden (Mohammed et al. 2013, Cottrell et al. 2015, Mockenhaupt et al. 2000, Adegnika et al. 2006), während andere Studien keinen relevanten Zusammenhang feststellen können (Singh et al. 2015, Cohee et al. 2014, Williams et al. 2016b). Problematisch beim Schnelltest bleibt, dass er immer noch viele Infektionen übersieht und dass er sich nicht zur Verlaufskontrolle eignet, da das HPR-2 Antigen auch nach erfolgreicher

Therapie mehrere Wochen im Blut nachweisbar bleibt (Tjitra et al. 2001, Mayxay et al. 2001, Fried et al. 2012). Um einen verzögerten Therapiebeginn bei Malaria oder unnötige Therapie bei anderen Erkrankungen zukünftig zu verhindern, sind alternative, zuverlässigere Methoden erforderlich. Diskutiert werden Biomarker, wie die Entzündungsparameter TNF-Rezeptor 2 und C-reaktives Protein oder Marker für Präeklampsie wie sFTL1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1) und Endoglin (Silver et al. 2011, Conroy et al. 2011, Thevenon et al. 2010). Diese Biomarker in Kombination mit parasitären Markern könnten die Sensitivität und Spezifität zur Detektion einer Schwangerschaftsmalaria verbessern (Fried et al. 2012).

Die Therapie der Schwangerschaftsmalaria wurde bereits in Kapitel 2.1.8 erläutert. Da *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft zu schwerwiegenden Folgen führen kann, wird in Gebieten mit stabiler Malaria neben der Anwendung von „insecticide-treated nets“ (ITNs) eine zusätzliche medikamentöse Prophylaxe, die sog. „intermittent preventive treatment in pregnancy“ (ITPp), empfohlen. Dabei sollen schwangere Frauen ab dem 2. Trimenon im Abstand von jeweils minimal einem Monat mindestens drei Dosen Sulfadoxin-Pyrimethamin erhalten (WHO 2007, WHO 2015b). Die zunehmende Resistenzbildung gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin erzwingt jedoch die Suche nach Alternativen. Dihydroartemisinin-Piperaquin ist nach aktueller Studienlage ein potentieller Ersatz für Sulfadoxin-Pyrimethamin (Hill et al. 2016, Kakuru et al. 2016). Weiterhin wird intensiv an Impfstoffen, die vor den negativen Folgen der Schwangerschaftsmalaria schützen, geforscht (Nielsen 2017, European Vaccine Initiative 2017).

3 Ziele der Arbeit

Durch die Bindung infizierter Erythrozyten in der Plazenta führt *P. falciparum* in der Schwangerschaft zu zahlreichen Komplikationen wie erniedrigtem Geburtsgewicht des Neugeborenen und mütterlicher Anämie, die bis hin zum Tod führen können.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand einer systematischen Auswertung internationaler Literatur genauer zu verstehen, wie die Interaktion zwischen Parasit und Plazenta abläuft und mit welchen immunologischen Prozessen der Körper auf die Infektion reagiert. Das variable Oberflächenantigen VAR2CSA, das die Bindung an Chondroitinsulfat A (CSA) in der Plazenta vermittelt, steht dabei im Mittelpunkt.

Im Einzelnen sollen folgende Aspekte bearbeitet werden:

- Der Aufbau von VAR2CSA mit variablen Anteilen und CSA-Bindungsdomänen soll auf Grundlage aktueller struktureller und kinetischer Studien dargestellt werden.
- Die Rolle der plazentaren Inflammation bei der Eliminierung des Erregers auf der einen Seite, bei der Pathogenese von Komplikationen auf der anderen Seite soll genauer betrachtet werden.
- Die natürliche Immunitätsentwicklung von Frauen in Endemiegebieten gegen VAR2CSA-tragende Parasitenstämme soll näher untersucht werden. Dabei soll auf folgende Fragestellungen tiefer eingegangen werden:
 - I) Gegen welche Epitope von VAR2CSA sind Antikörper mehrgebärender Frauen gerichtet?
 - II) Welche Antikörper sind mit verminderten Infektions- und Komplikationsraten assoziiert?
 - III) Welche Antikörper korrelieren mit der Hemmung der CSA-Bindung?

Mithilfe von Tabellen und Schaubildern sollen Studien zur Pathogenese und Immunologie aufgeführt und ein Überblick über die aktuelle Forschungslage gegeben werden.

Darauf aufbauend sollen Möglichkeiten und Grenzen der Entwicklung eines auf VAR2CSA basierenden Impfstoffes gegen plazentare Parasiten diskutiert werden. Da Größe und Komplexität die Anwendung von VAR2CSA als Impfstoff verhindern, werden Studien zusammengetragen, die kleinere Bereiche von VAR2CSA auf ihre

CSA-Bindungsfähigkeit untersuchen. Die Immunogenität dieser Bereiche bezüglich der Induktion von kreuzreaktiven und bindungshemmenden Antikörpern wird in mehreren *in vitro*-Studien geprüft. So können die N-terminalen Multidomänen DBL1-DBL2 und ID1-ID2a, die Bestandteile zweier sich in Phase I der klinischen Prüfung befindenden Impfstoffe sind, als vielversprechende Impfstoffkandidaten bestätigt werden. Weiterhin wird diskutiert, ob das Beifügen von anderen VAR2CSA-Domänen oder die Kombination mehrerer VAR2CSA-Varianten die Wirkung der Impfstoffe erhöhen könnte. Daneben sollen alternative Antigene zu VAR2CSA aufgezeigt werden.

Durch die Zusammenstellung aller relevanten Studien soll diese Arbeit verschiedene Möglichkeiten vorstellen, wie die Effektivität der Impfstoffe in Phase I gesteigert werden könnte, und kann bei unzureichender Wirkung hilfreiche Anregungen geben.

4 Methoden

Als systematische Übersichtsarbeit befasst sich die vorliegende Arbeit mit Studien zum Thema „Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft“. Zu den Bereichen Pathogenese, Immunologie und Impfstoffentwicklung wurde eine gezielte Literaturrecherche durchgeführt. Hauptliteraturquelle war die wissenschaftliche Literaturdatenbank PubMed.

Folgende englische Begriffe wurden als Schlagwörter verwendet:

- Malaria, pregnancy, placenta, *P. falciparum*, placental malaria, CSA/C4S, VAR2CSA, polymorphism
- TNF, IFN γ , IL-1/-4/-6/-8/-10, progesterone, estrogen, glucocorticoids, low birth weight, preeclampsia, an(a)emia, parasit(a)emia, preterm delivery, primigravida
- DBL1x, DBL2x, DBL3x, DBL4 ϵ , DBL5 ϵ , DBL6 ϵ , DBL1x-DBL2x, ID1-DBL2x/ID2, DBL4 ϵ -ID4, antibodies, vaccine/vaccination

Folgende Themen bzw. englische Begriffe wurden ausgeschlossen:

- HIV, cerebral malaria, children

Mithilfe der „Boolschen Operatoren“ wurden die Suchbegriffe miteinander kombiniert. Durch den Operator „AND“ wurden Studien ermittelt, die alle gesuchten Begriffe enthalten, durch „OR“ solche, die einen der erfragten Begriffe beinhalten und durch die Verbindung mit „NOT“ wurden Studien, die eine nicht gewünschte Thematik mitbehandeln, ausgeschlossen. Daneben wurde die Fachsystematik MeSH (Medical Subject Headings) verwendet, um die Literatur mittels inhaltlicher Schlagwörter zu durchsuchen und die Auswahl relevanter Studien zu erleichtern. Die Funktion „Advanced Search“ ermöglichte die gezielte Suche beispielsweise nach einem bestimmten Autor, Titel oder Erscheinungsdatum. Eingeschlossen wurden alle relevanten englisch- und deutschsprachigen Studien, die im Zeitraum von Januar 1990 bis September 2017 erschienen.

Bei der Recherche wurde deutlich, dass sich die Autoren M. Fried, M. F. Duffy und S.J. Rogerson besonders mit der Pathogenese und Immunologie von *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft auseinandersetzen. Im Bereich der Impfstoffentwicklung gibt es zwei Arbeitsgruppen, deren Impfstoffe 2016 zur klinischen Prüfungsphase I zugelassen wurden: Zum einen das „PlacMaVac“-Projekt, das unter der

Leitung von M. Nielsen am „Centre for Medical Parasitology“ in Kollaboration mit der Universität Kopenhagen durchgeführt wird, zum anderen das „PRIMALVAC“-Projekt, das von der „European Vaccine Initiative“ (EVI, Heidelberg) und dem „Institut national de la santé et de la recherche médicale“ (Inserm, Frankreich) unter der Leitung von N. Viebig initiiert wurde. In Tabelle 5 ist die Anzahl an Publikationen einiger Autoren mit „Malaria in der Schwangerschaft“ als Schwerpunktthema gelistet.

Tab. 5 Publikationen von Autoren mit Schwerpunktthema „Malaria in der Schwangerschaft“

Autor	Schwerpunktthema	Anzahl an Publikationen	
		gesamt	spezifisch
Fried, M.	Pathogenese und Immunologie	65	50
Duffy, P.E.	Pathogenese und Immunologie	111	51
Rogerson, S.J.	Pathogenese und Immunologie	141	94
Niesen, M.A.	Impfstoffentwicklung (PlacMalVac)	57	38
Deloron, P.	Impfstoffentwicklung (Präklinische Studien)	113	65
Viebig, N.	Impfstoffentwicklung (PRIMALVAC)	18	6

Anzahl der Publikationen am 22.10.2017 auf PubMed; die spezifische Suche erfolgte nach dem Schema „...“[Author] AND „Malaria“ AND „Pregnancy“.

Neben der Recherche in PubMed wurden medizinische Fachbücher und aktuelle Berichte, Empfehlungen und Leitlinien der WHO hinzugezogen. Mithilfe des Literaturverwaltungsprogrammes EndNote wurde eine Literaturliteraturdatenbank angelegt und das Quellenverzeichnis erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta

Die Pathogenese der Schwangerschaftsmalaria ist maßgeblich dadurch bedingt, dass mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten an Rezeptoren in der Plazenta binden und sich im intervillösen Raum ansammeln. Als wichtigste Bindungspartner wird nach heutigem Forschungsstand die Interaktion zwischen dem VAR2CSA-Protein, einer speziellen Variante des PfEMP-1 auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten, und Chondroitinsulfat A (CSA) im intervillösen Raum der Plazenta gesehen (Doritchamou et al. 2014). Das Verständnis der molekularen und strukturellen Vorgänge dieser Bindung steht als Grundlage neuer Interventionsmöglichkeiten, insbesondere der Impfstoffentwicklung, im Zentrum der Forschung. Abb. 9 veranschaulicht die Bindung von VAR2CSA an CSA in der Plazenta.

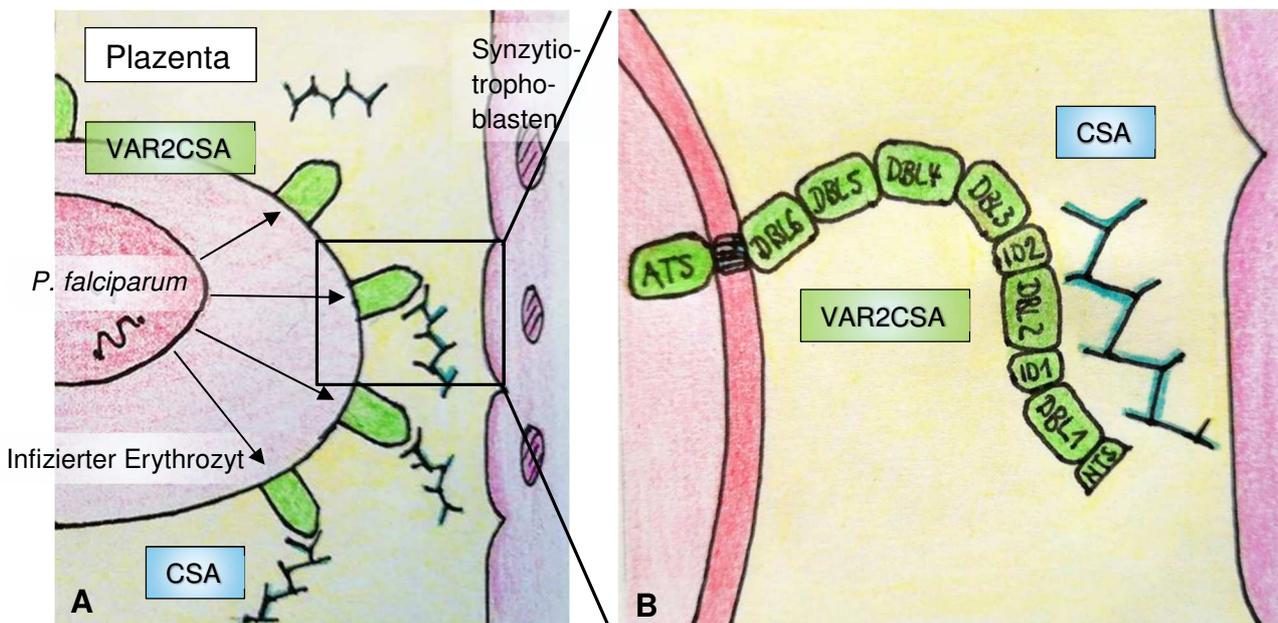


Abb. 9 Vereinfachte Darstellung der Interaktion zwischen VAR2CSA und CSA in der Plazenta

A) *P. falciparum* bewirkt bei Vorhandensein einer Plazenta die Expression von VAR2CSA auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten, welches an CSA im intervillösen Raum bindet **B)** Vergrößerter Abschnitt aus A, VAR2CSA bindet mit den N-terminalen Domänen an CSA

ATS – Saures terminales Segment, DBL– Duffy-binding-like Domäne, ID – Interdomäne, NTS - N-terminales Segment

5.1.1 Chondroitinsulfat A: Funktion, Vorkommen und Struktur

Chondroitinsulfat A (CSA) ist ein Glykosaminoglykan, eine aus Disaccharideinheiten aufgebaute Zuckerkette, die an ein Protein gebunden ein Proteoglykan bildet (Goel und Gowda 2011).

Bereits 1996 wurde CSA von Fried und Duffy als Zielstruktur für die Adhäsion *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten in der Plazenta beschrieben (Fried und Duffy 1996). Im Jahr 2004 wurde es von Muthusamy et al. mittels immunhistochemischen Techniken im intervillösen Raum und in geringem Maß an der Synzytiotrophoblastenschicht nachgewiesen (vgl. Abb. 10). Sie mutmaßen, dass CSA vom Fetus gebildet und in den intervillösen Raum sezerniert wird (Muthusamy et al. 2004). In mit *P. falciparum*-infizierten Plazenten fanden sie signifikant höhere Werte von CSA (Muthusamy et al. 2007, Muthusamy et al. 2004). Da man davon ausgeht, dass Proteoglykane an der Mobilisierung von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren in Geweben beteiligt sind, könnte eine erhöhte Expression von CSA die Plazentafunktion negativ beeinflussen und über eine verstärkte Adhäsion von Parasiten die Entstehung von Komplikationen fördern (Muthusamy et al. 2007, Achur et al. 2003, Nietfeld et al. 1994).

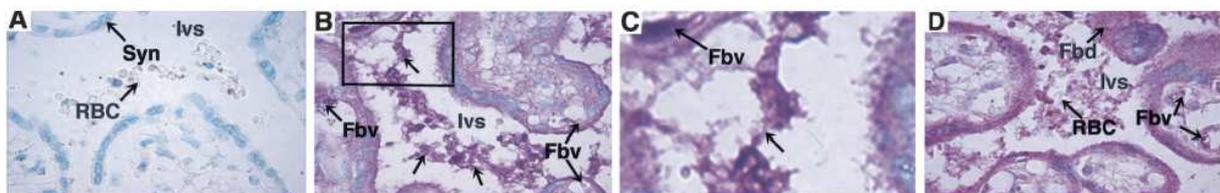


Abb. 10 Immunhistochemische Lokalisation von CSA in der Plazenta (Muthusamy et al. 2004)

A) Keine Färbung durch präimmunes Kaninchenserum (vor der Bildung von Antikörpern gegen CSA)

B, D) Färbung von fibrösem Material und Fibrinoidablagerungen im intervillösen Raum sowie fibrösen Projektionen an der Synzytiotrophoblastenschicht durch Antikörper gegen CSA (durch **Pfeile** markiert)

C) Vergrößerter Ausschnitt aus B

Syn: Synzytiotrophoblasten, RBC: Erythrozyten (red blood cells), Ivs: Intervillöser Raum (intervillous space), Fbv: Fetales Blutgefäß (fetal blood vessel), Fbd: Fibrinoidablagerungen (fibrinoid deposits), Originalpräparat 100fach vergrößert (A, B, D)

Chondroitinsulfat besitzt unterschiedliche Disaccharid- und Sulfonierungsmuster (Goel und Gowda 2011). Für eine effektive Bindung an die infizierten Erythrozyten ist ein ungewöhnlich niedrig sulfoniertes Polysaccharid mit Sulfatgruppen am C4-Atom, Chondroitin-4-Sulfat bzw. Chondroitinsulfat A (CSA) genannt, entscheidend (Achur et al. 2000, Alkhalil et al. 2000). Das minimale Bindungsmotiv besteht aus einer Kette aus sechs Disacchariden (Dodecasaccharid), von denen zwei bis vier sulfoniert und

die restlichen nicht sulfoniert sind (vgl. Abb. 11) (Achur et al. 2008, Alkhalil et al. 2000, Chai et al. 2002, Gowda 2006, Muthusamy et al. 2007). Andere Glykosaminoglykane, höher sulfonierte Ketten und selbst Chondroitin-6-Sulfat binden infizierte Erythrozyten nicht oder nur gering (Achur et al. 2003, Achur et al. 2000, Alkhalil et al. 2000, Fried et al. 2000). Aktuelle Studien belegen, dass CSA von VAR2CSA auf den infizierten Erythrozyten mit hoher Spezifität und Affinität gebunden wird (Khunrae et al. 2010, Srivastava et al. 2010). Neben den C4-Sulfatgruppen sind weitere Strukturelemente von CSA für die Interaktion mit VAR2CSA wichtig, darunter die Karboxylgruppe am nichtreduzierenden Glucuronsäureende und eine oder mehrere Hydroxylgruppen an der C4-Position von N-Acetylglucosamin (Achur et al. 2008, Goel und Gowda 2011, Gowda et al. 2007). Das Dodecasaccharid beschreibt eine linksgerichtete Einzelstranghelix, sodass auch die räumliche Struktur zu berücksichtigen ist (Cael et al. 1978).

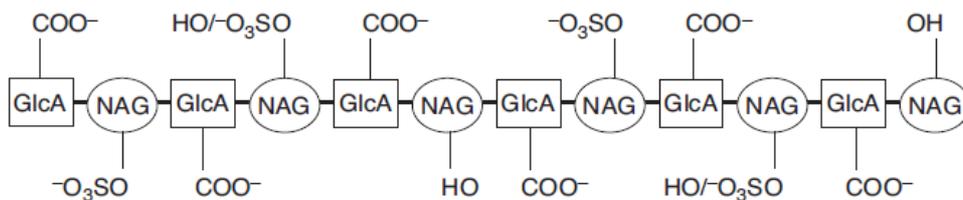


Abb. 11 Schematische Darstellung von Chondroitinsulfat A (CSA) (Goel und Gowda 2011)

CSA ist eine niedrig sulfonierte Polysaccharidkette mit Sulfatgruppen am C4-Atom. Hier dargestellt ist ein Dodecasaccharid (sechs Disaccharideinheiten) mit vier am C4-Atom sulfonierten und zwei nicht sulfonierten Disacchariden. Für die Bindung an VAR2CSA sind folgende Strukturen wichtig: Karboxylgruppen von GlcA, C4-Hydroxylgruppe von NAG, C4-Sulfatgruppen.

GlcA: Glucuronsäure, NAG: N-Acetylglucosamin, ⁻O₃SO: Sulfatgruppe, COO⁻: Karboxylgruppe, OH: Hydroxylgruppe

Der genaue molekulare und strukturelle Aufbau von CSA ist wichtig, um in Laboren die Interaktion mit VAR2CSA analysieren zu können (Goel und Gowda 2011). Zudem ergeben sich neue therapeutische Ansätze, wie beispielsweise die Entwicklung von Chondroitinsulfat-Oligomeren, die mit höherer Affinität als CSA an VAR2CSA binden und auf diese Weise die Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta behindern (Beaudet et al. 2014). Allerdings besteht hier noch weiterer Forschungsbedarf.

Box 1

Aktueller Wissensstand

Funktion, Vorkommen und Struktur von CSA

1. CSA ist eine Zuckerseitenkette eines Proteoglykans, es wird vom Fetus gebildet und in den intervillösen Raum sezerniert; bei Infektion mit *P. falciparum* wird es signifikant erhöht vorgefunden (Muthusamy et al. 2007).
2. Proteoglykane sind an der Mobilisierung von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren in Geweben beteiligt (Nietfeld et al. 1994, Achur et al. 2003).
3. CSA ist eine niedrig sulfonierte Form von Chondroitinsulfat mit Sulfatgruppen am C4-Atom (Achur et al. 2000, Goel und Gowda 2011).
4. Das minimale Bindungsmotiv für VAR2CSA besteht aus sechs Disacchariden (Dodecasaccharid), von denen zwei bis vier am C4-Atom sulfoniert sind (Alkhalil et al. 2000, Chai et al. 2002, Gowda 2006, Muthusamy et al. 2007).
5. Die Bindung infizierter Erythrozyten bzw. von VAR2CSA an CSA ist hoch spezifisch (Achur et al. 2000, Achur et al. 2003, Alkhalil et al. 2000, Fried et al. 2000, Goel und Gowda 2011, Khunrae et al. 2010, Srivastava et al. 2010).
6. Das Wissen über die genaue Struktur von CSA ist für Laborzwecke unerlässlich und bietet neue therapeutische Möglichkeiten (Goel und Gowda 2011, Beudet et al. 2014).

5.1.2 VAR2CSA: Struktur, Funktion und Polymorphismus

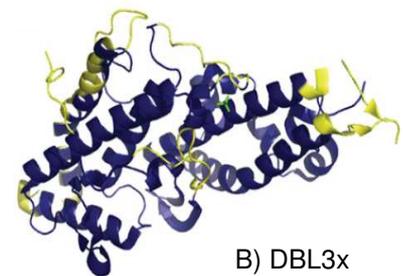


Abb. 12 Schematische Darstellung von VAR2CSA und DBL3x

A) Schematische Darstellung von VAR2CSA (Goel und Gowda 2011)
 NTS - N-terminales Segment, ID – Interdomäne, DBL – Duffy-binding-like Domäne, TMS – Transmembran-Segment, ATS – Saures terminales Segment

B) Struktur von DBL3x mit polymorphen Anteilen in Gelb, konservierten Anteilen in Blau und Sulfation in Grün (Khunrae und

VAR2CSA, eine spezielle Variante des PfEMP-1, wird selektiv von plazentaren Parasiten auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert. Es wurde 2003 von Salanti et al. entdeckt und in zahlreichen weiteren Studien als wichtigster Ligand von CSA bestätigt (Salanti et al. 2003, Duffy et al. 2006, Gamain et al. 2005, Salanti et al. 2004, Tuikue Ndam et al. 2005, Viebig et al. 2005, Viebig et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung des *var2csa*-Gens zum Verlust der CSA-Bindungsfähigkeit führt (Duffy et al. 2006, Viebig et al. 2005). Keine weiteren hochregulierten *var*-Gene standen im direkten Zusammenhang mit plazentarer Adhäsion (Viebig et al. 2007).

VAR2CSA ist ein großes (350kDa) transmembranöses Polypeptid. Der extrazelluläre Anteil besteht aus sechs Duffy-binding-like-Domänen (jeweils drei DBL-Domänen der

Klasse x und ϵ , wobei die Klassenbezeichnung in der weiteren Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen wird), einer zysteinreichen Interdomäne (ID2a/b) und weiteren kurzen Interdomänen-Segmenten (ID1, ID4) (vgl. Abb. 12, A) (Rieger et al. 2015). Welche Bereiche von VAR2CSA am stärksten an der Bindung zu CSA beteiligt sind, wird kontrovers diskutiert und im folgendem Kapitel dargestellt. VAR2CSA unterscheidet sich strukturell und funktionell stark von anderen PfEMP-1-Proteinen. So fehlen beispielsweise spezifische Domänen, die für die Erkennung von vaskulären Rezeptoren, wie CD36 und ICAM-1, nötig sind (Doritchamou et al. 2014, Salanti et al. 2003). Auch Rosetting – ein sonst wichtiger Pathogenesefaktor durch Aneinanderlagern von infizierten Erythrozyten – ist bei plazentarer Infektion untypisch (Rogerson et al. 2000a, Stevenson et al. 2015, Maubert et al. 1998). Am besten ist die Struktur der DBL3x-Domäne (DBL3) verstanden, die CSA in *in vitro*-Studien bindet und in zwei unabhängigen kristallographischen Studien untersucht wurde (Higgins 2008, Singh et al. 2008). DBL3 besteht aus einer α Helix mit zahlreichen eingefügten Schleifen und kann in drei Subdomänen unterteilt werden (vgl. Abb. 12, B). Eine Schleife zwischen der zweiten und dritten Subdomäne, die im ungebundenen Zustand ungeordnet vorliegt, nimmt in Anwesenheit von Sulfat oder Disacchariden Struktur an und bildet eine Sulfatbindungstasche (Higgins 2008). Durch die Konformationsänderung entsteht eine positiv geladene Region, die das negativ geladene CSA anzieht. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesen Bereichen die Bindung von CSA an DBL3 stark beeinträchtigen (Khunrae et al. 2009, Singh et al. 2008). Die flexible Schleife und weitere sie umgebende Strukturen liegen an der Domänenoberfläche, sind polymorph und schützen möglicherweise die CSA-Bindungsstelle vor der Erkennung durch das Immunsystem (Higgins 2008). Aufgrund der Größe und der Komplexität von VAR2CSA konnte bisher nur die Quartärstruktur einzelner Domänen, nicht aber die des gesamten Proteins dargestellt werden (Gangnard et al. 2013, Gangnard et al. 2015).

Beim Vorhandensein einer Plazenta switcht eine *P. falciparum*-Subpopulation auf die Expression des *var2csa*-Gens, eines von 60 *var*-Genen von PfEMP-1, um (Scherf et al. 1998). Im Gegensatz zu den übrigen *var*-Genen, die sich zwischen den Stämmen stark unterscheiden, ist *var2csa* relativ konserviert (Fried und Duffy 2002, Rowe et al. 2002, Salanti et al. 2002, Salanti et al. 2003). Das *var2csa*-Gen wird bei der Analyse des Genoms von *P. falciparum*-Isolaten unterschiedlicher Regionen in beinahe allen Stämmen nachgewiesen (Salanti et al. 2003, Rowe et al. 2002, Trimnell et al. 2006). Kraemer et al. können von den 60 *var*-Genen nur drei, darunter *var2csa*, finden, die in

allen drei untersuchten *P. falciparum*-Stämmen (3D7-, IT4- und HB3-Stamm) enthalten sind. Während sich selbst bei gleichem Aufbau des var-Gens wichtige Domänen von PfEMP-1 in weniger als 50% ihrer Aminosäuresequenz gleichen, sind über 75% der Sequenz des konservierten var2csa-Gens identisch (Kraemer et al. 2007). In einer anderen Studie, in der 11 VAR2CSA-Aminosäuresequenzen von Parasitenisolaten weltweit verglichen werden, wird eine durchschnittliche Übereinstimmung von 78% gefunden (Bockhorst et al. 2007). Ursache der für var-Gene ungewöhnlich hohen Konservierung könnte die Lage von var2csa im Genom sein, die Rekombinationsmöglichkeiten mit anderen var-Genen einschränkt (Kraemer et al. 2007, Kraemer und Smith 2003, Lavstsen et al. 2003).

Im Vergleich zu nicht-var-Proteinen besitzt VAR2CSA jedoch zahlreiche polymorphe Areale, die zu einer hohen antigenen Vielfalt und verschiedenen plazentaren *P. falciparum*-Stämmen führen (Trimnell et al. 2006, Sander et al. 2009). Polymorphismen entstehen unter Selektionsdruck durch Exposition zum Wirtsimmunsystem und sind wichtige Mechanismen zur Immunevasion (Bockhorst et al. 2007, Doritchamou et al. 2015, Trimnell et al. 2006). Sie liegen meist an der Proteinoberfläche, schützen konservierte Areale vor der Immunabwehr und behindern die Bildung von stammesübergreifenden Antikörpern (Andersen et al. 2008, Dahlback et al. 2010, Khunrae und Higgins 2010). Durch die Analyse der Aminosäuresequenz von VAR2CSA und den Vergleich von VAR2CSA-Sequenzen verschiedener *P. falciparum*-Stämme können konservierte und polymorphe Areale identifiziert und die DBL-Domänen von VAR2CSA näher charakterisiert werden. So untersuchen Dahlback et al. die DBL3-Domäne von 43 plazentaren *P. falciparum*-Isolaten aus dem Senegal und zeigen, dass DBL3 aus vier hochkonservierten Sequenzen (C1-4) und drei variablen Sequenzen (V1-3) besteht. Auch einige der konservierten Bereiche befinden sich an der Proteinoberfläche und sind Zielstruktur von natürlich erworbenen Antikörpern (Dahlback et al. 2006). In einer anderen Studie, in der 76 verschiedene AS-Sequenzen von *P. falciparum*-Stämmen aus Kenia untersucht werden, kann der Aufbau der DBL3-Domäne mit vier konservierten und drei variablen Bereichen bestätigt werden (Talundzic et al. 2012). Rovira-Vallbona et al. analysieren die variablen Sequenzen der DBL2- und DBL3-Domäne von plazentaren *P. falciparum*-Isolaten aus Mosambik und finden sechs Sequenzmotive, die mit hoher Parasitämie assoziiert sind (Rovira-Vallbona et al. 2013). Sander et al. konzentrieren sich auf die Sequenz der DBL2-Region von VAR2CSA und entdecken darin ein sogenanntes

„dimorphes“ Strukturmotiv von 26 AS Länge, das je nach Sequenz die untersuchten Stämme in zwei phylogenetische Gruppen (den FCR3- und den 3D7-Stamm) einteilt (Sander et al. 2009). Eine weitere dimorphe Region von 167 AS Länge wurde 2015 von Doritchamou et al. in der Interdomäne 1 (ID1) entdeckt, wobei 76% der untersuchten plazentaren Isolate aus Benin die erste Variante (Cluster 1) und 24% die zweite Variante (Cluster 2) enthalten. *P. falciparum*-Isolate mit Cluster 2 sind sowohl mit mehrfacher Schwangerschaft als auch mit hoher Parasitämie assoziiert (Doritchamou et al. 2015). Die dimorphen Areale scheinen eine essentielle Funktion in der Pathogenese einzunehmen, da sie wichtige Elemente zur CSA-Bindung enthalten und evolutionsgeschichtlich lange stabil geblieben sind (Doritchamou et al. 2015, Sander et al. 2009). DBL6 gilt mit sieben variablen Blöcken als am wenigsten konservierte Domäne von VAR2CSA. Bei genauerer Untersuchung dieser Blöcke fällt jedoch auf, dass sie aus einer limitierten Zahl an Konsensussequenzen, also ähnlichen oder identischen Sequenzmustern, bestehen (Badaut et al. 2010). Deloron et al. und Gangnard et al. zeigen, dass innerhalb von DBL-6 die variablen Blöcke 1 und 5 (VB1, VB5) verschiedener Parasitenstämme von Antikörpern aus dem Plasma exponierter Schwangerer kreuzreaktiv erkannt werden (Deloron et al. 2013, Gangnard et al. 2013). Vier Studien befassen sich mit dem Vergleich von weltweiten Parasitenstämmen. Sie kommen überein, dass die Gendiversität von *var2csa* auf einer hohen Rate von Selbst-Rekombination mit einem limitierten Repertoire an Sequenzen beruht. In vielen variablen Regionen ist der Polymorphismus somit durch bereits bekannte oder ähnliche Struktur motive begrenzt (Bockhorst et al. 2007, Bordbar et al. 2014, Trimnell et al. 2006, Hommel et al. 2010). Diese weltweit geteilten Struktur motive sowie konservierte oberflächenexponierte Areale von VAR2CSA sind von besonderem Interesse, da sie eine stammesübergreifende kreuzreaktive Antikörperproduktion hervorrufen können (Bockhorst et al. 2007, Bordbar et al. 2014, Dahlback et al. 2006). VAR2CSA ist der führende Kandidat für einen Impfstoff gegen Malaria in der Schwangerschaft. Allerdings stellen Polymorphismus und Größe (350 kDA) des Proteins zwei Hauptprobleme dar, die die Herstellung des gesamten Proteins zu kommerziellen Zwecken bisher unmöglich machen (Fried und Duffy 2015). Daher steht die Identifizierung des minimalen Bindungsbereiches innerhalb von VAR2CSA, der eine ähnlich hohe CSA-Bindungsaffinität und -spezifität wie das gesamte Protein aufweist und gleichzeitig eine breite bindungshemmende Antikörperproduktion hervorruft, im Fokus der Forschung (Bordbar et al. 2014).

Box 2

Aktueller Wissensstand

Struktur, Funktion und Polymorphismus von VAR2CSA

1. VAR2CSA wird von plazentaren bzw. CSA-selektiven Parasiten auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert. Es ist essentiell für die Bindung an CSA (Salanti et al. 2003, 2004; Duffy et al. 2006, Viebig et al. 2005, 2007).
2. VAR2CSA besteht aus sechs DBL-Domänen (DBL1-3x, DBL4-6ε) sowie Interdomänen (ID1, 2) (Rieger et al. 2015).
3. *var2csa*, eines von 60 verschiedenen *var*-Genen, reguliert die Expression von VAR2CSA und ist relativ gut konserviert (Fried und Duffy 2002, Rowe et al. 2002, Salanti et al. 2002, 2003, Trimnell et al. 2006, Kremer et al. 2007, Bockhorst et al. 2007).
4. Polymorphismen erhöhen die antigene Vielfalt und dienen der Immunevasion (Trimnell et al. 2006, Doritchamou et al. 2015).
5. Bestimmte Strukturmodule können mit der Schwangerschaftszahl und hoher Parasitämie assoziiert werden (Dahlback et al. 2006, Talundzic et al. 2012, Rovira-Vallbona et al. 2013, Doritchamou et al. 2015).
6. Der Vergleich von Parasitenstämmen unterschiedlicher geografischer Regionen zeigt, dass das Rekombinationspotential begrenzt ist und viele Strukturmodule weltweit geteilt werden (Trimnell et al. 2006, Bockhorst et al. 2007, Hommel et al. 2010, Bordbar et al. 2014).
7. VAR2CSA ist der führende Impfstoffkandidat. Größe und Polymorphismus stellen die zwei Hauptprobleme bei der Impfstoffentwicklung dar (Fried und Duffy 2015).

Weiterer Forschungsbedarf

1. Quartärstruktur des gesamten VAR2CSA-Proteins
2. Regulationsmechanismen des Switching auf die Expression des *var2csa*-Gens
3. Auswirkungen (geographisch) unterschiedlicher Genotypen auf den Erfolg eines Impfstoffes
4. Oberflächenexponierte konservierte VAR2CSA-Areale und weltweit geteilte Strukturmodule innerhalb der variablen Regionen von VAR2CSA

5.1.3 Interaktion von VAR2CSA und CSA

Es stellt sich die Frage, ob einzelne Domänen von VAR2CSA eigenständig an CSA binden können. Um dies zu testen, wurden die DBL-Domänen zweier bekannter *P. falciparum*-Laborstämme, des 3D7- und des FCR3-Stammes, rekombinant hergestellt und ihre Bindung an immobilisiertes CSA *in vitro* gemessen. Dabei konnten vier Domänen (DBL2, DBL3, DBL5 und DBL6) gefunden werden, die eine Bindung zu CSA aufweisen. Allerdings variieren die Ergebnisse je nach Studie und Stamm: vom 3D7-Stamm binden DBL2 (Avril et al. 2006, Bir et al. 2006, Gamain et al. 2005, Resende et al. 2009, Resende et al. 2008), DBL3 (Bir et al. 2006, Dahlback et al. 2006, Khunrae et al. 2009, Resende et al. 2008), DBL5 (Avril et al. 2006, Resende et al. 2008) und DBL6 (Avril et al. 2006, Gamain et al. 2005, Khunrae et al. 2009, Resende et al. 2009), vom FCR3-Stamm binden vor allem DBL2 (Gamain et al. 2005, Resende et al. 2009) und DBL3 (Dahlback et al. 2006, Gamain et al. 2005, Resende et al. 2009, Singh et al. 2008) (vgl. Tab. 6).

Tab. 6 Bindung der einzelnen DBL-Domänen an CSA

Domänen	DBL1	DBL2	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6	Spezifität zu CSA
Autor, Jahr	<i>3D7-Stamm</i>						
Gamain et al. 2005	nein	ja	nein	nein	nein	ja	ja
Avril et al. 2006	nein	ja	nein	nein	ja	ja	-
Bir et al. 2006	nein	ja	ja	nein	nein	nein	ja
Dahlback et al. 2006	-	-	ja	nein	-	-	-
Resende et al. 2008	ja	ja	ja	ja	ja	nein	DBL2 ja
Resende et al. 2009	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein
Khunrae et al. 2009	nein	-	ja	nein	-	ja	nein
Autor, Jahr	<i>FCR3-Stamm</i>						
Gamain et al. 2005	nein	ja	ja	-	-	-	ja
Dahlback et al. 2006	-	-	ja	-	-	-	-
Singh et al. 2008	-	-	ja	-	-	-	ja
Resende et al. 2009	ja	ja	ja	nein	ja	ja	nein

Weiterhin ist fraglich, ob die einzelnen Domänen CSA mit ähnlich hoher Spezifität und Affinität binden können wie der gesamte extrazelluläre Abschnitt von VAR2CSA. Um die Spezifität zu messen, wurde getestet, ob das Beifügen von CSC (Chondroitinsulfat C bzw. Chondroitin-6-Sulfat) oder HA (Hyaluronsulfat) die Bindung der Domänen an CSA (Chondroitinsulfat A bzw. Chondroitin-4-Sulfat) beeinträchtigt. Gamain et al., Bir et al. und Singh et al. konnten in ihren Studien eine CSA-spezifische Bindung nachweisen (Bir et al. 2006, Gamain et al. 2005, Singh et al. 2008). In einer neueren Studie von Resende et al. dagegen beeinflusste die Zugabe von CSC und HA die CSA-Bindung der einzelnen DBL-Domänen während das gesamte VAR2CSA-Protein ausschließlich an CSA band (Resende et al. 2009). Khunrae et al. untersuchten die DBL3- und DBL6-Domäne des 3D7-Stammes und fanden heraus, dass sie unspezifisch verschiedene Glykosaminoglykane – insbesondere solche mit hoher Sulfonierung und vielen negativen Ladungen – binden (Khunrae et al. 2009).

Im Jahr 2010 konnte erstmals der gesamte extrazelluläre VAR2CSA-Bereich von zwei Stämmen, dem FCR3- und dem 3D7-Stamm, rekombinant hergestellt werden (Khunrae et al. 2010, Srivastava et al. 2010). Im Vergleich zu diesen ist die Affinität der einzelnen Domänen zu CSA deutlich, zum Teil sogar 100.000fach niedriger. Während beim gesamten Protein Konzentrationen im nanomolaren Bereich ausreichen, um >50% von CSA zu binden (Dissoziationskonstante K_D für 3D7-DBL1-DBL6 = 61nM bzw. 127nM, FCR3-DBL1-DBL6 = 0,36nM), sind bei einzelnen Domänen mikromolare Konzentrationen nötig (K_D für 3D7-DBL2 = 5,3 μ M, FCR3-DBL3 = 344 μ M, 3D7-DBL6 = 92 μ M) (Khunrae et al. 2010, Srivastava et al. 2011, Srivastava

et al. 2010) (vgl. Tab. 7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einzelne Domänen nicht dieselbe funktionelle Kapazität wie das gesamte VAR2CSA-Protein aufweisen und dass eine spezifische und hochaffine CSA-Bindung mehrere Domänen erfordert. Srivastava et al. untersuchten daher verschiedene Domänenkombinationen des 3D7-Stammes auf ihre kinetischen Eigenschaften zu CSA. Sie fanden heraus, dass Domänen im N-terminalen Bereich von VAR2CSA CSA mit ähnlich hoher Affinität wie das gesamte Protein binden können (K_D für 3D7-DBL1-DBL2 = 770nM, 3D7-DBL1-DBL3 = 580nM) (Srivastava et al. 2011). Dahlback et al. analysierten Fragmente des FCR3-Stammes und definieren eine Kernregion im N-terminalen Bereich (DBL2-ID2b), die mit relativ hoher Affinität ($K_D = 40$ nM) an CSA bindet. Durch Anhängen der angrenzenden Regionen (DBL1 und DBL3) wird die Interaktion nochmals verstärkt, sodass eine ähnlich hohe Affinität wie beim gesamten Protein entsteht (K_D für DBL1-ID2b = 2,7nM, K_D für ID1-DBL3 = 0,86nM) (Dahlback et al. 2011). Laut Clausen et al. liegt die minimale Bindungsregion in einem noch kleineren Bereich, in ID1-DBL2b ($K_D = 21,8$ nM), wobei DBL2b bis zu 93 Aminosäuren in das ID2a Segment reicht. Da ID1-DBL2 keine Bindung zu CSA aufweist, ID1-DBL2b dagegen mit hoher Affinität bindet, müssen diese 93 Aminosäuren von ID2a eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit CSA spielen. Die ID1-Region scheint zwar nicht für die direkte Bindung, dafür aber für die Formation eines funktionsfähigen CSA-Bindeproteins essentiell zu sein (Clausen et al. 2012). Bis auf DBL2-ID2b bei Dahlback et al. und DBL1-ID2b bei Clausen et al. zeigen alle VAR2CSA-Fragmente eine Spezifität für CSA (Clausen et al. 2012, Dahlback et al. 2011). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch Kombination mehrerer N-terminal gelegener Domänen um DBL2 herum eine hohe CSA-Spezifität und Affinität erreicht werden kann. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der kinetischen Studien.

Die räumliche Struktur von VAR2CSA ist komplex. Um eine hochspezifische und -affine Bindung an das niedrig sulfonierte CSA eingehen zu können, scheinen mehrere Domänen von VAR2CSA miteinander in Kontakt zu treten und eine höher geordnete Quartärstruktur zu bilden (Khunrae und Higgins 2010, Khunrae et al. 2010, Srivastava et al. 2010). So entstehen spezifische Taschen, Schleifen und Strukturen, die mit den verschiedenen funktionellen Gruppen von CSA interagieren (Goel und Gowda 2011). Experimente mittels Kleinwinkelröntgenstreuung zeigen, dass VAR2CSA eine wesentlich kompaktere Struktur aufweist, als man von einer linearen Kette von Domänen erwarten würde (Khunrae et al. 2010). In einer kürzlich veröffentlichten

Studie gehen Rieger et al. davon aus, dass VAR2CSA ein allosterisches Protein mit positiver Kooperativität ist. Das heißt, dass die Bindung einer funktionellen CSA-Gruppe an einer Domäne von VAR2CSA die Konformation des Proteins so ändert, dass die Bindungsaffinität für weitere CSA-Gruppen immer stärker zunimmt (Rieger et al. 2015). Die höher geordnete 3D-Struktur von VAR2CSA ist komplex und bedarf weiterer Forschung.

Tab. 7 Schematische Darstellung verschiedener VAR2CSA-Fragmente mit Dissoziationskonstanten

VAR2CSA										Autor, Jahr, <i>P.falciparum</i> -Stamm, K_D Wert (nM)		
Multi-domänen	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6	Srivastava et al. 2011 3D7	Dahlback et al. 2011 FCR3	Clausen et al. 2012 FCR3
	DBL1-DBL6	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6	127	0,54
DBL1-DBL2	DBL1	ID1	DBL2							770	N/A ¹	N/A
DBL1-ID2a	DBL1	ID1	DBL2	ID2a						-	-	8,0
DBL1-ID2b	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b					1580	2,7	1,5 ²
DBL1-DBL3	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3				580	3,7 ¹	-
ID1-DBL2		ID1	DBL2							-	-	N/A ³
ID1-DBL2b		ID1	DBL2b							-	-	21,8 ³
ID1-ID2a		ID1	DBL2	ID2a						-	-	7,6
ID1-DBL3		ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3				-	0,86	-
ID1-DBL4		ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4			-	0,76	-
DBL2-ID2b			DBL2	ID2a	ID2b					-	40 ²	-

Dissoziationskonstanten K_D aus drei Studien (Srivastava et al. 2011, Dahlback et al. 2011, Clausen et al. 2012). Die minimalen CSA-Bindungsregionen der jeweiligen Studien wurden farblich hervorgehoben. nM: Nanomol, N/A: Kinetik konnte aufgrund von fehlender Bindung an CSA nicht analysiert werden, ¹der N-terminale Bereich wurde mitgetestet (NTS-DBL2, NTS-DBL3), ²weisen keine CSA-Spezifität auf, ³Proteine wurden anhand des 3D7-Stammes produziert

Box 3

Aktueller Wissensstand

Interaktion zwischen VAR2CSA und CSA – Der minimale CSA-Bindungsereich

1. Einzelne DBL-Domänen (DBL2, -3, -5, -6) binden zwar an CSA, allerdings mit geringerer Spezifität und Affinität als das gesamte Protein (Gamain et al. 2005, Avril et al. 2006, Bir et al. 2006, Resende et al. 2008, 2009, Srivastava et al. 2010, Khunrae et al. 2010).
2. Durch Kombination mehrerer N-terminaler Domänen um DBL2 herum kann eine hohe CSA-Spezifität und Affinität erreicht werden (Srivastava et al. 2011, Dahlback et al. 2011, Clausen et al. 2012).
3. Die minimale Bindungsregion für den 3D7-Stamm liegt im Bereich DBL1-DBL2 (Srivastava et al. 2011), für den FCR3-Stamm im Bereich DBL2-ID2b (Dahlback et al. 2011) bzw. ID1-DBL2b (Clausen et al. 2012).
4. VAR2CSA bildet eine höher geordnete Quartärstruktur mit positiver Kooperativität und spezifischen CSA-Bindungsstrukturen (Khunrae und Higgins 2010, Rieger et al. 2015).

Weiterer Forschungsbedarf

1. Minimaler Bindungsereich anderer Stämme und plazentarer Isolate
2. Höher geordnete Quartärstruktur und CSA-Bindungsmechanismen von VAR2CSA

5.1.4 Weitere relevante Bindungsstrukturen

Es wird diskutiert, ob neben CSA weitere Rezeptoren, darunter Hyaluronsulfat (HA) und der F_c-Teil unspezifischer Antikörper zur Pathogenese der Schwangerschaftsmalaria beitragen (Beeson et al. 2000, Flick et al. 2001). Beeson et al. zeigen, dass plazentare Isolate *in vitro* auch an HA binden können und dass zumindest einige *P. falciparum*-Stämme sowohl CSA als auch HA erkennen (Beeson und Brown 2004, Beeson et al. 2000). Plazentare Isolate aus Uganda weisen in einer Studie von Rasti et al. eine Bindung zu CSA, HA und unspezifischem IgG und IgM auf (Rasti et al. 2006). Weitere Studien bestätigen die Bindung des F_c-Teils von IgM an VAR2CSA, wobei sie eher der Immunevasion durch Abschirmung als der Adhäsion dient (Barfod et al. 2011, Creasey et al. 2003, Stevenson et al. 2015, Semblat et al. 2006). Andere Studien können keine signifikante Bindung zu HA oder IgG-Antikörpern nachweisen (Fried et al. 2006, Viebig et al. 2007, Khunrae et al. 2010, Srivastava et al. 2010). Weiterhin zeigen Muthusamy et al., dass HA im intervillösen Raum nicht vorkommt, wodurch eine essentielle Rolle in der Pathogenese unwahrscheinlich scheint (Muthusamy et al. 2007). Tab. 8 gibt einen Überblick über die diskutierten Rezeptoren. Da CSA nach aktuellem Forschungsstand als Hauptrezeptor für plazentare Parasiten gilt, konzentrieren sich die Bemühungen zur Impfstoffentwicklung auf die Hemmung der CSA-VAR2CSA-Interaktion (Fried et al. 2006, Clausen et al. 2012). Zusätzliche Interaktionen, wie beispielsweise die Immunevasion der Parasiten durch das Abschirmen mittels IgM, können den Erfolg des Impfstoffes aber stark beeinflussen oder neue wichtige Angriffspunkte darstellen und sollten daher weiter erforscht werden (Pehrson et al. 2016, Barfod et al. 2011).

Tab. 8 Bindung von plazentaren Isolaten bzw. VAR2CSA* an anderen Rezeptoren als CSA

Rezeptoren	Signifikante Bindung	Keine signifikante Bindung
Hyaluronsulfat (HA)	Beeson und Brown 2000	Fried et al. 2006
	Beeson et al. 2004	Muthusamy et al. 2007
	Rasti et al. 2006	Viebig et al. 2007
		Khunrae et al. 2010*
		Srivastava et al. 2010*
Fc-Rezeptor von IgG und IgM	Flick et al. 2001 (IgG)	Fried et al. 2006 (IgG)
	Creasey et al. 2003 (IgM)	Viebig et al. 2007 (IgG)
	Rasti et al. 2006 (IgG, IgM)	
	Semblat et al. 2006 (IgM)*	
	Barfod et al. 2011 (IgM)*	
	Steverson et al. 2015 (IgM)*	

In früheren Studien wurden neben var2csa weitere var-Gene, wie var1csa und varCS2, mit der Adhäsion infizierter Erythrozyten in Verbindung gebracht, dies kann allerdings in neueren Studien nicht bestätigt werden (Scherf et al. 1998, Buffet et al. 1999, Jensen et al. 2003, Viebig et al. 2005, Tuikue Ndam et al. 2005). In Studien, die das Genom und die Proteinsynthese von plazentaren Parasiten untersuchen, lassen sich jedoch weitere hochregulierte Gene und Proteine finden, die indirekt an der Pathogenese beteiligt sein könnten. So weisen Francis et al. sechs konservierte Gene nach, die bei plazentaren Stämmen im Vergleich zu Erregern bei Kindern erhöht vorliegen (Francis et al. 2007). Ndam et al. identifizieren 38 hochregulierte Gene, darunter fünf der sechs Gene von Francis et al. (Tuikue Ndam et al. 2008). Auf Syntheseebene können sechs Proteine ausschließlich bei plazentaren Parasiten und 13 Proteine überexprimiert ausgemacht werden (Bertin et al. 2013, Fried et al. 2007). Die Proteine PFI0115w und PFI1785w fallen durch eine besonders hohe Expressionsrate auf und können in Stämmen verschiedener Regionen Afrikas (Tansania, Senegal, Benin) gefunden werden (Bertin et al. 2013, Francis et al. 2007, Fried et al. 2007, Tuikue Ndam et al. 2008). Weitere Studien sollten untersuchen, welchen Einfluss diese hochregulierten Proteine auf die CSA-Bindung haben und ob sie klinische und therapeutische Relevanz besitzen. Goel et al. weisen z.B. ein Protein nach, das eine entscheidende Rolle beim Transport von VAR2CSA zur Erythrozytenoberfläche einnimmt, das sog. CLAG9 (cytoadherence-linked asexual gene). Beim Fehlen von CLAG9 bleibt VAR2CSA im Inneren der Parasiten eingeschlossen (Goel et al. 2010).

Box 4

Aktueller Wissensstand

Weitere relevante Bindungsstrukturen von infizierten Erythrozyten in der Plazenta

1. Hyaluronsulfat und unspezifisches IgG/M werden als weitere Rezeptoren für infizierte Erythrozyten diskutiert (Flick et al. 2001, Beeson et al. 2000, 2004, Rasti et al. 2006).
2. Die Bindung von IgM an VAR2CSA dient der Immunevasion durch Abschirmung (Creasey et al. 2003, Semblat et al. et al. 2006, Barfod et al. 2011, Steverson et al. 2015).
3. CSA gilt weiterhin als Hauptrezeptor infizierter Erythrozyten (Fried 2006, Muthusamy 2007)
4. VAR2CSA ist der Hauptrezeptor für CSA (Viebig et al. 2005).
5. Weitere hochregulierte Gene/ Proteine können bei plazentaren Parasiten ausgemacht werden; von besonderem Interesse sind die Proteine PFB0115w und PFI1785w (Francis et al. 2007, Fried et al. 2007, Tuikue Ndam et al. 2008, Bertin et al. 2013).

Weiterer Forschungsbedarf

1. Weitere mögliche plazentare Rezeptoren für infizierte Erythrozyten
2. Genaues Verständnis der IgM-VAR2CSA Interaktion mit Immunevasion und Identifizierung der Epitope für die IgM-Bindung als potentielle Antigene für einen Impfstoff
3. Funktion und klinische Relevanz hochregulierter Proteine, wie PFB0115w und PFI1785w
4. Therapeutischer Nutzen von Proteinen wie CLAG9

5.2 Pathogenese und Folgen der plazentaren Inflammation

5.2.1 Histologische Veränderungen der Plazenta

In histologischen Präparaten können bei aktiver *P. falciparum*-Infektion mit Parasiten voll bepackte Erythrozyten im intervillösen Raum gefunden werden. Nach einiger Zeit, vor allem aber bei aktiver chronischer Infektion, kann zudem das Malariapigment Hämozoin, entweder in eingewanderten Monozyten oder in Fibrinablagerungen, nachgewiesen werden (Ismail et al. 2000). Hämozoinablagerungen ohne Parasitämie sprechen für eine durchgemachte, nicht aktive Infektion (vgl. Tab. 9) (Rogerson et al. 2007b, Walter et al. 1982). Eine akute Infektion ist eher mit Frühgeburt, eine chronische Infektion mit mütterlicher Anämie und erniedrigtem Geburtsgewicht durch fetale Wachstumsretardierung assoziiert (Brabin et al. 2004). Weitere histologische Veränderungen vor allem bei chronischer Entzündung sind Fibrinablagerungen, Verklumpung der Synzytiotrophoblasten und Verdickung der Trophoblasten-basalmembran (Bulmer et al. 1993, Ismail et al. 2000, Walter et al. 1982). Abb. 13 zeigt die histologischen Hauptmerkmale einer plazentaren Infektion.

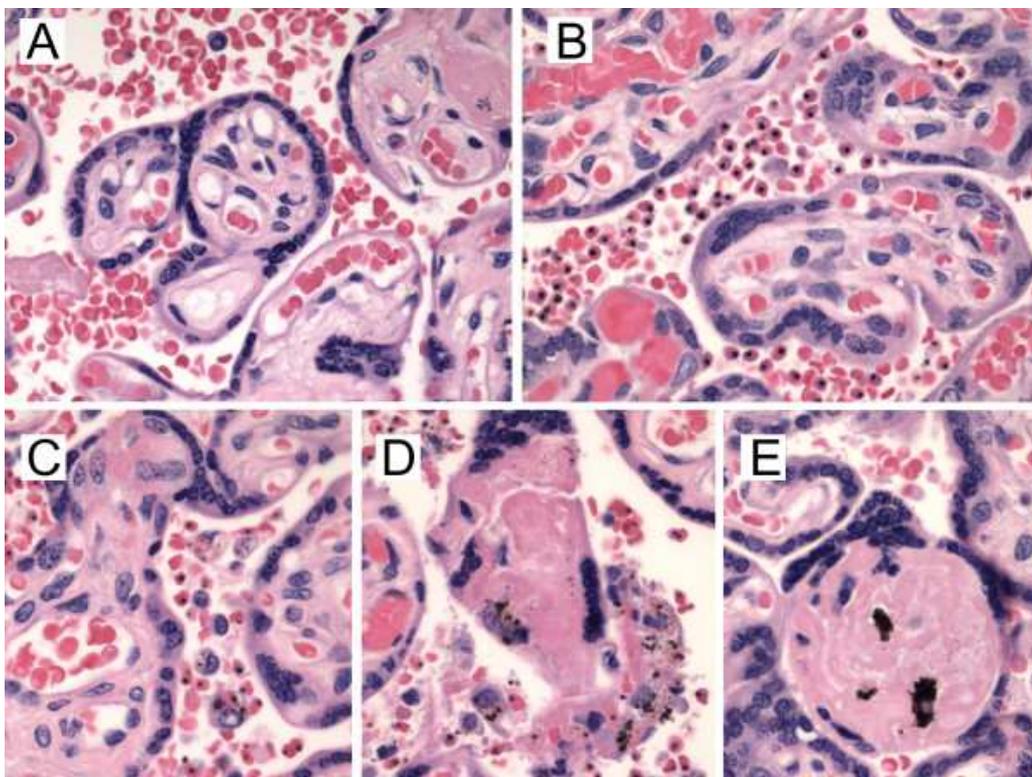


Abb. 13 Hauptmerkmale der plazentaren Malaria (Muehlenbachs et al. 2012)

A) Normale Plazentahistologie. **B)** Parasiten-infizierte Erythrozyten sequestrieren im intervillösen Raum **C)** Monozyten-Makrophagen akkumulieren und phagozytieren Parasiten-infizierte Erythrozyten und Hämozoin. **D)** Monozyten-Makrophagen werden in Fibrin verstrickt und degenerieren. **E)** Verbliebenes Hämozoin persistiert in Fibrin nach erfolgreicher Therapie. Originalpräparat 600fach vergrößert

Tab. 9 Klassifikation der plazentaren Pathologie (Tab. aus Rogerson et al. 2007b, Klassifikation nach Ismail et al. 2000)

	Beschreibung
nicht-infiziert	kein Nachweis von Parasiten oder Malariapigment (Hämозoin)
aktiv-akut	Parasiten vorhanden, keine oder minimale Pigmentablagerung innerhalb von Fibrin
aktiv-chronisch	Parasiten vorhanden, reichliche Menge an Pigment innerhalb von Fibrin oder Zellen
durchgemacht	Pigment vorhanden, kein Nachweis von Parasiten

5.2.2 Plazentare Entzündungsreaktion

Die Infektion mit *P. falciparum* führt in der Plazenta zu einer Entzündungsreaktion, die die Balance zwischen Th-1- und Th-2-Immunantwort durcheinanderbringt. Zur adäquaten Bekämpfung der Infektion kommt es zu einer verstärkten Th-1 bzw. zellulären Reaktion mit Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Einwanderung von Immunzellen (Robinson und Klein 2012, Fievet et al. 2001).

Durch die Sequestration infizierter Erythrozyten im intervillösen Raum werden sowohl von Synzytiotrophoblasten als auch von lokalen mütterlichen Immunzellen Chemokine (z.B. macrophage-inflammatory protein 1 (MIP1), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) und interferon-gamma induced protein 10 (IP10)) sezerniert, die eine verstärkte Einwanderung von **Monozyten** bewirken (Abrams et al. 2003, Chaisavaneeyakorn et al. 2003, Lucchi et al. 2008, Suguitan et al. 2003a). Diese leisten mittels Phagozytose, Zytokinausschüttung und Antigenpräsentation an T-Zellen einen wichtigen Beitrag zur Eliminierung der Erreger (Chua et al. 2013). Auf der anderen Seite trägt eine übermäßige Monozyteninfiltration zur Pathogenese bei und korreliert in zahlreichen Studien mit negativen Folgen wie vermindertem Geburtsgewicht, Frühgeburt und mütterlicher Anämie (Muehlenbachs et al. 2010, Rogerson et al. 2003b, Rogerson et al. 2003a, Shulman et al. 2001, Menendez et al. 2000, Ordi et al. 2001).

Auch die Rolle von Natürlichen Killerzellen (**NK-Zellen**) bei der plazentaren Immunantwort wird kontrovers diskutiert. Bei der immunhistochemischen Untersuchung infizierter Plazenten beschreiben Ordi et al. ein vollständiges Fehlen von NK-Zellen im intervillösen Raum, was mitursächlich für eine verminderte Parasitenbekämpfung sein könnte (Ordi et al. 2001). Bei Orthoro et al. weisen Schwangere mit *P. falciparum*-Infektion signifikant niedrigere Level von INF γ -produzierenden NK-Zellen in der

Plazenta auf als aparasitämische Schwangere (Othoro et al. 2008). Die Zytotoxizität von NK-Zellen gegen infizierte Erythrozyten ist zudem bei den für Malaria besonders anfälligen Erstgebärenden geringer als bei Mehrgebärenden (Bouyou-Akotet et al. 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine höhere Anzahl INF γ -produzierender NK-Zellen vor Infektion schützt (Bouyou-Akotet et al. 2004, Othoro et al. 2008). Dagegen sind in einer anderen Studie NK-Zellen in infizierten Plazenten erhöht und mit niedriger HLA-G Produktion der Trophoblasten assoziiert, was zu einem negativen Schwangerschaftsausgang beitragen könnte (Sartelet et al. 2005).

Monozyten schütten zur Differenzierung und Aktivierung weiterer Immunzellen Zytokine aus. Folgende proinflammatorischen **Zytokine** können erhöht im peripheren und/oder plazentaren Blut infizierter Schwangerer gefunden werden: **TNF** (Agudelo et al. 2014, Chandrasiri et al. 2014a, Diouf et al. 2007, Fievet et al. 2001, Fried et al. 1998a, Kabyemela et al. 2008, Moore et al. 1999, Moormann et al. 1999, Rogerson et al. 2003c, Suguitan et al. 2003a), **IFN γ** (Agudelo et al. 2014, Bouyou-Akotet und Mavoungou 2009, Chandrasiri et al. 2014a, Diouf et al. 2007, Fievet et al. 2001, Fried et al. 1998a, Megnekou et al. 2015b, Moore et al. 1999, Suguitan et al. 2003a), **IL-1 β** (Fievet et al. 2001, Kabyemela et al. 2008, Megnekou et al. 2015b, Moormann et al. 1999), **IL-2** (Agudelo et al. 2014, Fried et al. 1998a) und **IL-6** (Chandrasiri et al. 2014a, Fievet et al. 2001). Daneben können auch antiinflammatorische Zytokine wie **IL-4** und **IL-10** erhöht nachgewiesen werden (Agudelo et al. 2014, Chandrasiri et al. 2014a, Chene et al. 2014, Fievet et al. 2001, Kabyemela et al. 2008, Moore et al. 1999, Suguitan et al. 2003a). In einigen Studien werden IL-2, -4, -6 und -10 sowie TGF β erniedrigt gemessen (Fievet et al. 2001, Fried et al. 1998a, Moormann et al. 1999).

Erhöhte Konzentrationen von TNF sind mit hoher plazentarer Parasitendichte und Schwangerschaftskomplikationen wie erniedrigtem Geburtsgewicht, intrauteriner Wachstumsretardierung, Frühgeburt und mütterlicher Anämie assoziiert (Fried et al. 1998a, Moormann et al. 1999, Rogerson et al. 2003c, Suguitan et al. 2003b). Bei Mäusen sind TNF und IFN γ in die Pathogenese des fetalen Tods involviert (Poovassery und Moore 2009, Poovassery et al. 2009). IFN γ wird in einer Studie mit erniedrigtem Geburtsgewicht in Zusammenhang gebracht (Fried et al. 1998a), in einer anderen kann dieser Zusammenhang nicht gefunden werden (Rogerson et al. 2003c) und in einer weiteren korreliert ein erniedrigter IFN γ Wert mit vermindertem Geburtsgewicht (Chene et al. 2014). IFN γ wird in anderen Studien bei nicht infizierten Mehrgebärenden erhöht gemessen und ist mit Abwesenheit von Infektion assoziiert,

sodass die Autoren ihm eine wichtige Rolle beim Schutz vor Infektion zuschreiben (Moore et al. 1999, Megnekou et al. 2015b). Auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wird mit unterschiedlichen Folgen in Verbindung gebracht. Bei Megnekou et al. werden erhöhte IL-10 Werte mit Parasitämie und erniedrigtem Geburtsgewicht, bei Suguitan et al. mit Frühgeburt assoziiert. Die Autoren gehen davon aus, dass IL-10 die adäquate Bekämpfung des Erregers behindert (Megnekou et al. 2015a, Suguitan et al. 2003b). Dagegen behaupten andere Autoren, dass hohe IL-10 Werte wichtig sind, um einer übermäßigen zellulären Entzündungsreaktion entgegenzuwirken und vor negativem Schwangerschaftsausgang zu schützen (Fievet et al. 2001, Fried et al. 1998a). Da IL-10 bei plazentarer Infektion auch im peripheren Blut stark erhöht ist und eine relativ hohe Sensitivität und Spezifität aufweist, wird es als Biomarker zur Diagnose von Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft diskutiert (Chene et al. 2014, Kabyemela et al. 2008). Weiterhin können erhöhte Level von IL-6 und -8 mit hoher Parasitendichte und Anämie, von IL-8 mit intrauteriner Wachstumsretardierung und von IL-7 mit Abwesenheit von Infektion assoziiert werden (Chandrasiri et al. 2014a, Megnekou et al. 2015b, Moormann et al. 1999). Erniedrigte Werte von IL-5 gehen mit vermindertem Geburtsgewicht einher (Chene et al. 2014). Tab. 10 fasst die wichtigsten mit erhöhten Zytokinen verbundenen Assoziationen zusammen.

Bei Infektion mit *P. falciparum* liegen die Werte der Schwangerschaftshormone Östrogen und Progesteron, von Prolaktin und Cortisol verändert vor (Bayoumi et al. 2009, Bouyou-Akotet et al. 2005, Watkinson et al. 1985, Megnekou et al. 2015b). Östrogen (Estradiol, E2) wird bei Malaria in einer Studie im peripheren Blut im dritten Trimenon vermindert gemessen (Watkinson et al. 1985), während es in der Plazenta in einer Studie von Megnekou et al. erhöht vorkommt (Megnekou et al. 2015b). Niedrige Werte von Östrogen werden in letzterer Studie vor allem bei Mehrgebärenden gefunden und sind mit Abwesenheit von Infektion assoziiert. Das schwangerschaftserhaltende Progesteron korreliert positiv mit mütterlichem Hb sowie kindlichem Geburtsgewicht und ist bei Malariainfektion erniedrigt (Megnekou et al. 2015b). Prolaktin wird bei infizierten Schwangeren entweder unverändert oder erniedrigt gemessen (Bayoumi et al. 2009, Bouyou-Akotet et al. 2005). Die Konzentration von Glucocorticoiden wie Kortisol ist deutlich erhöht und mit hoher Parasitenlast assoziiert (Bayoumi et al. 2009, Bouyou-Akotet et al. 2005). Kortisol korreliert zudem mit einer niedrigen Anzahl an NK-Zellen und hemmt ihre Zytotoxizität (Bouyou-Akotet et al. 2004, Mavoungou et al. 2005).

Tab. 10 Assoziationen von Zytokinen mit klinischen Parametern

Zytokin	Assoziation bei erhöhten Werten	Autor, Jahr
TNF	<ul style="list-style-type: none"> - assoziiert mit hoher Parasitendichte und Monozyteninfiltration - assoziiert mit erniedrigtem Geburtsgewicht - assoziiert mit Frühgeburt - assoziiert mit intrauteriner Wachstumsretardierung - assoziiert mit mütterlicher Anämie - assoziiert mit fetalem Tod bei Mäusen 	Rogerson et al. 2003c Fried et al. 1998a, Rogerson et al. 2003c Suguitan et al. 2003b Moorman et al. 1999 Fried et al. 1998 Poovassery et al. 2009
IFNγ	<ul style="list-style-type: none"> - assoziiert mit erniedrigtem Geburtsgewicht - assoziiert mit fetalem Tod bei Mäusen + nicht assoziiert mit erniedrigtem Geburtsgewicht + korreliert negativ mit erniedrigtem Geburtsgewicht + assoziiert mit Abwesenheit der Infektion 	Fried et al. 1998 Poovassery et al. 2009 Rogerson et al. 2003c Chene et al. 2014 Megnekou et al. 2015b, Moore et al. 1999
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> - assoziiert mit Parasitämie und erniedrigtem Geburtsgewicht - assoziiert mit Frühgeburt + wichtig für Kontrolle der Inflammation 	Megnekou et al. 2015a Suguitan et al. 2003b Fievet et al. 2001, Fried et al. 1998
IL-8	<ul style="list-style-type: none"> - assoziiert mit hoher Parasitendichte und niedrigem Hb - assoziiert mit intrauteriner Wachstumsretardierung 	Chandrasiri et al. 2014 Moorman et al. 1999
IL-7	<ul style="list-style-type: none"> + assoziiert mit Abwesenheit der Infektion 	Megnekou et al. 2015b
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> - assoziiert mit hoher Parasitendichte und niedrigem Hb 	Chandrasiri et al. 2014
IL-5	<ul style="list-style-type: none"> + korreliert negativ mit erniedrigtem Geburtsgewicht 	Chene et al. 2014

Neben der zellulären Immunantwort spielt die humorale Immunreaktion mit Bildung von Antikörpern gegen VAR2CSA eine entscheidende Rolle zur Bekämpfung der Infektion. Dies wird in Kapitel 5.3 ausführlich erklärt.

5.2.3 Pathogenese des erniedrigten Geburtsgewichts

Durch die Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta werden verschiedene pathogenetische Mechanismen in Gang gesetzt, die zu Plazentainsuffizienz und intrauteriner Wachstumsretardierung führen können (Rogerson et al. 2007b).

Gestörte Angiogenese und Plazentaentwicklung

Doppler-Sonographie-Untersuchungen infizierter Schwangerer (32.-35. SSW) zeigen einen abnormen uteroplazentaren Blutfluss, der im Zusammenhang mit Frühgeburt, erniedrigtem Geburtsgewicht und perinatalem Tod steht (Dorman et al. 2002). Die zugrundeliegenden pathogenetischen Vorgänge sind komplex und nicht vollständig

verstanden. Wachstum und Vaskularisierung der Plazenta werden von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie IGF und Angiogenesefaktoren wie Angiopoetin (ANG-1/-2), VEGF und seinem löslichen Rezeptor (sVEGFR1) reguliert (Umbers et al. 2011a). Veränderte Werte können die Entwicklung der Plazenta und des Fetus stark beeinträchtigen. Bei infizierten Mäusen finden Silver et al. erniedrigte Werte von ANG-1, ein erhöhtes ANG-2/ANG-1 Verhältnis und Wachstumsstörungen des Fetus. Eine Dysregulation von Angiopoetin kann auch bei exponierten erstgebärenden Frauen nachgewiesen werden und ist hier mit erniedrigtem Geburtsgewicht assoziiert (Silver et al. 2010). Verminderte Werte von ANG-1 werden auch bei infizierten Schwangeren in Gebieten mit niedriger Malariatransmission mit verschiedenen histopathologischen Veränderungen der Plazenta in Verbindung gebracht (Ataide et al. 2015). Die Aktivierung des Komplementsystems, insbesondere des Faktors C5, scheint maßgeblich an der Pathogenese einer gestörten Angiogenese beteiligt zu sein. Bei Mäusen führt aktiviertes C5 (C5a) zu einer verstärkten Ausschüttung von sVEGFR-1 aus Monozyten, das VEGF bindet und unwirksam macht. So fehlen wichtige Wachstumsstimuli für plazentare Gefäße, als Folge können Abstoßung und fetale Wachstumsretardierung beobachtet werden (Girardi 2008, Girardi et al. 2006). In Fall-Kontroll-Studien schwangerer Frauen aus Kenia und Malawi liegt C5a bei plazentarer Malariainfektion signifikant erhöht vor (Conroy et al. 2009, Conroy et al. 2013). Erhöhte Werte von C5a sind wiederum mit veränderten Angiogeneseparametern und mit für das Gestationsalter zu kleinen Babys assoziiert (Conroy et al. 2013). Umbers et al. zeigen, dass die Level von IGF-1, einem essenziellen Wachstumsfaktor, bei infizierten Schwangeren verglichen mit nicht-infizierten deutlich reduziert sind. Verminderte IGF-1 Werte korrelieren zudem mit erniedrigtem Geburtsgewicht (Umbers et al. 2011b).

Malariainfektion und Präeklampsie bzw. schwangerschaftsassozierte Hypertonie weisen einige Gemeinsamkeiten auf (überprüft in Brabin und Johnson 2005). Beispielsweise besteht bei beiden Krankheitsbildern eine verminderte plazentare Perfusion (Dorman et al. 2002, Roberts und Lain 2002). Biomarker für Präeklampsie, wie sVEGFR1 und lösliches Endoglin, können auch bei plazentarer *P. falciparum*-Infektion erhöht gemessen werden (Gueneuc et al. 2017, Muehlenbachs et al. 2006, Silver et al. 2011). Muehlenbachs et al. finden bei jungen erstgebärenden Frauen mit chronischer Malariainfektion ein erhöhtes Risiko für Hypertension (Muehlenbachs et al. 2006). Auch in einer hypoendemischen Region im Senegal kann ein Zusammenhang zwischen plazentarer Infektion und Schwangerschaftshypertonie

nachgewiesen werden (Ndao et al. 2009). Malaria in der Schwangerschaft scheint durch plazentare Entzündungsprozesse mit verstärkter Zytokinausschüttung an der Entstehung von Präeklampsie mitzuwirken (Muehlenbachs et al. 2006, Ndao et al. 2009, Silver et al. 2011). Präeklampsie ist wiederum ein Risikofaktor für fetale Wachstumsretardierung (Xiao et al. 2003).

Plazentare Hypoxie wird als weitere Ursache für erniedrigtes Geburtsgewicht diskutiert. Histopathologische Untersuchungen infizierter Plazenten zeigen zahlreiche akkumulierte Immunzellen und Fibrinablagerungen, die zu einer Einengung des intervillösen Raumes und zu einem gestörten plazentaren Blutfluss führen könnten (Ordi et al. 1998, Imamura et al. 2002, Walter et al. 1982). Eingewanderte Makrophagen exprimieren Tissue Factor, einen Initiationsfaktor der Koagulation, der mit Ablagerung von Fibrin assoziiert ist (Imamura et al. 2002). Die Verdickung der Basalmembran wurde in früheren Studien als Hauptgrund fetaler Entwicklungsstörungen durch verminderten materno-fetalen Stoffaustausch gesehen (Galbraith et al. 1980, Walter et al. 1982), kann aber von Ismail et al. nur fokal bei schwerer, chronischer Infektion nachgewiesen werden und scheint eher eine geringe Rolle zu spielen (Ismail et al. 2000). In einer neueren Studie von Boef et al. kann zudem kein Zusammenhang zwischen typischen Hypoxiemarkern und plazentarer Malariainfektion gefunden werden (Boeuf et al. 2008).

Mütterliche Anämie kann in einigen Studien mit fetaler Hypoxämie, niedrigem Geburtsgewicht, Frühgeburt und erhöhter perinataler Sterblichkeit assoziiert werden (Adam et al. 2011, Uneke 2008a, Kidanto et al. 2009). Andere Studien können keine signifikanten Zusammenhänge belegen (Achidi et al. 2005, Koura et al. 2012).

Nährstofftransport

Mehrere Studien unterstützen die These, dass bei Malariainfektion die Dysregulation plazentarer Nährstofftransporter zur fetalen Wachstumsretardierung beiträgt:

Der System A Transporter, einer der wichtigsten Aminosäuretransporter in der Plazenta, ist bei Malariainfektion herabreguliert (Boeuf et al. 2013, Dimasuay et al. 2017). Eine verminderte Funktion dieses Transporters wird in mehreren Studien mit fetalen Wachstumsstörungen assoziiert (Jansson et al. 2006, Glazier et al. 1997, Jansson et al. 2002). Besonders deutlich reduziert ist die Aktivität bei plazentarer Inflammation mit Monozyteninfiltrat (Boeuf et al. 2013). Daten von Dimasuay et al. weisen stark darauf hin, dass Entzündungsmediatoren essentielle

Signaltransduktionswege hemmen (Dimasuy et al. 2017). *In vitro*-Studien zeigen, dass proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und TNF, zu einer Dysregulation des System A Transporters führen (Thongsong et al. 2005, Jones et al. 2009). Diese liegen, wie im vorherigen Kapitel dargestellt, bei Malariainfektion erhöht vor und sind mit erniedrigtem Geburtsgewicht assoziiert. Zudem werden Wachstumshormone, wie IGF-1, die die plazentare Aminosäureaufnahme stimulieren, bei *P. falciparum*-Infektion vermindert gemessen (Umbers et al. 2011b, Karl 1995).

In infizierten Plazenten ist auch die Expression von GLUT-1, einem für die basale Glucoseversorgung wichtigen Transporter, herabreguliert (Chandrasiri et al. 2014b, Alberts et al. 2011). Die GLUT-1-Expression an der Basalmembran zeigt bei Chandrasiri et al. eine positive Korrelation mit dem Geburtsgewicht und eine stark negative mit der Dichte des Monozyteninfiltrats. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Entzündungsreaktion im intervillösen Raum über einen gestörten transplazentaren Glucosetransport zur fetalen Wachstumsretardierung beiträgt (Chandrasiri et al. 2014b). Allgemein werden erhöhte TNF-Werte, erniedrigte IGF-1-Werte und plazentare Hypoxie mit Dysregulation des Glucosetransports in Verbindung gebracht (Gordon et al. 1995, Hotamisligil et al. 1994, Zamudio et al. 2006).

Abb. 14 (S. 62) veranschaulicht die pathogenetischen Vorgänge zur Entstehung des erniedrigten Geburtsgewichts.

5.2.4 Pathogenese der mütterlichen Anämie

Die Entstehung der Malariaanämie ist im Allgemeinen, auch bei nicht Schwangeren, multifaktoriell bedingt und beinhaltet (I) die Hämolyse oder Phagozytose infizierter sowie nicht-infizierter Erythrozyten, (II) die Dyserythropoese durch Hämozoinablagerungen im Knochenmark und (III) die Suppression der Erythropoese infolge einer chronischen Entzündungsreaktion (vgl. Abb. 14, S. 62) (Perkins et al. 2011).

Die Eliminierung nicht-infizierter Erythrozyten wird beinahe auf ein Zehnfaches der infizierten geschätzt und spielt somit eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Anämieentwicklung (Jakeman et al. 1999). Warum neben infizierten mehrheitlich nicht-infizierte Zellen zerstört werden, wird diskutiert. Zum einen trägt der Hypersplenismus und die verstärkte Aktivierung von Makrophagen allgemein zu einer vermehrten Phagozytose und Zellyse bei (Mohan et al. 1995, Ekvall 2003, Biemba et al. 1998, Schofield und Grau 2005). Zudem weisen auch nicht-infizierte Erythrozyten eine

verminderte Deformierbarkeit auf und werden so in der Milz abgebaut (Dondorp et al. 1999, Dondorp et al. 1997). Schließlich kann die Ablagerung von Immunkomplexen und Komplementfaktoren an nicht-infizierte Erythrozyten eine rezeptorvermittelte Phagozytose durch Makrophagen bewirken (Waitumbi et al. 2000, Odhiambo et al. 2008, Kai und Roberts 2008).

Weiterhin kann sich das Malariapigment Hämozoin im Knochenmark anreichern und dort zu einer gestörten Entwicklung der Erythrozyten aus ihren Vorläuferzellen (Dyserythropoese) führen. In *in vitro*-Studien stimuliert Hämozoin direkt die Apoptose von erythroiden Vorläuferzellen (Awandare et al. 2011, Casals-Pascual et al. 2006, Lamikanra et al. 2009). *In vivo* ist die Plasmahämozoinkonzentration mit Anämie und Suppression der Retikulozyten assoziiert. Die Anzahl pigmentierter Vorläuferzellen korreliert in histologischen Knochenmarksuntersuchungen mit dem Grad der abnormen Erythrozytenentwicklung (Casals-Pascual et al. 2006). Awandare et al. zufolge beeinträchtigt Hämozoin die Erythropoese auch indirekt, durch Entzündungsmediatoren wie TNF und Stickstoffmonoxid (NO) aus aktivierten mononukleären Zellen (Awandare et al. 2011). In *in vitro*-Experimenten wird die NO-Synthese in Monozyten durch Hämozoin stimuliert. Erhöhte NO-Werte sind bei Kindern mit Malariaanämie wiederum mit erniedrigtem Hb assoziiert (Keller et al. 2004). Dagegen scheinen Makrophagen durch Phagozytose von Hämozoin in einer anderen Studie das Knochenmark eher vor seiner toxischen Wirkung zu schützen (Lamikanra et al. 2009).

Ein weiterer Aspekt bei der Entwicklung der Malariaanämie ist die Suppression der Erythropoese im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Perkins et al. tragen Studien zusammen, die zeigen, dass Malariaanämie hauptsächlich durch eine Dysregulation von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Effektormolekülen bedingt ist (Perkins et al. 2011). Erhöhte Werte von TNF, IL-6 und IL-8 sowie erniedrigte IL-10:TNF oder TGF- β 1:TNF Relationen sind beispielsweise mit Anämie assoziiert (Kurtzhals et al. 1998, Lyke et al. 2004, Perkins et al. 2000, Othoro et al. 1999, Fried et al. 1998a, Chandrasiri et al. 2014a).

Proinflammatorische Zytokine führen zudem zu einer Hypoferrämie mit verminderter Hämopoese, einem Hauptmechanismus der sog. Entzündungsanämie (Ludwiczek et al. 2003, Nweneka et al. 2010). IL-6 stimuliert die Synthese des eisenregulatorischen Peptids Hepcidin in der Leber, das die intestinale Eisenresorption und die Abgabe von Eisen aus Hepatozyten und retikuloendothelialen Zellen hemmt (Ganz und Nemeth

2012, Nemeth et al. 2004). In einer experimentellen Studie über *P. falciparum*-Infektion von fünf freiwillig teilnehmenden Erwachsenen werden leicht erhöhte Werte von IL-6 und Heparin im Serum gemessen. Trotz der nur geringfügig veränderten Werte wird eine deutliche Hypoferrämie mit stark verminderter Hämoglobinkonzentration in den Retikulozyten nachgewiesen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die inflammationsbedingte Störung der Eisenhämostase die Entstehung der Malariaanämie begünstigt (de Mast et al. 2009).

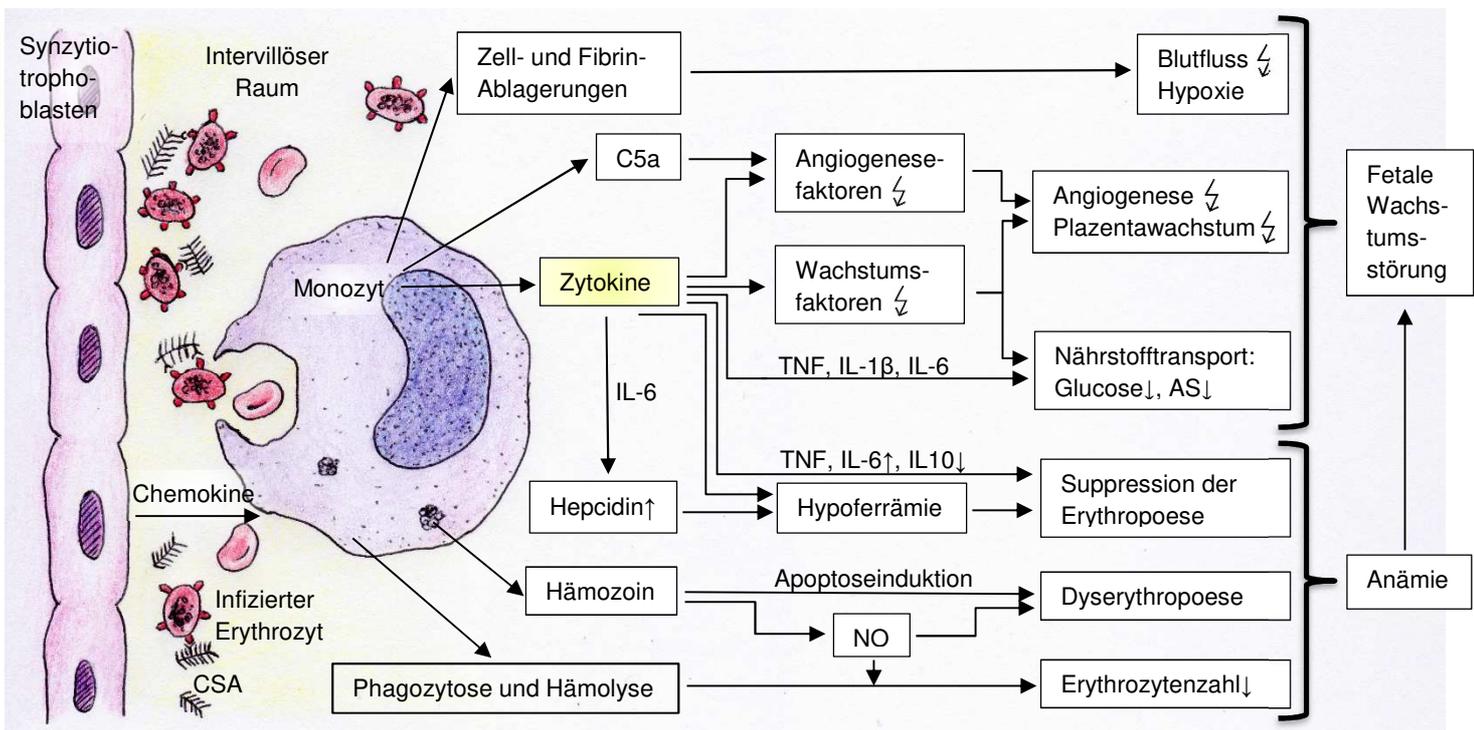


Abb. 14 Mögliche pathogenetische Vorgänge, die zur Entstehung des erniedrigten Geburtsgewichts und der mütterlichen Anämie beitragen

Infolge der Sequestration infizierter Erythrozyten im intervillösen Raum der Plazenta kommt es zur Aktivierung von Synzytiotrophoblasten und lokalen Monozyten. Diese schütten Chemokine und Zytokine aus, die weitere Immunzellen anlocken und durch eine plazentare Inflamationsreaktion die Pathogenese der fetalen Wachstumsretardierung und der mütterlichen Anämie begünstigen. Zell- und Fibrinablagerungen können den plazentaren Blutfluss stören und zur Hypoxie führen. Zytokine und aktivierte Komplementfaktoren (C5a) verändern die Konzentration von Angiogenese- und Wachstumsfaktoren, sodass Vaskularisierung und Plazentawachstum beeinträchtigt sind. Zytokine und verringerte Wachstumsfaktoren haben zudem Auswirkungen auf plazentare Nährstofftransporter, mit vermindertem Aminosäure- und Glucosetransport als Folge. Weiterhin kann die mütterliche Anämie die fetale Entwicklung beeinträchtigen. Diese entsteht durch einen vermehrten Erythrozytenabbau und eine verminderte Erythrozytenneubildung. Die supprimierte Erythropoese wird im Rahmen einer Entzündungsanämie entweder direkt über Zytokine oder indirekt über ein erhöhtes hepatisches Heparin und erniedrigte Eisenwerte hervorgerufen. Die Dyserythropoese ist Folge von Hämoglobinablagerungen im Knochenmark, die direkt über Apoptoseinduktion oder indirekt über Entzündungsmediatoren wie NO die Blutbildung stören.

↘: gestört, ↑: erhöht, ↓: erniedrigt, C5a: aktivierter Komplementfaktor 5, NO: Stickstoffmonoxid, TNF: Tumornekrosefaktor, IL: Interleukine, CSA: Chondroitinsulfat A

Box 5

Aktueller Forschungsstand

Pathogenese und Folgen der plazentaren Inflammation

1. Histologisch können aktive, chronische und durchgemachte Infektionen unterschieden werden (Rogerson et al. 2007b).
2. Monozyten und NK-Zellen können einerseits mit Protektion, andererseits mit Pathogenese in Verbindung gebracht werden (Chua et al. 2013, Ordi et al. 2001, Sartelet et al. 2005).
3. TNF ist bei Malaria erhöht und mit negativen Folgen assoziiert (Rogerson et al. 2003c)
4. IFN γ und IL-10 werden mit unterschiedlichen Folgen (positiven und negativen) assoziiert (Fried et al. 1998, Megnekou et al. 2005a/b).
5. Veränderungen der Hormonspiegel, vor allem erniedrigtes Progesteron und erhöhtes Cortisol, tragen zur Pathogenese bei (Megnekou et al. 2015b, Bouyou-Akotet et al. 2005).
6. Erniedrigtes Geburtsgewicht ist bedingt durch ein gestörtes Plazentawachstum und einen verminderten Stoffaustausch infolge der plazentaren Inflammation (Umbers et al. 2011).
7. Mütterliche Anämie entsteht durch einen erhöhten Erythrozytenabbau in Kombination mit einer verminderten bzw. gestörten Erythrozytenneubildung (Perkins et al. 2011).

Weiterer Forschungsbedarf

1. Biomarker für Diagnostik (z.B. IL-10, VEGFR1, C5a)
2. Rolle der Präeklampsie und Hypoxie bei malariaassoziiertem erniedrigtem Geburtsgewicht
3. Funktion anderer plazentarer Transportsysteme (AS, Glucose, Lipide, Vitamine) bei Malaria

5.3 Entwicklung einer natürlichen Immunität gegen Malaria in der Schwangerschaft

5.3.1 Korrelation von Parität mit Parasitämie und klinischen Parametern

Dass schwangere Frauen anfälliger für Infektion mit *P. falciparum* sind, ist gut belegt (Brabin 1983). Diese Anfälligkeit ist abhängig von der Anzahl vorheriger Schwangerschaften, mit einer stark negativen Korrelation zwischen Parität und Parasitämie. Zahlreiche Studien aus unterschiedlichen afrikanischen Ländern zeigen, dass in Regionen mit stabiler Malariatransmission die Prävalenz von peripheren und/oder plazentaren Infektionen bei Erstgebärenden signifikant höher ist als bei Mehrgebärenden (Fried et al. 1998b, Mokuolu et al. 2009, Newman et al. 2003, Tako et al. 2005, Adebami et al. 2007, Basse et al. 2015, Bouyou-Akotet et al. 2003, Okoko et al. 2002, Rogerson et al. 2000b, Shulman et al. 2001) (vgl. Tab. 11, S. 65). Diese Ergebnisse stimmen mit denen älterer Studien überein (Brabin 1983, McGregor 1984). Erstgebärende, die mit *P. falciparum* infiziert sind, zeigen zudem eine signifikant höhere Dichte an Parasiten im peripheren und/oder plazentaren Blutausschlag (Agan et al. 2010, Bouyou-Akotet et al. 2003, Duffy und Fried 2003, Kasumba et al. 2000,

Mokuolu et al. 2009). Bei der Interpretation der Daten muss berücksichtigt werden, dass Erstgebärende bei den meisten Studien deutlich jünger sind als Mehrgebärende und dass niedriges Alter unabhängig von der Parität ein Risikofaktor für Malariainfektion darstellt (Orish et al. 2012, Bouyou-Akotet et al. 2003, Rogerson et al. 2000b, Tako et al. 2005). Bei Rogerson et al. liegt nach Stratifikation des Alters beispielweise keine paritätsabhängige Prävalenzverteilung mehr vor (Rogerson et al. 2000b). In zwei weiteren Studien sind dagegen sowohl junges Alter als auch die erste Schwangerschaft unabhängige Risikofaktoren für erhöhte Parasitämie (Okoko et al. 2002, Tako et al. 2005). Allgemein gesehen haben junge Frauen in der Erstschwangerschaft das größte Infektionsrisiko. Die mit steigender Parität abnehmende Prävalenz lässt vermuten, dass Frauen in Endemiegebieten eine Immunität gegen schwangerschaftstypische *P. falciparum*-Erreger entwickeln (Fried et al. 1998b).

In einigen Studien werden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Paritäten festgestellt (Ofori et al. 2009, Sule-Odu et al. 2002, Kasumba et al. 2000, Newman et al. 2003, Valente et al. 2011) (vgl. Tab. 11, S. 65). Die meisten dieser Studien wurden in Regionen mit niedrigen bis moderaten Malariatransmissionsraten durchgeführt. Da Erstschwangere hier seltener infiziert werden, bilden sie weniger schützende Antikörper und die Anfälligkeit in weiteren Schwangerschaften bleibt konstant (Kasumba et al. 2000, Newman et al. 2003, Valente et al. 2011).

In einigen Studien kann gezeigt werden, dass infizierte Erstschwangere häufiger Kinder mit deutlich erniedrigtem Geburtsgewicht zur Welt bringen (Kalanda et al. 2005, Newman et al. 2003, Okoko et al. 2002, Tako et al. 2005). Allerdings ist die Erstgeburt auch unabhängig von Malariainfektion oft mit geringerem Gewicht assoziiert (Kasumba et al. 2000, Mokuolu et al. 2009, Ofori et al. 2009). Das Risiko für Frühgeburt und mütterliche Anämie ist bei Infektion meist in allen Schwangerschaften erhöht (Agan et al. 2010, Okoko et al. 2002, Shulman et al. 2001, Tako et al. 2005). Da hohe Parasitämie aber ein eindeutiger Risikofaktor für Komplikationen ist und vor allem bei Erstgebärenden vorkommt, kann man folgern, dass diese Gruppe besonders betroffen ist (Ofori et al. 2009, Okoko et al. 2002, Bassey et al. 2015).

Tab. 11 Prävalenzen von peripherer und plazentarer Parasitämie bei Erstgebärenden im Vergleich zu Mehrgebärenden in verschiedenen afrikanischen Ländern zum Zeitpunkt der Geburt

Autor, Jahr	Land	Anzahl n (gesamt/infiziert)	Signifikant erhöhte Prävalenz bei Erstgebärenden im Vergleich zu Mehrgebärenden			
			Peripher	p-Wert	Plazentar	p-Wert
<i>Stabile Malariaregionen:</i>						
Fried et al. 1998	Kenia	916/208	ja	$p < 0,001$	ja	$p < 0,001$
Rogerson et al. 2000	Malawi	4.764/2.034 ¹	ja	$p < 0,001$	k.A.	
Shulman et al. 2001	Kenia	910/416	erhöht ²		erhöht ²	
Sule-Odu et al. 2002	Nigeria	564/140	nein	$p = 1,574$	k.A.	
Bouyou et al. 2003	Gabun	311/177 ¹	ja	$p < 0,001$	k.A.	
Newman et al. 2003	Äthiopien	185/ 13 bzw. 12	ja	$p = 0,02$	ja	$p = 0,006$
Okoko et al. 2003	Gambia	313/160	k.A.		ja	$p = 0,01$
Tako et al. 2005	Kamerun	1.898 /405	ja	$p < 0,001$	ja	$p < 0,001$
Adebami et al. 2007	Nigeria	304/101	k. A.		ja	$p < 0,001$
Mokuolu et al. 2009	Nigeria	1875/405	ja	$p = 0,001$	ja	$p = 0,002$
Ofori et al. 2009	Ghana	294/ 58 bzw. 61	nein	$p = 0,09$	ja	$p = 0,006$
Bassey et al. 2015	Nigeria	210/ 122 bzw. 137	erhöht ²		ja	$p < 0,001$
Ndam et al. 2015	Benin	710/70	k.A.		ja	$p = 0,025$
<i>Instabile Malariaregionen:</i>						
Kasumba et al. 2000	Uganda	573/46 bzw. 36	nein ²		ja	$p < 0,05$
Newman et al. 2003	Äthiopien	833/19 bzw. 21	nein ²		nein ²	
Valente et al. 2011	Angola	654/49 bzw. 99	nein ²		nein ²	

¹untersucht bei der ersten Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchung, ²p-Wert wurde nicht berechnet, k.A.: keine Angaben

Allgemein wird der Vergleich der Studien durch die Diversität der Teilnehmerinnen (Alter, Parität, Inanspruchnahme von Präventionsmöglichkeiten, Ernährung, HIV-Koinfektion), durch unterschiedliche Studiengrößen und Regionen mit verschiedenen Transmissionsraten erschwert.

5.3.2 Korrelation von natürlichen Antikörpern mit Parität, parasitologischen und klinischen Parametern

Wie bereits in vorhergehenden Kapiteln (5.1.1, 5.1.3, 5.1.4) dargestellt, ist CSA der Hauptligand für infizierte Erythrozyten in der Plazenta. Durch Kontakt mit CSA-bindenden Parasitenstämmen entwickeln Frauen während der Schwangerschaft Antikörper gegen diese, was die verminderte Infektionsrate bei Mehrgebärenden erklärt. Fried et al. stellten bereits 1998 fest, dass Seren von Mehrgebärenden aus einer stabilen Malariaregion in Kenia die Bindung von *P. falciparum* an CSA *in vitro*

größtenteils hemmen (Fried et al. 1998b). In darauffolgenden Studien wurden die Antikörper gegen CSA-selektive Parasitenstämme genau untersucht (vgl. auch Tab. 12): Sie...

- sind geschlechts- und schwangerschaftsspezifisch: Antikörpertiter sind deutlich höher bei infizierten schwangeren Frauen als bei Männern oder Nicht-Schwangeren (Beeson et al. 2004, Ricke et al. 2000, Staalsoe et al. 2001).
- sind vom Subtyp IgG1 und IgG3 (Elliott et al. 2005, Megnekou et al. 2005).
- korrelieren positiv mit dem Endemiegrad: in Kamerun weisen Frauen in den Hochendemiegebieten Ebolowa und Etoa deutlich höhere Titer auf als in dem Niedrigendemiegebiet Yaounde (Megnekou et al. 2005, Staalsoe et al. 2001).
- korrelieren positiv mit der Schwangerschaftszahl: Erstgebärende haben deutlich niedrigere Antikörperlevel als Mehrgebärende (Maubert et al. 1999, Megnekou et al. 2005, O'Neil-Dunne et al. 2001, Ricke et al. 2000, Staalsoe et al. 2001, Duffy und Fried 2003, Staalsoe et al. 2004). Allerdings sind die Unterschiede zum Zeitpunkt der Geburt in einigen Studien nicht mehr signifikant (Beeson et al. 2004, Elliott et al. 2005, O'Neil-Dunne et al. 2001).
- korrelieren mit der Hemmung der CSA-Bindung in *in vitro*-Studien (Beeson et al. 2004, Elliott et al. 2005, Maubert et al. 1999, Ricke et al. 2000, Staalsoe et al. 2001, Duffy und Fried 2003).
- korrelieren negativ mit plazentarer Parasitämie: hohe Antikörperlevel scheinen vor plazentarem Befall zu schützen (Duffy und Fried 2003, Taylor et al. 2004, O'Neil-Dunne et al. 2001, Staalsoe et al. 2001). Dennoch können trotz hoher Titer plazentare Infektionen persistieren (Beeson et al. 2004, Staalsoe et al. 2004).
- korrelieren mit klinischen Parametern: einige Studien zeigen, dass höhere Antikörperlevel zu signifikant höherem Geburtsgewicht, weniger Frühgeburten und erhöhten mütterlichen Hb-Werten führen (Duffy und Fried 2003, Feng et al. 2009, Salanti et al. 2004, Staalsoe et al. 2004). Beeson et al. können dies nicht bestätigen, eventuell weil sie eine recht kleine Anzahl an Frauen mit akuter Infektion untersuchen (Beeson et al. 2004). Bei einer größeren Studie von Staalsoe et al. sind signifikante Unterschiede nur bei chronischen Infektionen zu finden, da hier genügend Zeit zum Entwickeln von klinischen Folgen besteht (Staalsoe et al. 2004).

Tabelle 12 fasst die wichtigsten Korrelationen zusammen.

Tab. 12 Korrelation von Antikörpern gegen CSA-selektive *P. falciparum*-Stämme mit Parität, Hemmung der CSA-Bindung, verminderter plazentarer Parasitämie und klinischen Parametern

Autor, Jahr	Land	Anzahl n (ges./inf.)	Korrelation von Antikörpern gegen CSA-selektive <i>P. falciparum</i> -Stämme mit...		
			Parität (>1 vs. 1. Gravida)	Hemmung der CSA-Bindung	plazentarer Parasitämie↓
Maulbert et al. 1999	Kamerun	664/156	ja (6. Monat)	ja	k.A.
Ricke et al. 2000	Ghana	163/k.A.	ja ¹	ja ²	k.A.
O'Neil Dunne et al. 2001	Kamerun	198/97	ja (12.-20.SSW) nein (bei Geburt)	k.A.	ja
Stalsoe et al. 2001	Kamerun	227/k.A.	ja ¹	ja	ja ³
Duffy und Fried 2003	Kenia	168/k.A.	ja (bei Geburt)	ja	ja
Beeson et al. 2004	Malawi	119/51	nein (bei Geburt)	ja	nein
Stalsoe et al. 2004	Kenia	477/290	ja (bei Geburt)	k.A.	nein
Taylor et al. 2004	Kamerun	182/117	k.A.	k.A.	ja
Elliott et al. 2005	Malawi	66/33	nein (bei Geburt)	ja	k.A.
Megnekou et al. 2005	Kamerun	283/46	ja ¹	k.A.	k.A.
			Geburtsgewicht	Frühgeburten↓	Mütterlichem Hb-Wert
Duffy und Fried 2003	Kenia	168/k.A.	ja ⁴	ja ⁴	nein
Beeson et al. 2004	Malawi	43/43	nein	k.A.	nein
Salanti et al. 2004	Ghana	110/110	ja	k.A.	k.A.
Stalsoe et al. 2004	Kenia	477/290	ja ⁵	k.A.	ja ⁵
Feng et al. 2009	Malawi	141/k.A.	nein	k.A.	ja

¹Proben von Frauen unterschiedlichen Gravidationsalters

²untersucht wurden zehn Seren mit den höchsten und zehn mit den niedrigsten Antikörpertitern

³nur bei Mehrgebärenden, nicht bei Erstgebärenden

⁴gemessen bei 68 Zweitgebärenden mit hohen und niedrigen Antikörpertitern

⁵bei chronischer plazentarer Infektion

k.A.: keine Angaben, ges.: gesamt, inf.: infiziert (peripher und/oder plazentar), ↓: vermindert

In einigen Längsschnittstudien wurde der zeitliche Verlauf der Antikörperbildung untersucht. In der ersten Schwangerschaft werden IgG-Antikörper bei Infektion mit CSA-selektiven Parasiten etwa ab der 20. SSW produziert, steigen bis zur Geburt stetig an und fallen danach ab. In weiteren Schwangerschaften werden sie bei Infektion bereits ab der 12. Woche, in wesentlich höheren Konzentrationen, gebildet (Maulbert et al. 1999, O'Neil-Dunne et al. 2001, Stalsoe et al. 2001, Ampomah et al. 2014b). Dieser Verlauf spricht für den Erwerb eines immunologischen Gedächtnisses, das selbst bei Verschwinden der Antigene oder infrequenter Antigenexposition viele Jahre später bei Reinfektion eine effektive Immunantwort hervorrufen kann. Memory-B-Zellen gegen plazentare Parasiten können noch 20 Jahre nach der letzten Schwangerschaft nachgewiesen werden. Die Anzahl der Memory-B-Zellen bleibt

unabhängig von der Parität gleich, was darauf hindeutet, dass eine einzige Schwangerschaft ausreicht, um ein effektives immunologisches Langzeitgedächtnis hervorzurufen (Ampomah et al. 2014a).

Seren von Frauen aus Afrika, Asien und Ozeanien können zudem die Bindung von plazentaren Parasiten unterschiedlicher geographischer Regionen hemmen. Daraus lässt sich ableiten, dass die natürlichen Antikörper kreuzreaktiv gegen verschiedene Stämme wirksam sind (Fried et al. 1998b, Ricke et al. 2000, Hommel et al. 2010). Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob diese Kreuzreaktivität durch strikt konservierte Epitope oder durch polymorphe Struktur motive, die zwischen weltweiten Stämmen geteilt werden, hervorgerufen wird (Dahlback et al. 2006, Hommel et al. 2010). Es wird angenommen, dass kreuzreaktive Antikörper sowohl konservierte, als auch geteilte polymorphe Regionen von VAR2CSA erkennen (Andersen et al. 2008, Avril et al. 2008, Barfod et al. 2007, Dahlback et al. 2006).

Die schnelle Entwicklung einer Immunantwort mit stammesübergreifenden Antikörpern lässt hoffen, dass die Herstellung eines effektiven Impfstoffes möglich ist.

5.3.3 Analyse der natürlichen Antikörper gegen VAR2CSA

Wie bereits in vorhergehenden Kapiteln (5.1.2, 5.1.3, 5.1.4) dargestellt, ist VAR2CSA der Hauptligand für CSA. Antikörper gegen CSA-selektive Parasitenstämme sind somit vor allem gegen VAR2CSA gerichtet. Im Hinblick auf die Entwicklung eines auf VAR2CSA basierenden Impfstoffes ist die genaue Analyse der natürlichen Antikörper von besonderem Interesse: Sind sie gegen spezielle Domänen von VAR2CSA gerichtet? Sind Antikörper gegen bestimmte VAR2CSA-Bereiche mit vermindertem Infektionsrisiko, verbessertem Outcome oder Bindungshemmung assoziiert? Können auch einzelne Domänen – so wie das gesamte Protein - kreuzreaktive Antikörper hervorrufen?

Einige Studien untersuchen, ob Antikörper gegen spezielle VAR2CSA-Domänen in Seren von Mehrgebärenden im Vergleich zu Erstgebärenden erhöht vorkommen (vgl. Tab. 13). Dafür werden verschiedene VAR2CSA-Bereiche von Laborstämmen (3D7, FCR3) oder von plazentaren Isolaten rekombinant hergestellt, mit Proben inkubiert und anschließend die entsprechenden Antikörper quantitativ bestimmt. Mehrere Studien können eine paritätsabhängige Erhöhung von Antikörpern gegen DBL5 zeigen (Brolin et al. 2010, Ndam et al. 2015, Salanti et al. 2004, Tuikue Ndam et al. 2006, Gangnard

et al. 2010, Gnidehou et al. 2010), während andere keine signifikante Erhöhung ausmachen können (Dechavanne et al. 2015, Oleinikov et al. 2007). Ähnliches gilt für Antikörper gegen die übrigen DBL-Domänen (DBL1 - DBL4 und DBL6), die in einigen Studien erhöht, in anderen nicht erhöht vorliegen (vgl. Tab. 13) (Brolin et al. 2010, Dechavanne et al. 2015, Ndam et al. 2015, Oleinikov et al. 2007, Tuikue Ndam et al. 2006). Vor dem Hintergrund, dass die minimale CSA-Bindungsregion im N-terminalen Bereich von VAR2CSA liegt, werden auch Antikörper gegen DBL1-DBL2, DBL1-DBL3 und ID1-ID2a näher untersucht (Babakhanyan et al. 2014, Dechavanne et al. 2015, Ndam et al. 2015). Überraschenderweise können Babakhanyan et al. keine paritätsabhängige Steigerung von Antikörpern gegen ID1-ID2a (3D7- und FCR3-Stamm), einem der führenden Impfstoffkandidaten, aufzeigen. In dieser Studie sind Antikörper gegen ID1-ID2a weder schwangerschaftsspezifisch noch mit Schutz vor plazentarer Infektion assoziiert (Babakhanyan et al. 2014). Tuikue Ndam et al. und Dechavanne et al. finden dagegen bei Mehrgebärenden sowohl in der frühen Schwangerschaft (< 6. Monat) als auch bei der Geburt signifikant höhere Antikörperwerte gegen die N-terminal gelegenen Bereiche DBL1-DBL2 und DBL1-DBL3 (Dechavanne et al. 2015, Ndam et al. 2015).

Tab. 13 Antikörper gegen verschiedene VAR2CSA-Domänen bei Mehrgebärenden im Vergleich zu Erstgebärenden

Autor, Jahr	Land	Anzahl n (ges./MG)	Zeitpunkt	Antikörper gegen VAR2CSA-Domänen bei Mehrgebärenden	
				signifikant erhöht	nicht signif. erhöht
<i>3D7-Laborstamm</i>					
Salanti et al. 2004	Ghana	62/k.A.	Geburt	DBL5	k.A.
Tuikue Ndam et al. 2006	Senegal	275/163	<24. SSW Geburt	DBL5, 6	DBL1
Oleinikov et al. 2007	Tansania	62/32	Geburt	DBL1, 3, 6	DBL4, 5
Brolin et al. 2010	Malawi	189/72	3. Trimester	DBL5	DBL3, 6
Babakhanyan et al. 2014	Kamerun	955/595	1., 2., 3. Trimester	k.A.	ID1-ID2a
Dechavanne et al. 2015	Senegal	293/234	<24. SSW Geburt	DBL1-3, 2, 4-6 DBL1-3, 2	DBL5, 6 DBL5, 6, 4-6
<i>FCR3-Laborstamm</i>					
Tuikue Ndam et al. 2015	Benin	710/595	<24. SSW Geburt	DBL1-2, 3, 5 DBL1-2, 3, 4	DBL4, 6 DBL5, 6
Babakhanyan et al. 2014	Kamerun	955/595	Geburt	k.A.	ID1-ID2a
<i>CYK39-, CYK49-Stamm aus Senegal</i>					
Gangnard et al. 2010	Senegal	40/20	1., 2., 3. Trimester	DBL5	k.A.
Gnidehou et al. 2010	Senegal Benin	75/51 160/80	2., 3. Trimester	DBL5	k.A.

MG: Mehrgebärende, k.A.: keine Angaben, signif.: signifikant

Allgemein ist es schwierig, durch die Zusammenschau der bisherigen Studien Bereiche auszumachen, die stärker immunogen sind als andere. Die unterschiedlichen Studienorte, Studiengrößen und Laborverfahren (Herstellung der rekombinanten Proteine in verschiedenen Expressionssystemen, Verwendung von Laborparasiten (3D7, FCR3) oder Isolaten, quantitative Analyse der Antikörper mittels ELISA, Durchflusszytometrie oder Luminex-Assay) beeinträchtigen den Vergleich der Studien stark. Weitere Studien mit vergleichbarem Studiendesign sind daher wünschenswert.

Neben der Quantität, also der früheren und verstärkten Bildung von Antikörpern gegen verschiedene VAR2CSA-Bereiche und -Varianten, spielt die Qualität der Antikörper eine Rolle. Eine hohe Avidität der anti-VAR2CSA-Antikörper ist bei Mehrgebärenden in Kamerun mit einem reduzierten Risiko für plazentare Malaria assoziiert (Babakhanyan et al. 2015). Ähnliche Ergebnisse finden Tutterrow et al. im Senegal, wo Frauen mit hoher Antikörperavidität ein 7,6-fach niedrigeres Risiko für plazentare Infektionen haben als Frauen mit niedriger Avidität (Tutterrow et al. 2012a). Die Affinität der Antikörper steigt nicht mit steigender Schwangerschaftsanzahl, was darauf hindeutet, dass eine einzige Schwangerschaft ausreicht, um hochaffine Antikörper zu bilden (Brolin et al. 2010).

Weitere Studien befassen sich mit der Frage, ob Antikörper gegen VAR2CSA-Bereiche vor plazentarer Infektion und negativem Schwangerschaftsausgang schützen. Tutterrow et al. zeigen, dass hohe Antikörperlevel gegen verschiedene VAR2CSA-Domänen und -Varianten in der frühen Schwangerschaft bei Frauen in Kamerun mit Fehlen von plazentarer Infektion bei der Geburt assoziiert ist (Tutterrow et al. 2012b). In Benin senken Antikörper gegen das gesamte VAR2CSA-Protein sowie gegen DBL3 das Risiko für Malariainfektion in der Zeitspanne von Studienaufnahme (<24. SSW) bis zur Geburt. Hohe Antikörpertiter gegen DBL3 bei Studienbeginn korrelieren zudem mit verminderter plazentarer Infektion bei Geburt (Ndam et al. 2015). Anders herum sind bei einer früheren Studie im Senegal akute oder chronische plazentare Infektionen bei der Geburt mit niedrigen Antikörpern (DBL1, DBL5, DBL6) bei Studienbeginn (<24.SSW) assoziiert (Tuikue Ndam et al. 2006).

In einigen Studien kann ein Zusammenhang zwischen anti-VAR2CSA-Antikörpern und erhöhtem Geburtsgewicht festgestellt werden. Salanti et al. zeigen, dass schwangere Frauen in Kenia mit hohen anti-DBL5-Antikörpern durchschnittlich 428g schwerere Babys zur Welt bringen und ein vierfach niedrigeres Risiko für die Geburt von stark

untergewichtigen Kindern (<2500g) haben (Salanti et al. 2004). Hohe Antikörperlevel gegen DBL3 und DBL6 sind bei Schwangeren mit Malariainfektion in Mosambik mit signifikant höherem Geburtsgewicht und Gestationsalter assoziiert, wobei die Neugeborenen durchschnittlich 936g (anti-DBL3) bzw. 921g (anti-DBL6) schwerer und 2,64 Wochen älter waren als Kinder von Frauen mit niedrigen anti-DBL3-/DBL6-Antikörpertitern (Mayor et al. 2013). Antikörper gegen den N-terminal gelegenen DBL1-DBL2 Bereich korrelieren mit einer verminderten Prävalenz von erniedrigtem Geburtsgewicht bei Neugeborenen in Benin (Ndam et al. 2015).

In einer früheren Studie kann zudem gezeigt werden, dass Antikörper gegen diese Region (NTS-DBL2) aus dem Plasma mehrfach gebärender beninischer Frauen die CSA-Bindung von zwei verschiedenen Laborstämmen (FCR3, HB3) hemmen können (Bigey et al. 2011). Auch Doritchamou et al. untersuchen, inwieweit anti-VAR2CSA-Antikörper aus gepooltem Plasma von Frauen aus Mali die CSA-Bindung von unterschiedlichen plazentaren Parasiten (FCR3 und drei Varianten M711, M1010, M763) hemmen können. Natürliche Antikörper gegen ID1-ID2a, DBL4 und DBL5 behindern die CSA-Bindung zum gleichen Stamm (homolog), Antikörper gegen ID1-ID2a und DBL4 blockieren zusätzlich stammesübergreifend verschiedene Varianten (heterolog). In dieser Studie zeigen anti-DBL3-Antikörper keine homologe, jedoch heterologe Hemmungseigenschaften. Die bindungshemmende Aktivität des Plasmas bleibt auch nach vollständiger Entfernung der oben genannten Antikörper bestehen. Dies deutet darauf hin, dass weitere, in dieser Studie nicht untersuchte, funktionelle Antikörper existieren. Sie könnten gegen andere VAR2CSA-Varianten, gegen nicht-VAR2CSA-Proteine, die indirekt an der CSA-VAR2CSA-Bindung beteiligt sind, oder gegen konformationelle Epitope, die erst durch die 3D-Struktur des gesamten extrazellulären Anteils von VAR2CSA entstehen, gerichtet sein (Doritchamou et al. 2016).

In einem anderem Verfahren werden B-Zellen von *P. falciparum* exponierten, vor Kurzem schwangeren Mehrgebärenden immortalisiert. Die polyklonalen B-Zell-Kulturen werden auf Antikörper gescreent, die mit der Oberfläche von CSA-selektiven Parasitenstämmen reagieren. Auf diese Weise wurden acht spezifische monoklonale Antikörper gefunden, von denen wiederum drei die DBL3- und vier die DBL5-Domäne erkennen (Barfod et al. 2007). Sieben der acht Antikörper behindern die Bindung von infizierten Erythrozyten bzw. VAR2CSA an CSA. Einer der Antikörper (PAM1.4) zeigt keine Reaktivität zu DBL-Domänen und nur eine geringe zum gesamten VAR2CSA-

Protein, während er die Bindung zu CSA deutlich hemmen kann. Dies lässt vermuten, dass neben Antikörpern gegen VAR2CSA noch weitere Antikörper mit bisher unbekanntem Antigen existieren, die zur Hemmung der Parasitenbindung und zur natürlichen Immunität beitragen (Barfod et al. 2007, Barfod et al. 2010).

5.3.4 Weitere relevante Antikörper

Neben VAR2CSA können bei der Untersuchung von plazentaren Parasiten weitere heraufregulierte Proteine, darunter PFD1140w, PFB0115w und PFI1785w, gefunden werden, die eine Antikörperbildung hervorrufen (vgl. Kapitel 5.1.4) (Francis et al. 2007, Tuikue Ndam et al. 2008). Francis et al. zeigen, dass die Seroreaktivität gegenüber PFD1140w bei mehrgebärenden Frauen aus Ostafrika signifikant höher ist als bei Erstgebärenden oder Männern. Auch Antikörper gegen PFB0115w sind im Vergleich zu Männern erhöht, allerdings nicht signifikant (Francis et al. 2007). Seren von Frauen aus Ghana weisen signifikant höhere Antikörpertiter gegen PFI1785w auf als Seren von Männern (Tuikue Ndam et al. 2008). Der – ähnlich wie bei Antikörpern gegen VAR2CSA – geschlechtsspezifische und paritätsabhängige Erwerb von Antikörpern deutet darauf hin, dass diese Antikörper eine Rolle bei der natürlichen Immunität spielen könnten. Allerdings sind weitere Studien, die die Funktionalität und klinische Relevanz der Antikörper belegen, erforderlich.

Das AMA-1 (apical membran antigen 1) ist ein Antigen an der Oberfläche von Merozoiten und nicht spezifisch für Schwangerschaftsmalaria (Macraill et al. 2011). Dennoch werden anti-AMA1-Antikörper vermehrt bei Schwangeren gefunden und korrelieren mit erhöhtem Geburtsgewicht und Gestationsalter (Mayor et al. 2013, Doritchamou et al. 2016). In einer anderen Studie von Ndam et al. kann dagegen kein Zusammenhang mit klinischen Parametern hergestellt werden (Ndam et al. 2015).

Es wird diskutiert, ob neben bindungshemmenden Antikörpern auch solche mit opsonierenden Eigenschaften zur Entwicklung der natürlichen Immunität beitragen. Elliott et al. und Megnekou et al. fanden heraus, dass die Antikörper gegen CSA-selektive Parasitenstämme den Subtypen IgG1 und, im geringen Maße, IgG3 zugeordnet werden können (Elliott et al. 2005, Megnekou et al. 2005). Diese Antikörper besitzen eine hohe Affinität für den F_c-Rezeptor auf der Oberfläche verschiedener Immunzellen und können die Phagozytose markierter Erreger fördern (Bruhns et al. 2009). Mehrere *in vitro*-Studien zeigen, dass humane Monozyten VAR2CSA-tragende,

infizierte Erythrozyten phagozytieren (Barfod et al. 2011, Barfod et al. 2010, Feng et al. 2009, Keen et al. 2007). Werden die für Schwangerschaftsmalaria typischen IgG1 und IgG3 Antikörper entfernt, ist die opsonierende Phagozytoseaktivität deutlich vermindert (Keen et al. 2007). Die Phagozytoserate ist zudem in Seren von mehrgebärenden Frauen hoch, während sie bei Erstgebärenden und Männern niedrig ist (Keen et al. 2007, Lambert et al. 2014). Die Koinfektion mit HIV scheint die Bildung der opsonierenden Antikörper stark zu beeinflussen: mehrere Studien zeigen, dass bei Malariainfektion HIV-negative Frauen im Vergleich zu HIV-positiven eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität und/oder signifikant höhere opsonierende Antikörper aufweisen (Ataide et al. 2010, Ataide et al. 2011, Jaworowski et al. 2009, Keen et al. 2007). Höhere opsonierende Antikörperlevel gehen in einigen Studien mit verminderten malariaassoziierten Komplikationen wie mütterlicher Anämie und erniedrigtem Geburtsgewicht einher (Ataide et al. 2011, Feng et al. 2009, Jaworowski et al. 2009). Lambert et al. untersuchten, welche Bereiche von VAR2CSA von den opsonierenden Antikörpern erkannt werden und fanden heraus, dass DBL3, DBL5 und zu einem geringen Anteil auch DBL2 als Zielstruktur dienen (Lambert et al. 2014). Diese Ergebnisse stimmen mit einer früheren Studie von Barfod et al. überein, die zeigt, dass unspezifisches IgM besonders an DBL3 und DBL5 bindet und die Parasiten so vor opsonierenden Antikörpern abschirmt sowie vor Phagozytose schützt (Barfod et al. 2011).

Opsonierende Antikörper können zwar durch Aktivierung von Immunzellen die Eliminierung infizierter Erythrozyten fördern, eine erhöhte Stimulation von Monozyten und Makrophagen trägt allerdings auch zur plazentaren Entzündungsreaktion bei und wird in mehreren Studien mit negativen Folgen assoziiert (Chua et al. 2013, Muehlenbachs et al. 2010, Ordi et al. 2001, Rogerson et al. 2003b). Daher steht die Induktion bindungshemmender Antikörper im Zentrum der Impfstoffforschung (Pehrson et al. 2017b).

Box 6**Aktueller Forschungsstand****Entwicklung einer natürlichen Immunität gegen Malaria in der Schwangerschaft**

1. Junge Erstgebärende haben ein erhöhtes Risiko für periphere und plazentare Infektion sowie für malariaassoziierte Schwangerschaftskomplikationen (vgl. Tab. 11).
2. Antikörper gegen CSA-selektive Parasitenstämme korrelieren mit Parität, Hemmung der CSA-Bindung, verminderter plazentarer Infektion und verbessertem Outcome (vgl. Tab. 12).
3. Der Verlauf der Antikörperproduktion spricht für den Erwerb eines immunologischen Langzeitgedächtnisses (Ampomah et al. 2014a, 2014b).
4. Natürliche Antikörper sind kreuzreaktiv wirksam, sie hemmen die CSA-Bindung von (geographisch) unterschiedlichen plazentaren Stämmen (Fried et al. 1998b, Ricke et al. 2000, Hommel et al. 2010).
5. Antikörper gegen VAR2CSA sind gegen verschiedene Domänen gerichtet, bisher konnte keine am stärksten immunogene Region ausgemacht werden (vgl. Tab. 13).
6. Antikörper gegen verschiedene VAR2CSA-Bereiche sind mit verminderter plazentarer Infektion und verbessertem Outcome assoziiert (Salanti et al. 2004, Tutterrow et al. 2012, Mayor et al. 2013, Ndam et al. 2015).
7. Natürliche Antikörper gegen ID1-ID2a und DBL4 hemmen die Bindung von homologen und heterologen Parasitenstämmen (Doritchamou et al. 2016).
8. Weitere Antigene, gegen die schwangere Frauen Antikörper bilden, sind PFD1140w, PFB0115w, PFI1785w und AMA (Francis et al. 2007, Ndam et al. 2008, Mayor et al. 2013).
9. Opsonierende Antikörper, vor allem gegen DBL3 und DBL5, tragen zur Phagozytose infizierter Erythrozyten bei (Keen et al. 2007, Feng et al. 2009, Lambert et al. 2014).

Weiterer Forschungsbedarf

1. Studien mit vergleichbarem Studiendesign, die nach weiteren immunogenen Bereichen von VAR2CSA suchen
2. Weitere Korrelationsstudien von VAR2CSA-Domänen und Parasitämie bzw. Outcome
3. Klinische Relevanz von Antikörpern gegen PFD1140w, PFB0115w, PFI1785w und AMA1
4. Klinische Relevanz von opsonierenden Antikörpern

5.4 Identifizieren von immunogenen Epitopen innerhalb von VAR2CSA

Ziel eines effektiven Impfstoffes gegen Schwangerschaftsmalaria ist die Induktion von Antikörpern, die funktional und kreuzreaktiv sind, also die Bindung der Parasiten in der Plazenta hemmen und breit gegen verschiedene *P. falciparum*-Stämme wirken. Dabei steht die Identifizierung möglichst kleiner, immunogener Bereiche von VAR2CSA, die solche Antikörper hervorrufen, im Vordergrund.

5.4.1 Induktion von Antikörpern gegen einzelne Domänen von VAR2CSA

Um Antikörper gegen einzelne Bereiche von VAR2CSA zu induzieren, werden die jeweiligen Domänen rekombinant hergestellt und Versuchstieren (Mäusen, Ratten, Kaninchen) zusammen mit einem Adjuvans gespritzt. Diese bilden Antikörper, die aus

dem Serum extrahiert werden. Um zu testen, ob die Antikörper oberflächenexponierte Antigene erkennen, wird ihre Reaktivität zu VAR2CSA-exprimierenden Parasiten getestet (Barfod et al. 2006). Im Allgemeinen erkennen die meisten Antikörper gegen einzelne DBL-Domänen die Außenseite des gesamten Proteins (vgl. Tab. 14, S. 76). Eine Ausnahme stellen Antikörper gegen DBL4 dar, die in einigen Studien nur eine geringe oder gar keine Reaktivität aufweisen. Die Autoren nehmen an, dass DBL4 entweder nicht richtig gefaltet wurde oder im Inneren von VAR2CSA liegt und für Antikörper unzugänglich ist (Avril et al. 2008, Barfod et al. 2006, Oleinikov et al. 2008). In neueren Studien mit anderen rekombinanten Herstellungsmethoden reagieren anti-DBL4-Antikörper mit der Oberfläche des nativen VAR2CSA-Proteins (Avril et al. 2011a, Bigey et al. 2011, Dahlback et al. 2011, Nielsen et al. 2009, Pinto et al. 2011). Von entscheidender Bedeutung ist, ob die Antikörper nur den homologen Stamm, also den Stamm, gegen den sie gebildet wurden, oder auch kreuzreaktiv heterologe Stämme erkennen. Zwei Domänen, DBL3 und DBL5, fallen als Induktoren von stammesübergreifenden Antikörpern besonders ins Auge (vgl. Tab. 14, S. 76). Antikörper gegen DBL3 und DBL5 des 7G8-Stammes weisen beispielsweise neben einer Reaktivität zu 7G8 (homolog) auch eine zu vier weiteren, weltweit vorkommenden Stämmen (IT4, HB3, Pf2004, Pf2006, heterolog) auf (Avril et al. 2011a). Induzierte Antikörper gegen NF54-DBL3 und -DBL5 erkennen auch die Laborstämme FCR3 und HB3 (Nielsen et al. 2007). In einer Studie von Avril et al. reagieren anti-FCR3-DBL3-Antikörper mit zwei von vier getesteten heterologen Stämmen stark (7G8, HB3) und mit einem Stamm gering (P10711) (Avril et al. 2008). Zahlreiche weitere Studien bestätigen die Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen DBL5 (Avril et al. 2010, Fernandez et al. 2010, Oleinikov et al. 2008, Salanti et al. 2010, Saveria et al. 2013, Gangnard et al. 2010). Salanti et al. untersuchen, ob Antikörper gegen Domänen vom 3D7- und HB3-Stamm auch den FCR3-Laborstamm erkennen können. Dies ist bei allen Domänen des 3D7-Stammes außer DBL6 der Fall, während vom HB3-Stamm nur anti-DBL3-Antikörper reagieren (Salanti et al. 2010). Bei Saveria et al. erkennen alle getesteten Antikörper den CS2-Laborstamm sowie plazentare Isolate aus Tansania (Saveria et al. 2013). Tendenziell werden mehr Antikörper gegen C-terminale Domänen (DBL4-DBL6) als gegen N-terminale Domänen (DBL1-DBL3) gebildet (Oleinikov et al. 2008, Pinto et al. 2011).

Bei weiterer Untersuchung der induzierten Antikörper gegen einzelne Domänen zeigt sich, dass sie zwar mit der Oberfläche von VAR2CSA reagieren, die Bindung zu CSA

aber nicht hemmen (Avril et al. 2010, Avril et al. 2008, Barfod et al. 2006, Bigey et al. 2011, Dahlback et al. 2011). Einige Ausnahmen können jedoch gefunden werden. Salanti et al. zeigen, dass anti-3D7-DBL1-Antikörper und anti-HB3-DBL3-Antikörper die Bindung des FCR3-Stammes an CSA hemmen. Allerdings waren diese Ergebnisse bei Wiederholung des Versuches nicht gut reproduzierbar (Salanti et al. 2010). Das Immunisieren von Kaninchen mit dem gesamten 3D7-VAR2CSA-Protein führt zur Bildung von bindungshemmenden Antikörpern gegen DBL3 (45% Inhibition) und DBL5 (30% Inhibition) (Srivastava et al. 2011). Ratten-IgG gegen DBL5 hemmt die Bindung von ca. 20 – 56% der infizierten Erythrozyten von schwangeren Frauen aus Tansania (Saveria et al. 2013). In Mäusen induziert DBL5 von verschiedenen Stämmen (FCR3, 7G8, HB3, Dd2) Antikörper, die die CSA-Bindung von FCR3 zu ca. 35,5 – 64% hemmen. Die Kombination mit der DBL6-Domäne (FCR3-DBL5-DBL6) ruft in Mäusen bzw. Ziegen Antikörper hervor, die die homologe CSA-Bindung zu 77,6% bzw. zu etwa 50% inhibieren. Mäuse-IgG gegen FCR3-DBL6 hemmen 74 – 97% bzw. in einer früheren Studie 32 – 64% der CSA-Bindungen (Fernandez et al. 2010, Fernandez et al. 2008).

Tab. 14 Reaktivität und Bindungshemmung von Antikörpern gegen einzelne VAR2CSA-Domänen

Reaktivität von Antikörpern gegen rekombinant hergestellte VAR2CSA-Domänen zur Oberfläche von VAR2CSA-exprimierenden Parasitenstämmen und ihre Hemmung der Bindung an CSA							
Autor, Jahr	DBL1	DBL2	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6	Hemmung der CSA-Bindung
<i>3D7-Stamm</i>							
Barfod et al. 2006	ja	ja	ja	nein	ja	ja	nein
Oleinikov et al. 2008	nein		nein	nein	ja+	ja-	
Salanti et al. 2010	ja ¹	ja ¹	ja ¹	ja ¹	ja ¹	nein ¹	DBL1
Saveria et al. 2013				ja ¹	ja ¹	ja ¹	DBL4 ¹ , 5 ¹
<i>FCR3-Stamm</i>							
Avril et al. 2008	ja+ ²		ja+	nein-		ja-	nein
Fernandez et al. 2008			nein+			ja+	DBL6
Nielsen et al. 2009	ja	ja	ja	ja	ja	ja	DBL4+
Fernandez et al. 2010					ja+	ja	DBL5+, 6
Bigey et al. 2011				ja	ja	ja	nein
Dahlback et al. 2011	ja	ja	ja	ja			nein
Pinto et al. 2011	nein	nein	nein	ja ³	ja	ja	DBL4+ ³
<i>Weitere Stämme</i>							
Avril et al. 2010 (7G8)	ja-				ja+		nein
Avril et al. 2011 (7G8)	ja-		ja+	ja-	ja+	ja-	DBL4 ²
Nielsen et al. 2007 ⁴ (NF54)	nein+	ja-	ja+	nein-	ja+	nein-	
Salanti et al. 2010 (HB3)	nein ¹	nein ¹	ja ¹	nein ¹	nein ¹	nein ¹	DBL3 ¹

ja/nein ohne Zusatz: nur homologe Parasitenstämmen wurden getestet. +: auch heterologe Stämme wurden erkannt bzw. deren Bindung gehemmt. -: heterologe Stämme wurden nicht erkannt. ¹getestet wurde nur die Bindung an bzw. Hemmung von heterologen Parasitenstämmen; ²binden/hemmen weniger als die Hälfte der getesteten Stämme; ³nur bei Ratten; ⁴Reaktivität positiv ab > 20% Erkennung

Die Immunisierung mit DBL4 führt in mehreren unabhängigen Studien zur Bildung von bindungshemmenden Antikörpern gegen homologe und heterologe Stämme. Nielsen et al. zeigen, dass von den einzelnen DBL-Domänen ausschließlich anti-DBL4-Antikörper die Bindung an CSA effektiv hemmen (ca. 95% des homologen FCR3-Stammes und 65 – 75% der heterologen Stämme). Die Bindungshemmung und Oberflächenreaktivität der anti-DBL4-Antikörper sind bei erneuter Immunisierung von Ratten reproduzierbar (Nielsen et al. 2009). Magistrado et al. bestätigen die kreuzreaktive bindungshemmende Wirkung von anti-FCR3-DBL4-Antikörpern, die die CSA-Bindung aller 13 getesteten Isolate aus Benin und Tansania zu durchschnittlich 45% inhibieren. Das Beifügen einer kleinen Interdomäne (DBL4-ID4) kann die Bindungshemmung auf 60% erhöhen, was sogar über der Inhibitionskapazität von 55% des Kontrollplasmas von Mehrgebärenden liegt (Magistrado et al. 2011). Mit einer Hemmung der Bindung von 35 – 68% der infizierten Erythrozyten aus Tansania zeigen Antikörper gegen DBL4 auch bei Saveria et al. eine hohe Aktivität, die beinahe an die des Kontrollplasmas (68 – 82%) heranreicht (Saveria et al. 2013). Beim Vergleich der Immunisierung verschiedener Labortiere fällt auf, dass anti-DBL4-Antikörper aus Rattenserum, nicht jedoch aus Kaninchenserum, gewonnen werden können (Pinto et al. 2011). Auch bei Avril et al. können nur Antikörper gegen 7G8-DBL4 aus Rattenserum die CSA-Bindung hemmen (Avril et al. 2011a). Die Immunisierung von Ratten mit dem gesamten rekombinant hergestellten FCR3-VAR2CSA-Protein führt bei Khunrae et al. zur kompletten CSA-Bindungshemmung, während anti-DBL4-Antikörper lediglich 50 – 85% Inhibition erreichen (Khunrae et al. 2010).

Zur weiteren Charakterisierung von immunogenen Epitopen innerhalb von DBL4 führen Ditlev et al. und Gangnard et al. sog. „Epitope Mapping“-Studien durch. Dabei werden mithilfe eines DBL4-Peptid Arrays bei Ditlev et al. vor allem drei Bereiche (Pep1, Pep2, Pep3) identifiziert, die mit IgG gegen DBL4 aus Rattenserum reagieren. Allerdings können Antikörper gegen diese Peptide die CSA-Bindung nicht hemmen (Ditlev et al. 2012). Gangnard et al. untersuchen sechs ausgewählte Epitope (Pep-1 bis Pep-6) von DBL4 auf ihre Immunogenizität. Anti-DBL3-DBL4-Antikörper aus Kaninchenserum reagieren mit Pep-2, Pep-4, Pep-5 und Pep-6, nicht mit Pep-1 und Pep-3 (Gangnard et al. 2015). Peptide, die Pep-2 und Pep-4 umfassen, sind auch bei Ditlev et al. hoch immunogen, während Pep-5 und Pep-6 hier eine geringe Reaktivität zeigen. Beide Studien stimmen überein, dass Peptide, die bei Gangnard et al. Pep-1 und Pep-3 umfassen, nicht immunogen sind (Ditlev et al. 2012, Gangnard et al. 2015).

5.4.2 Induktion von Antikörpern gegen Multidomänen von VAR2CSA

Multidomänen scheinen im Allgemeinen stärker immunogen zu sein als einzelne DLB Domänen (Nielsen et al. 2009). Tab. 15 (S. 80) veranschaulicht die Ergebnisse der folgenden Studien. Induzierte Antikörper gegen alle gelisteten Kombinationen zeigen eine hohe Reaktivität mit der Oberfläche der homologen Parasitenstämme.

Bei Niesen et al. erkennen Antikörper gegen die Multidomänen NTS-DBL2, DBL3-DBL4 und DBL5-DBL6 das gesamte FCR3-VAR2CSA-Protein deutlich besser als Antikörper gegen einzelne Domänen oder Subdomänen. Von den getesteten Multidomänen induzieren NTS-DBL2 und DBL3-DBL4 bindungshemmende Antikörper (60 – 70% Inhibition), während anti-DBL2-DBL3 und anti-DBL5-DBL6 Antikörper die Bindung nicht stärker hemmen als das präimmune Kontrollserum. Antikörper gegen die einzelne DBL4-Domäne zeigen mit >90% Hemmung den stärksten Effekt (Nielsen et al. 2009).

Bigey et al. immunisieren Mäuse mit einem DNA Plasmid-Vektor, in dem DNA-Sequenzen verschiedener VAR2CSA-Fragmente eingefügt sind. Von den neun untersuchten Multidomänen rufen nur NTS-DBL6 und NTS-DBL2 bindungshemmende Antikörper hervor. Antikörper gegen NTS-DBL2 inhibieren die CSA-Bindung des homologen FCR3-Stammes zu >90%, der heterologe Laborstamm HB3 sowie 12 von 15 Feldisolaten aus Benin werden zu >50% gehemmt (Bigey et al. 2011).

Doritchamou et al. bestätigen die bindungshemmende Wirkung von anti-NTS-DBL2-Antikörpern. Da DBL2 ein dimorphes Areal besitzt, durch das die Erreger dem FCR3 bzw. 3D7-Stamm zugeordnet werden können, immunisieren sie Kaninchen mit FCR3-NTS-DBL2 und 3D7-NTS-DBL2 und vergleichen die induzierten Antikörper miteinander (Doritchamou et al. 2013, Sander et al. 2009). Anti-FCR3-NTS-DBL2-Antikörper hemmen die Bindung des homologen FCR3 sowie des heterologen HB3-Stammes komplett, haben aber keinerlei Effekt auf den NF45-Stamm. 16 von 18 Isolaten aus Benin werden zu >40% gehemmt. Anti-3D7-NTS-DBL2-Antikörper verhindern die Bindung der heterologen Laborstämme HB3 und FCR3 zu 20 – 40%, des NF54-Stammes zu 85% und von 15 Feldisolaten zu >50%. Die Kombination der beiden NTS-DBL2-Varianten führt zur Bildung von Antikörpern, die die Stämme FRC3, HB3 und NF54 zu >82% hemmen können (Doritchamou et al. 2013).

Dahlback et al. immunisieren Ratten mit den Einzeldomänen DBL1, DBL2 und DBL3 sowie den Multidomänen NTS-DBL6, NTS-DBL3, NTS-DBL4 und DBL4-ID4.

Antikörper gegen die einzelnen Domänen sind nicht zur Bindungshemmung fähig, während alle Multidomänen die Bindung effektiv verhindern. Am stärksten hemmen anti-NTS-DBL6- und anti-DBL4-ID4-Antikörper mit >90% Inhibition bei einer Verdünnung von 1:10 (Dahlback et al. 2011).

Aufbauend auf Bigey et al. untersuchen Bordbar et al., ob innerhalb von NTS-DBL2 noch kleinere Bereiche wie NTS-DBL1, NTS-ID1, ID1, ID1-DBL2 und DBL2, bindungshemmende Antikörper hervorrufen. Antikörpern gegen NTS-DBL1, ID1 und DBL2 gelingt keine, gegen NTS-ID1 eine partielle (60%) und gegen ID1-DBL2 eine komplette Inhibition. Anti-ID-DBL2-Antikörper hemmen zudem den heterologen Laborstamm HB3, wobei eine höhere Konzentration als bei homologer FCR3 Hemmung nötig ist, sowie sechs von acht Isolaten aus Benin (zwei >90%) (Bordbar et al. 2012).

Clausen et al. analysieren weitere N-terminal gelegene Bereiche von VAR2CSA. Bei einer Verdünnung von 1:10 hemmen Antikörper gegen alle Kombinationen (DBL1-DBL6, DBL1-DBL2, DBL1-ID2a, DBL1-ID2b, ID1-ID2a, ID1-ID2b) außer ID1-DBL2 die CSA-Bindung zu >90%. Bei stärkerer Verdünnung (1:20, 1:50) nimmt der bindungshemmende Effekt der anti-DBL1-DBL2-Antikörpern stark ab, während die übrigen Antikörper funktional bleiben (Clausen et al. 2012).

Nielsen et al. untersuchen, ob Antikörper gegen verschiedene FCR3 bzw. 3D7 Multidomänen kreuzreaktiv wirksam sind und die Bindung von vier weiteren Stämmen (7G8, N4708, HB3 und p7201) hemmen. Vom FCR3-Stamm sind Antikörper gegen ID1-ID2a am effektivsten, gefolgt von anti-NTS-DBL2-Antikörpern. Anti-ID1-DBL2a-Antikörper zeigen weder homologe noch heterologe Bindungshemmung. Beim 3D7-Stamm sind Antikörper gegen NTS-ID2a am wirksamsten, gefolgt von anti-DBL4-ID4-Antikörpern. Hier ruft ID1-ID2a, der stärkste Induktor von Antikörpern beim FCR3-Stamm, keine inhibierenden Antikörper hervor. Im Allgemeinen haben feine Änderungen der Proteingrenzen bei gleichem Stamm bzw. gleiche Proteingrenzen bei unterschiedlichen Stämmen starke Auswirkungen auf die Bindungshemmungsfähigkeit der Antikörper. Die Verwendung von VAR2CSA-Fragmenten könnte zur Exposition von neuen immundominanten Epitopen führen, die die Bildung von nicht funktionalen Antikörpern bewirken, und des Weiteren die Proteinfaltung, die Stabilität und den Expressionsertrag beeinflussen (Nielsen et al. 2015).

Der unmittelbare Vergleich der Studienergebnisse, insbesondere der Hemmungsaktivitäten, ist aufgrund der unterschiedlichen Studiendesigns (vgl. Kapitel 5.4.3) nicht möglich.

Tab. 15 Hemmung der CSA-Bindung durch Antikörper gegen verschiedene Multidomänen von VAR2CSA

VAR2CSA-Multidomänen												Autor, Jahr, <i>P. falciparum</i> -Stamm				
NTS	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6	Nielsen 2009	Bigey 2011	Dahlback 2011	Bordbar 2012	Doritchamou 2013	Nielsen 2015	
NTS	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6	FCR3	FCR3	FCR3	FCR3	FCR3 / 3D7	FCR3 / 3D7	
NTS-DBL6	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6	ja	ja	ja	ja*			
NTS-ID1	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6							
NTS-DBL2	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6	ja	ja			ja+ /ja+	ja+ /ja-	
NTS-DBL2b	DBL1	ID1	DBL2b	ID2b										ja+ /ja+	ja+ /ja-	
NTS-ID2a	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6				ja*	ja+	ja+	
DBL1-ID2b	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6				ja			
NTS-DBL3	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6	nein	nein	ja				
NTS-DBL	DBL1	ID1	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6			ja				
ID1-DBL2	ID1	DBL2											ja+.....		nein.../...k.A.	
ID1-DBL2b	ID1	DBL2b													ja- / ja+	
ID1-ID2a	ID1	DBL2	ID2a												ja+... / nein	
ID1-ID2b	ID1	DBL2	ID2a	ID2b												
DBL2-ID2b	DBL2	ID2a	ID2b							nein	nein					
DBL2-DBL3	DBL2	ID2a	ID2b	DBL3												
ID2-DBL3	ID2a	ID2b	DBL3													
DBL3-DBL4	DBL3	DBL4								ja	nein					
DBL3-DBL6	DBL3	DBL4	DBL5	DBL6												
DBL4-ID4	DBL4-ID4											ja.....			ja- /ja+	
DBL4-DBL5	DBL4	DBL5														
DBL5-DBL6	DBL5	DBL6								nein	nein					
Expressions-system	Baculo -virus	DNA Vektor	Baculo -virus	DNA Vektor	DNA Vektor	DNA Vektor	Baculo -virus	DNA Vektor	Baculo -virus	Baculo -virus	DNA Vektor	DNA Vektor	Baculo -virus	DNA Vektor	Expres2-1 Plasmid	
Tier	Ratten	Mäuse	Ratten	Mäuse	Ratten	Mäuse	Ratten	Mäuse	Ratten	Ratten	Mäuse	Ratten	Ratten	Kaninchen	Ratten	
Hemmungs-assay	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	Petri-schale	

ja/nein ohne Zusatz: die CSA-Bindung homologer *P. falciparum*-Stämme wurde durch Antikörper gegen die entsprechenden VAR2CSA-Multidomänen erfolgreich gehemmt (ja) bzw. nicht gehemmt (nein), ja+: Antikörper hemmen auch die Bindung von heterologen Laborstämmen und Isolaten, ja-: Antikörper hemmen die Bindung von heterologen Stämmen nicht *Der N-terminale Bereich wurde nicht mitgetestet (DBL1x-DBL6ε, DBL1x-DBL2x), farbig markiert sind die Domänenkombinationen, die in den jeweiligen Studien als potentielle Impfstoffkandidaten genannt werden

5.4.3 Studiendesign und Probleme des Studienvergleiches

Die Laborstudien zur Untersuchung induzierter Antikörper unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht: zur Herstellung der rekombinanten Proteine werden verschiedene Proteingrenzen und Expressionssysteme verwendet, es werden unterschiedliche Tiere (Mäuse, Ratten, Kaninchen) immunisiert und zur Messung der Bindungshemmung stehen verschiedene Assays zur Verfügung.

Herstellung von rekombinanten Proteinen

Zur Herstellung rekombinanter Proteine wird die genetische Information für ein VAR2CSA-Fragment in einem Vektor kloniert und in einer Wirtszelle exprimiert. Die am häufigsten verwendeten Expressionssysteme sind das Bakterium E-coli und die Hefeart *Pichia Pastoris* (verwendete Vektoren: verschiedene Plasmidvektoren), die High-Five Insektenzellen (verwendeter Vektor: Baculovirus) und *Drosophila Schneider* 2-Insektenzellen (DS2) (verwendeter Vektor: pExpreS2-1 Plasmid) (Avril et al. 2008, Barfod et al. 2006, Nielsen et al. 2015, Oleinikov et al. 2008). Da VAR2CSA und seine Domänen eine hochkomplexe Quartärstruktur mit vielen Disulfidbrücken besitzen, ist es fraglich, ob Expressionssysteme die natürliche Faltung der Proteine vollständig imitieren können (Gill et al. 2009). Fried et al. vergleichen die Bindungshemmungskapazität von Antikörpern gegen DBL4 und DLB5, die in drei verschiedenen Expressionssystemen (E-coli, *Pichia Pastoris*, Baculovirus) hergestellt wurden. Alle drei Systeme, auch der Prokaryot E-coli, produzieren Proteine, die kreuzreaktiv inhibierende Antikörper induzieren. Allerdings variiert die Aktivität stark je nach System und Stamm (Fried et al. 2013). Neben der Wahl des Expressionssystems beeinflusst die Definition der Proteingrenzen beim Fragmentieren von VAR2CSA die 3D-Struktur und die Bildung von Antikörpern (Avril et al. 2009, Nielsen et al. 2015).

Immunisieren von Labortieren

Es stellt sich die Frage, ob das Immunisieren von verschiedenen Labortieren zur gleichen Immunantwort führt und ob die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Pinto et al. impfen Mäuse, Ratten und Kaninchen mit allen DBL-Domänen und vergleichen die Antikörperreaktion mit der des gesamten VAR2CSA-Proteins. Im Allgemeinen scheint VAR2CSA in Kaninchen und Ratten im Vergleich zu Mäusen stärker immunogen zu sein und nur Ratten scheinen hohe Antikörperlevel gegen DBL4 zu bilden. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich durch Differenzen in

immunodominanten B-Zell-Epitopen von verschiedenen Tierspezies bedingt (Pinto et al. 2011). Antikörper gegen das rekombinante VAR2CSA-Protein hemmen, anders als natürliche Antikörper, die Bindung heterologer Stämme nicht (Avril et al. 2011b, Khunrae et al. 2010). Ob dies daran liegt, dass für eine stammesübergreifende Immunantwort mehrere Varianten nötig sind oder ob die Immunisierung von Tieren zu einer anderen Immunreaktion führt als die Immunantwort beim Menschen, bleibt offen (Fried und Duffy 2015). Die Immunreaktion ist zudem von dem verwendeten Adjuvans abhängig. Pinto et al. untersuchen die Antikörperbildung gegen DBL4-ID4 unter Verwendung von drei unterschiedlichen Adjuvanzen, die aktuell in klinischen Studien verwendet werden: Alhydrogel® (Aluminiumsalze), Montanide® ISA 720 (Emulsion aus organischem Öl, Mannid-Monooleat und Wasser) und CAF01 (cationic adjuvant formulation). Alle drei Adjuvanzen rufen eine starke Th1- und Th2- Immunantwort mit bindungshemmenden Antikörpern gegen DBL4-ID4 hervor (Pinto et al. 2012).

Bindungshemmungsassays

In verschiedenen Laboren wird mit unterschiedlichen Bindungshemmungsassays gearbeitet, sodass der Vergleich der Messwerte erschwert ist. Verwendet werden statische Assays, wie der standardisierte Petrischalenassay (Fried et al. 1998b, Saveria et al. 2015) und der 96-well Platten Assay (Nielsen und Salanti 2015, Dahlback et al. 2011), bei denen nicht CSA-bindende infizierte Erythrozyten nach einer gewissen Inkubationszeit gewaschen werden, und dynamische Assays, wie der *in vitro*-Fluss-basierte Assay (Cooke et al. 1996, Fernandez et al. 2010) und die *ex vivo*-Plazentaperfusion (Pehrson et al. 2016), bei denen die infizierten Erythrozyten unter Fluss an CSA binden. Beim Vergleich dieser Inhibitionsassays stellen Pehrson et al. fest, dass es, vor allem beim Fluss- und Petrischalenassay, hohe Schwankungen zwischen und innerhalb der Assays gibt. Die statischen Assays sind am sensitivsten, während die *ex vivo*-Plazentaperfusion die physiologischen Verhältnisse am besten wiedergibt. Die Bindung von VAR2CSA und ID1-ID2a wird bei einer Verdünnung der entsprechenden Antikörper von 1:2000 im 96-well-Assay, von 1:1000 im Petrischalenassay, von 1:100 in der Plazentaperfusion und von 1:10 im Fluss-basierten Assay zu 50% gehemmt (Pehrson et al. 2017b).

Eine Vereinheitlichung der in den verschiedenen Laboren angewandten Methoden ist dringend nötig, um die Studienergebnisse und Impfstoffkandidaten miteinander vergleichen zu können, und wurde 2016 in einem Treffen der beiden Impfstoff-Arbeitsgruppen beschlossen (Fried et al. 2013, Chene et al. 2016).

Box 7**Aktueller Forschungsstand****Präklinische Studien zur Impfstoffentwicklung**

1. Induzierte Antikörper gegen einzelne Domänen reagieren mit der Oberfläche von VAR2CSA-tragenden Parasiten (vgl. Tab. 14).
2. Antikörper gegen DBL3 und DBL5 erkennen kreuzreaktiv verschiedene VAR2CSA-Stämme (Nielsen et al. 2007, Oleinikov et al. 2008, Avril et al. 2008, 2011, Fernandez et al. 2010).
3. Antikörper gegen DBL4/ DBL4-ID4 können die CSA-Bindung hemmen (Nielsen et al. 2009, Avril et al. 2011, Magistrado et al. 2011, Pinto et al. 2011, Saveria et al. 2013, Dahlback et al. 2011).
4. Epitope Mapping-Studien können besonders immunogene Bereiche innerhalb einer Domäne z.B. DBL4 erfassen (Ditlev et al. 2012, Gangnard et al. 2015).
5. Multidomänen sind stärker immunogen als einzelne Domänen (Nielsen et al. 2009).
6. Multidomänen, die bindungshemmende Antikörper induzieren, befinden sich vor allem im N-terminalen Bereich: NTS-DBL2 (Nielsen et al. 2009, Bigey et al. 2011, Doritchamou et al. 2013, Nielsen et al. 2015), NTS-ID2a-3D7 und ID1-ID2a-FCR3 (Nielsen et al. 2015), DBL1-ID2b und ID1-ID2b (Clausen et al. 2012) und ID1-DBL2 (Bordbar et al. 2012).
7. Verschiedene Labormethoden (Expressionssysteme, Labortiere, Bindungshemmungsassays) erschweren den Vergleich der Studien.

Weiterer Forschungsbedarf

1. Bindungshemmungsstudien mit vergleichbarem Studiendesign
2. Untersuchen der kreuzreaktiven Bindungshemmung von Antikörpern gegen Multidomänen wie DBL1-ID2b und ID1-ID2b
3. Epitope Mapping-Studien von N-terminal gelegenen Multidomänen

6 Diskussion

Malaria in der Schwangerschaft führt auch heute noch zu zahlreichen Komplikationen und wird jährlich für 10.000 mütterliche und 200.000 perinatale Todesfälle verantwortlich gemacht (Schantz-Dunn und Nour 2009).

Präventionsmaßnahmen in Endemiegebieten umfassen unter anderem die Nutzung von mit Insektiziden behandelten Moskitonetzen und die intermittierende präventive Therapie mit Sulfadoxin-Pyrimethamin. Obwohl sowohl die Netze als auch die präventive medikamentöse Therapie mit einer deutlichen Reduktion von Parasitämie und Schwangerschaftskomplikationen einhergehen, weisen sie einige Grenzen auf (Gamble et al. 2006, Radeva-Petrova et al. 2014). Zum einen sind Zugang und Wissen noch immer beschränkt: 2013 schliefen nur 44% der Menschen in Risikogebieten unter mit Insektiziden behandelten Moskitonetzen und nur 17% der schwangeren Frauen erhielten die empfohlenen drei oder mehr Dosen von Sulfadoxin-Pyrimethamin (WHO 2014). Weiterhin nehmen Resistenzen der Anophelesmücke gegen Insektizide und von *P. falciparum* gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin zu (WHO 2014, Ruizendaal et al. 2017, Gutman et al. 2015, Alifrangis et al. 2014). Die Einnahme von Sulfadoxin-Pyrimethamin kann zudem zu allergischen Reaktionen führen und ist bei HIV-positiven Frauen, die zur Prophylaxe von opportunistischen Infektionen Cotrimoxazol einnehmen, aufgrund schwerer Arzneimittelinteraktionen kontraindiziert (Gonzalez et al. 2016, Peters et al. 2007). Schließlich wird Sulfadoxin-Pyrimethamin erst ab dem 2. Trimenon gegeben, da es aufgrund potentieller Embryotoxizität im 1. Trimenon nicht zugelassen ist (Peters et al. 2007). Gerade die frühe Schwangerschaft wird aber von Huynh et al. als Hochrisikoperiode beschrieben. Trotz der geringen Anzahl an Studien kann gezeigt werden, dass Infektionen mit zahlreichen Komplikationen bereits in der frühen Schwangerschaft auftreten können (Doritchamou et al. 2012, Huynh et al. 2011).

Ein Impfstoff gegen *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft könnte die oben genannten Lücken schließen und Frauen in Endemiegebieten bereits im ersten Trimenon der ersten Schwangerschaft vor malariaassoziierten Komplikationen schützen (Pehrson et al. 2017a). Als zusätzliche Präventionsmaßnahme könnte er Mädchen vor der Pubertät gegeben werden, sodass zu Beginn einer Erstschwangerschaft bereits Antikörper gegen plazentare VAR2CSA-tragende *P.*

falciparum-Stämme vorhanden sind. Da der neu auf dem Markt erschienene Impfstoff RTS/S für Kinder nicht direkt gegen plazentare Parasiten wirksam ist, bleibt die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Schwangerschaftsmalaria hoch aktuell (Tuikue-Ndam und Deloron 2015).

Grundlage der Impfstoffentwicklung ist ein gutes Verständnis von pathogenetischen und immunologischen Vorgängen bei der Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft. Dabei spielt die Interaktion zwischen CSA und VAR2CSA, die Pathogenese der plazentaren Inflammation und die natürliche Immunitätsentwicklung eine zentrale Rolle. Da VAR2CSA ein großes Protein mit variablen Anteilen ist, steht die Identifizierung von kleineren immunogenen Bereichen, die eine breite und effektive Immunantwort hervorrufen, im Mittelpunkt. Natürliche und in Tierversuchen induzierte Antikörper gegen verschiedene VAR2CSA-Fragmente werden bezüglich Korrelation mit Parasitämie sowie klinischen Parametern und CSA-Bindungshemmungsaktivität untersucht. Auf diese Weise können geeignete Antigenabschnitte für einen Impfstoff identifiziert werden, die in klinischen Studien getestet werden (vgl. Abb. 15).

Abb. 15 Schritte zur Impfstoffentwicklung



6.1 Grundlagenforschung

6.1.1 VAR2CSA als Impfstoffkandidat

VAR2CSA ist aktuell der führende Kandidat für die Entwicklung eines Impfstoffes. VAR2CSA gilt als Hauptligand von CSA in der Plazenta, denn (I) die Transkription des *var2csa*-Gens ist bei CSA-selektiven Parasiten hochreguliert, (II) eine Zerstörung dieses Gens führt zum Verlust der CSA-Bindungsfähigkeit und (III) VAR2CSA enthält mehrere CSA-Bindungsstellen (Duffy et al. 2006, Salanti et al. 2004, Salanti et al. 2003, Viebig et al. 2005, Viebig et al. 2007, Gamain et al. 2005). Im Vergleich zu anderen *var*-Genen ist *var2csa* relativ gut konserviert, kann im Genom unterschiedlicher Parasitenstämme nachgewiesen werden und zeichnet sich durch eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz aus (Kraemer et al. 2007, Salanti et al. 2003, Bockhorst et al. 2007). Natürlich gebildete Antikörper gegen VAR2CSA (I) sind geschlechtsspezifisch, (II) steigen mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl an und (III) korrelieren mit reduzierter Parasitämie, mit verminderten malariaassoziierten Komplikationen und mit Hemmung der CSA-Bindung (vgl. Tab. 12). Sie sind zudem kreuzreaktiv gegen Stämme unterschiedlicher geographischer Herkunft wirksam (Fried et al. 1998b, Hommel et al. 2010). Innerhalb von nur einer Schwangerschaft kann ein ausreichendes immunologisches Langzeitgedächtnis mit B-Memory-Zellen gegen VAR2CSA-Epitope gebildet werden (Ampomah et al. 2014a). Weiterhin können in Tierversuchen induzierte Antikörper gegen VAR2CSA die CSA-Bindung hemmen (Khunrae et al. 2010, Bigey et al. 2011, Clausen et al. 2012, Dahlback et al. 2011).

Aufgrund der Größe, der Komplexität und des Polymorphismus von VAR2CSA ist die rekombinante Herstellung des gesamten Proteins als Impfstoff jedoch nicht möglich. Daher werden kleinere Bereiche von VAR2CSA auf ihre Immunogenität untersucht. Die Verwendung von Fragmenten bringt den Vorteil mit sich, dass konservierte oder geteilte variable Regionen, die funktionale, bindungshemmende Antikörper induzieren, gezielt ausgewählt werden können. Hochvariable Regionen, die funktionslose oder stammesspezifische Antikörper hervorrufen, könnten ausgespart werden (Tuikue-Ndam und Deloron 2015). So kann der Impfstoff theoretisch effektiver sein als die natürlich erworbene Immunität. Auf der anderen Seite wird durch Fragmentieren von VAR2CSA die komplexe, höher geordnete Quartärstruktur zerstört. Einzelne Domänen können CSA beispielsweise nicht mit gleicher Spezifität und Affinität binden,

wie das gesamte VAR2CSA-Protein (Khunrae et al. 2010, Srivastava et al. 2011, Srivastava et al. 2010). An der Proteinoberfläche können neue Antigene entstehen, die im nativen Protein nicht existieren oder im Inneren von VAR2CSA liegen und die die Entstehung von nicht-funktionalen Antikörpern begünstigen (Nielsen et al. 2015).

Die Identifizierung von VAR2CSA als Hauptligand für CSA, die relativ gute Konservierung des var2csa-Gens und die Beobachtung der schnellen natürlichen Immunitätsbildung mit protektiven, bindungshemmenden und kreuzreaktiven Antikörpern machen VAR2CSA zu einem erfolgversprechenden Impfstoffkandidat. Allerdings bleiben viele Fragen bezüglich Größe und Polymorphismus von VAR2CSA offen: welche VAR2CSA-Bereiche induzieren eine ausreichende bindungshemmende Immunantwort? Müssen dafür verschiedene Fragmente kombiniert werden? Welchen Einfluss hat der Polymorphismus auf den Impfstoffe Erfolg? Reichen Antigene eines Stammes aus, um eine breite, kreuzreaktive Antikörperbildung – wie bei der natürlichen Immunität – hervorzurufen oder müssen mehrere Genotypen kombiniert werden? Sind für unterschiedliche geographische Regionen unterschiedliche Impfstoffe erforderlich?

Box 8

VAR2CSA als erfolgversprechender Impfstoffkandidat

1. VAR2CSA ist als Hauptligand von CSA für die plazentare Adhäsion verantwortlich (Salanti et al. 2003, 2004; Duffy et al. 2006, Viebig et al. 2005, 2007).
2. Das var2csa-Gen ist relativ gut konserviert (Salanti et al. 2003, Kremer et al. 2007, Bockhorst et al. 2007).
3. Natürliche Antikörper gegen VAR2CSA sind geschlechtsspezifisch, nehmen mit steigender Schwangerschaftsanzahl zu, korrelieren mit verminderten malariaassoziierten Komplikationen (vgl. Tab. 12) und sind kreuzreaktiv gegen verschiedene Stämme wirksam (Fried et al. 1998, Hommel et al. 2010).
4. Ein bleibendes immunologisches Gedächtnis kann innerhalb einer Schwangerschaft gebildet werden (Ampomah et al. 2014a).
5. In Tierversuchen können induzierte Antikörper gegen VAR2CSA die CSA-Bindung hemmen (Khunrae et al. 2010, Bigey et al. 2011, Dahlback et al. 2011, Clausen et al. 2012).
6. Durch Fragmentieren von VAR2CSA in kleinere Bereiche ist eine kommerzielle Herstellung möglich. Die Konzentration auf konservierte oder geteilte variable Regionen kann zur Erhöhung der Effektivität und Kreuzreaktivität beitragen (Tuikue-Ndam und Deloron 2015).

Probleme und Herausforderungen von VAR2CSA als Impfstoffkandidat

1. Durch Fragmentieren von VAR2CSA wird die 3D-Struktur verändert, es ergeben sich neue Schnittränder, neue Oberflächenantigene und ggf. funktionslose AK (Nielsen et al. 2015)
2. Größe von VAR2CSA: Welche VAR2CSA-Bereiche rufen eine ausreichende Immunantwort hervor? Müssen mehrere Fragmente kombiniert werden?
3. Polymorphismus von VAR2CSA: Sind Antigene eines Stammes für eine breite, kreuzreaktive Immunantwort ausreichend oder müssen mehrere Genotypen kombiniert werden? Sind unterschiedliche Impfstoffe für unterschiedliche Regionen nötig?

Es wird diskutiert, ob neben CSA weitere Rezeptoren wie Hyaluronsulfat und präimmune IgG- und IgM-Antikörper für die Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta verantwortlich sein könnten (vgl. Kapitel 5.1.4) (Beeson und Brown 2004, Beeson et al. 2000, Flick et al. 2001, Rasti et al. 2006). In aktuelleren Studien weisen plazentare Parasiten jedoch keine Bindung an Hyaluronsulfat oder IgG-Antikörper auf und Hyaluronsulfat kann im intervillösen Raum nicht nachgewiesen werden (Fried et al. 2006, Muthusamy et al. 2007, Viebig et al. 2007). Präimmunes IgM bindet zwar in mehreren Studien mit dem F_c Teil an VAR2CSA, dies scheint aber eher der Immunevasion des Erregers durch Abschirmen als der Adhäsion zu dienen (Barfod et al. 2011, Creasey et al. 2003, Semblat et al. 2006, Stevenson et al. 2015). Diese Ergebnisse sprechen dafür, sich bei der Impfstoffentwicklung weiterhin auf die Hemmung der CSA-VAR2CSA-Bindung zu konzentrieren.

Neben *var2csa* können im Genom plazentarer Erreger weitere hochregulierte Gene gefunden werden (vgl. Kapitel 5.1.4). Ihre Proteine könnten indirekt z.B. durch Stabilisierung der CSA-Bindung, VAR2CSA-Transport oder Signaltransduktion, an der Pathogenese beteiligt sein. Mehrgebärende Frauen besitzen im Vergleich zu Männern höhere Antikörpertiter gegen die Proteine PFB0115w, PFI1785w und PFD1140w, die bei plazentaren Erregern überexprimiert sind (Bertin et al. 2013, Francis et al. 2007, Fried et al. 2007, Tuikue Ndam et al. 2008). Die Funktion und Lokalisation dieser hochregulierten Proteine sind noch nicht bekannt. Weitere Studien sollten, z.B. durch die Zerstörung der jeweiligen Gene, ihre klinische Relevanz untersuchen.

Daneben gibt es einige Hinweise darauf, dass weitere Antikörper mit bisher unbekanntem Antigen existieren, die zur Hemmung der Bindung infizierter Erythrozyten in der Plazenta beitragen. Ein Beispiel hierfür ist der monoklonale Antikörper PAM1.4, der von immortalisierten B-Zellen exponierter Frauen gebildet wird, kaum mit der Oberfläche von VAR2CSA reagiert, die Bindung infizierter Erythrozyten an CSA jedoch deutlich hemmt (Barfod et al. 2007, Barfod et al. 2010). Weiterhin behält das Plasma von Frauen aus Mali seine bindungshemmende Aktivität auch nach vollständiger Entfernung aller bekannten inhibierenden Antikörper (gegen ID1-ID2a, DBL3, DBL4, DBL5) bei. Folglich gibt es unbekannt, bindungshemmende Antikörper, die gegen nicht getestete VAR2CSA-Varianten, gegen konformationelle Epitope des gesamten VAR2CSA-Proteins oder gegen nicht-VAR2CSA-Proteine gerichtet sein könnten (Doritchamou et al. 2016). Weitere Studien, die die Epitope dieser funktionellen Antikörper identifizieren, sind erforderlich.

6.1.2 Plazentare Inflammation

Die *P. falciparum*-Infektion bringt das antiinflammatorische und immunregulatorische Milieu der Plazenta durcheinander (Robinson und Klein 2012). Zur adäquaten Bekämpfung der Erreger reagiert der Körper mit einer proinflammatorischen Th-1 Immunantwort, die wiederum sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen mit negativen Folgen für die Schwangerschaft assoziiert ist (Kwak-Kim et al. 2005, Raghupathy 1997). Die immunologischen Vorgänge in der Plazenta beschreiben eine Gratwanderung zwischen Kontrolle der Infektion und Förderung der Pathogenese.

Monozyten tragen beispielsweise durch Phagozytose der infizierten Erythrozyten, Zytokinausschüttung und Antigenpräsentation zur Eliminierung der Erreger und gleichzeitig zur verstärkten Entzündungsreaktion bei (Chua et al. 2013). Sie werden unter anderem mithilfe opsonierender Antikörper zur Phagozytose stimuliert. Diese scheinen besonders gegen die VAR2CSA-Domänen DBL3 und DBL5 gerichtet zu sein (Lambert et al. 2014). Inwieweit opsonierende Antikörper gegen DBL3 und DBL5 nun positive (Eliminierung des Erregers) oder negative (verstärkte plazentare Inflammation) Auswirkungen haben, bleibt offen.

Natürliche Killerzellen nehmen, indem sie zwei entgegengesetzten Funktionen dienen (Schutz vor Infektion und Invasion vs. Implantation), eine besondere Stellung bei der plazentaren Immunologie ein (Zhang et al. 2016). Bei Malariainfektion sind sie wichtig zur Kontrolle und Beseitigung der Erreger und sezernieren hohe Konzentrationen von IFN γ (Bouyou-Akotet et al. 2004, Bouyou-Akotet und Mavoungou 2009, Ordi et al. 2001, Othoro et al. 2008). IFN γ ist in mehreren Studien mit Protektion vor Infektion und Komplikationen assoziiert (Chene et al. 2014, Megnekou et al. 2015b, Moore et al. 1999). Aufgrund hoher Kortisollevel wird die Aktivität von NK-Zellen jedoch gehemmt (Bouyou-Akotet et al. 2004, Mavoungou et al. 2005). Eine weitere wichtige Komponente des Fruchterhalts ist die Expression des nicht-polymorphen HLA-G auf der Trophoblastoberfläche (Hunt et al. 2005). Hohe Werte von NK-Zellen können mit verminderter HLA-G-Expression assoziiert werden, was negative Folgen für das Kind mit sich bringen könnte (Sartelet et al. 2005).

Das proinflammatorische Zytokin TNF liegt bei Infektion erhöht vor und fördert die Genese malariaassoziiertes Komplikationen (Fried et al. 1998a, Moormann et al. 1999, Rogerson et al. 2003c, Suguitan et al. 2003b). IFN γ kann sowohl mit Protektion als auch mit Pathogenese in Verbindung gebracht werden (Chene et al. 2014, Fried et al.

1998a, Megnekou et al. 2015b, Moore et al. 1999, Rogerson et al. 2003c). Das antiinflammatorische IL-10 behindert einerseits die Bekämpfung des Erregers, ist andererseits aber wichtig, um einer übermäßigen Inflammation entgegenzuwirken (Fievet et al. 2001, Fried et al. 1998a, Megnekou et al. 2015b, Suguitan et al. 2003b).

Bei malariainfizierten Schwangeren sind die peripheren und plazentaren Progesteronwerte signifikant niedriger als bei nicht infizierten (Megnekou et al. 2015b). Progesteron wirkt schwangerschaftserhaltend und wehenhemmend (Reister 2007). Ihm wird ein entzündungshemmender Effekt durch Aktivierung von Glucocorticoidrezeptoren und Unterdrückung der Th-1 Immunantwort zugeschrieben (Piccinni et al. 2000, Jones et al. 2010). Geringe Progesteronlevel könnten daher mitverantwortlich für malariaassoziierte Frühgeburten und erniedrigtes Geburtsgewicht sein.

Kortisol ist ein Stresshormon, das antiinflammatorisch wirkt (Kleine und Rossmann 2014). Bei plazentarer Infektion liegt es erhöht vor und ist mit einer hohen Parasitenlast assoziiert (Bayoumi et al. 2009, Bouyou-Akotet et al. 2004). Ob erhöhte Kortisolwerte eine Stressantwort auf die Malariainfektion darstellen oder ob sie wichtige Immunreaktionen unterdrücken und Frauen dadurch anfälliger für Infektionen machen, ist unklar (Rogerson et al. 2007b).

Die plazentare Entzündungsreaktion ist Grundlage für die Entstehung von erniedrigtem Geburtsgewicht bei Neugeborenen. Schätzungen zufolge sterben jährlich etwa 100.000 Kinder allein in Afrika an den Folgen von malariaassoziiertem erniedrigtem Geburtsgewicht (Guyatt und Snow 2004). Ein genaues Verständnis der pathogenetischen Mechanismen ist wichtig, um neue diagnostische und therapeutische Strategien zu entwickeln. Die pharmakologische Hemmung des Komplementfaktors C5a, der mit veränderten Angiogeneseparametern und mit für das Gestationsalter zu kleinen Babys assoziiert ist, kann beispielsweise in Tierversuchen eine Abstoßreaktion verhindern (Conroy et al. 2013, Girardi 2008). Die erhöhten Werte von VEGFR1 und löslichem Endoglin könnten als Biomarker zur Diagnosestellung genutzt werden (Gueneuc et al. 2017). Ein Zusammenhang zwischen plazentarer Malaria und Schwangerschaftshypertonie bzw. Präeklampsie wird diskutiert. Viele Gemeinsamkeiten, wie eine gestörte plazentare Durchblutung und die gleichen erhöhten Biomarker, können gefunden werden (Brabin und Johnson 2005, Gueneuc et al. 2017). In zwei Studien wird Malaria als Risikofaktor für die Entstehung von Präeklampsie, bedingt durch plazentare Entzündungsprozesse, beschrieben (Muehlenbachs et al. 2006, Ndao et al. 2009). Präeklampsie ist wiederum ein

Risikofaktor für fetale Wachstumsretardierung (Xiao et al. 2003). Bezüglich der Rolle der placentaren Hypoxie in der Entwicklung des erniedrigten Geburtsgewichts gibt es unterschiedliche Aussagen. Ausgehend von histopathologischen Veränderungen wie Basalmembranverdickung, Zell- und Fibrinablagerungen nehmen mehrere Autoren an, dass ein gestörter Blutfluss mit placentarer Hypoxie entscheidend zur Pathogenese beiträgt (Galbraith et al. 1980, Imamura et al. 2002, Rogerson et al. 2007b, Walter et al. 1982). Allerdings können Boeuf et al. in infizierten Plazenten keine erhöhten Hypoxiemarker finden. Sie vermuten daher weitere, ggf. unbekannte Ursachen für fetale Wachstumsretardierung (Boeuf et al. 2008). Auch mütterliche Anämie wird kontrovers diskutiert und in einigen Studien mit fetalen Entwicklungsstörungen assoziiert (Adam et al. 2011, Uneke 2008a, Kidanto et al. 2009), in anderen dagegen nicht (Achidi et al. 2005, Koura et al. 2012).

Mehrere Studien zeigen, dass der Transport von Aminosäuren und Glucose über die Plazenta bei Malariainfektion inflammationsbedingt gestört ist. Dies könnte mitursächlich für die intrauterine Wachstumsretardierung sein (Boeuf et al. 2013, Chandrasiri et al. 2014b, Dimasuay et al. 2017). Die genauen pathogenetischen Vorgänge und die Funktion anderer diaplazentarer Transportmechanismen (z.B. für Lipide und Vitamine) sollten weiter erforscht werden.

Neben Malariainfektion ist Malnutrition einer der Hauptrisikofaktoren für erniedrigtes Geburtsgewicht in Entwicklungsländern (Ilunga et al. 2016, Unger et al. 2015, Cates et al. 2017). Da Malnutrition ebenfalls das Immunsystem, die placentare Entwicklung und den Nährstofftransport beeinflussen könnte, gehen einige Autoren davon aus, dass sich die zwei Krankheitsbilder bezüglich der Entstehung von fetalen Wachstumsstörungen gegenseitig verstärken (McClure et al. 2014, Unger et al. 2016, Landis et al. 2009). Das malariaassoziierte Risiko für intrauterine Wachstumsretardierung ist bei unterernährten Frauen im Kongo beispielsweise zwei bis achtfach erhöht (Landis et al. 2009). In einer kürzlich erschienenen Metaanalyse können jedoch keine schlüssigen Beweise für synergistische Effekte gefunden werden (Cates et al. 2017).

In der Sub-Sahararegion entwickeln Schätzungen zufolge jährlich zwischen 200.000 und 500.000 Schwangere eine malariaassoziierte schwere Anämie (Steketee et al. 2001, Guyatt und Snow 2001, Uneke 2008a). Die Pathogenese der Malariaanämie ist vor allem bei Kindern gut untersucht und beinhaltet einen erhöhten Erythrozytenabbau und eine verminderte bzw. gestörte Erythrozytenneubildung (Perkins et al. 2011). Neben infizierten werden auch nicht-infizierte Erythrozyten, bedingt durch eine erhöhte

Makrophagenaktivität, eine verminderte Deformierbarkeit und eine Markierung mit Immunkomplexen und Komplementfaktoren, lysiert oder phagozytiert (Dondorp et al. 1999, Kai und Roberts 2008, Schofield und Grau 2005, Waitumbi et al. 2000). Hämoglobinablagerungen im Knochenmark führen direkt über Apoptoseinduktion der erythroiden Vorläuferzellen oder indirekt über Inflammediatoren zur Dyserythropoese (Awandare et al. 2011, Casals-Pascual et al. 2006, Keller et al. 2004, Lamikanra et al. 2009). Im Rahmen einer Inflammediationsreaktion bewirken Zytokine eine Suppression der Erythropoese (Ludwiczek et al. 2003, Perkins et al. 2011). IL-6, das bei Malariainfektion erhöht gemessen wird, fördert in der Leber die Bildung von Hepcidin, welches den Plasmaeisenspiegel senkt (Chandrasiri et al. 2014a, Ganz und Nemeth 2012, Nemeth et al. 2004, Nweneka et al. 2010). Bei Infektion mit *P. falciparum* können geringfügig erhöhte IL-6- und Hepcidinwerte eine ausgeprägte Hypoferrämie mit vermindertem Hb-Gehalt der Retikulozyten zur Folge haben. Erhöhte Hepcidinwerte weisen auf eine Hypoferrämie infolge einer Entzündungsanämie hin, sodass eine Eisensupplementierung in der Regel keine Verbesserung verspricht (de Mast et al. 2009).

6.1.3 Entwicklung einer natürlichen Immunität

Mit steigender Schwangerschaftszahl nimmt die Prävalenz peripherer und plazentarer Infektionen mit *P. falciparum* ab (vgl. Tab. 11). Diese Beobachtung gab den Hinweis, dass die erhöhte Anfälligkeit schwangerer Frauen für Malaria nicht nur auf eine „immunsuppressive“ Wirkung der Schwangerschaft, sondern vor allem auf eine fehlende Immunität zurückzuführen ist (Fried et al. 1998b). Während Frauen aus Regionen mit niedrigen Transmissionsraten durch die geringe Infektionsrate nur geringe Antikörperlevel aufweisen, entwickeln Frauen in Endemiegebieten mit zunehmender Parität Antikörper gegen CSA-selektive, VAR2CSA-tragende Parasitenstämme (Megnekou et al. 2005, Staalsoe et al. 2001). Diese Antikörper sind mit verminderter Parasitämie, Bindungshemmung und verminderten Komplikationen assoziiert (vgl. Tab. 12). Sie sind zudem kreuzreaktiv gegen weltweite Stämme wirksam und bilden sich innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne (Fried et al. 1998b, Maubert et al. 1999, O’Neil-Dunne et al. 2001, Staalsoe et al. 2001). Diese Beobachtungen sprechen für die Entwicklung eines Impfstoffes, der, indem er vor der ersten Schwangerschaft gegeben wird, die natürliche Immunitätsbildung vorwegnehmen könnte.

6.2 Immunogene Regionen von VAR2CSA als Impfstoffkandidaten

6.2.1 Der N-terminale Bereich als Basis eines Impfstoffes

Der N-terminale Bereich um DBL2 herum hat sich in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Ansätzen als vielversprechender Kandidat für einen Impfstoff erwiesen. Kinetische Analysen zeigen, dass Domänenkombinationen um DBL2 herum CSA mit ähnlich hoher Affinität und Spezifität binden können wie der gesamte extrazelluläre VAR2CSA-Bereich (Clausen et al. 2012, Dahlback et al. 2011, Srivastava et al. 2011). Natürlich gebildete Antikörper sind gegen N-terminale Multidomänen gerichtet (Dechavanne et al. 2015, Ndam et al. 2015), können die CSA-Bindung von Laborstämmen und plazentaren Isolaten hemmen (Doritchamou et al. 2016, Bigey et al. 2011) und korrelieren mit einer verminderten Prävalenz von erniedrigtem Geburtsgewicht bei Neugeborenen (Ndam et al. 2015). Schließlich weisen in Tierversuchen induzierte Antikörper gegen N-terminale Bereiche eine höhere Bindungshemmungsaktivität auf als Antikörper gegen andere Domänen (Bigey et al. 2011, Nielsen et al. 2009). Welche der N-terminal gelegenen Domänenkombinationen sich am besten für einen Impfstoff eignet, wird im Folgenden diskutiert.

NTS/DBL1-DBL2 (NTS-DBL1-ID1-DBL2)

Der NTS/DBL1-DBL2-Bereich wird von Srivastava et al. als minimaler CSA-Bindungsbereich des 3D7-Stammes definiert (Srivastava et al. 2011). Für den FCR3-Stamm kann die Bindungsaffinität allerdings aufgrund fehlender Kinetik nicht bestimmt werden (Clausen et al. 2012, Dahlback et al. 2011). Natürliche Antikörper gegen DBL1-DBL2 werden bei Mehrgebärenden in Benin im Vergleich zu Erstgebärenden signifikant erhöht vorgefunden und sind mit vermindertem Risiko für die Geburt untergewichtiger Kinder assoziiert (Ndam et al. 2015). Antikörper, die gegen den NTS-DBL2-Bereich des FCR3-Stammes gerichtet sind, können in verschiedenen Studien die Bindung homologer sowie heterologer Parasitenstämme hemmen (Bigey et al. 2011, Doritchamou et al. 2013, Nielsen et al. 2009, Nielsen et al. 2015). Auch Antikörper gegen den 3D7-Stamm hemmen die CSA-Bindung, wobei die Antikörper gegen 3D7-NTS-ID2a bei Nielsen et al. eine breitere Bindungshemmungsaktivität aufweisen als gegen NTS-DBL2 (Doritchamou et al. 2013, Nielsen et al. 2015). Clausen et al. können als Einzige keinen inhibitorischen Effekt der anti-DBL1-DBL2-

Antikörper nachweisen, finden aber eine hohe Bindungshemmung von Antikörpern gegen DBL1-ID2a/b (Clausen et al. 2012). Im Allgemeinen unterstützen die meisten Studien die Verwendung von NTS-DBL2 als Impfstoff gegen Malaria in der Schwangerschaft. Tab. 16 stellt die Studien, die für bzw. gegen die Einbeziehung von NTS-DBL2 in die Impfstoffentwicklung sprechen, gegenüber.

ID1-ID2a (ID1-DBL2-ID2a)

ID1-ID2a bindet Clausen et al. zufolge mit beinahe derselben Affinität wie das gesamte VAR2CSA an CSA (Clausen et al. 2012). Natürlich gebildete Antikörper gegen diesen Bereich können in einer Studie von Doritchamou et al. die Bindung homologer und partiell auch heterologer Parasitenstämme hemmen (Doritchamou et al. 2016). Babayakhanyan et al. untersuchen das Plasma von Männern und schwangeren Frauen aus Kamerun und stellen fest, dass anti-ID1-ID2a-Antikörper weder geschlechtsspezifisch noch paritätsabhängig vorliegen. Zum Zeitpunkt der Geburt kann zudem keine Korrelation zwischen Antikörperlevel und Fehlen von plazentarer Infektion gefunden werden (Babakhanyan et al. 2014). Diese Ergebnisse kommen überraschend und fordern eine weitere Abklärung des ansonsten vielversprechenden Impfstoffkandidaten. Unterschiedliche Resultate können auch durch verschiedene Laborverfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine und zur quantitativen Analyse von Antikörpern (ELISA, Durchflusszytometrie oder Luminex-Assay) begünstigt werden. Ndam et al. weisen darauf hin, dass die Ergebnisse von Babakhanyan et al. auf der Verwendung des Luminex-Assays mit schwierig zu interpretierenden Werten beruhen könnten (Ndam et al. 2015). Bei der Induktion von Antikörpern gegen ID1-ID2a des FRC3-Stammes kann eine effektive Bindungshemmung, auch von heterologen Stämmen (3D7, 7G8, HB3, N4708, p7201), nachgewiesen werden. Dagegen führt die Immunisierung von Tieren mit ID1-ID2a des 3D7-Stammes nicht zur Bildung von inhibierenden Antikörpern (Nielsen et al. 2015). Ein auf ID1-ID2a basierender Impfstoff, der den FCR3-Stamm als Grundlage hat, scheint durch gute präklinische Ergebnisse erfolgversprechend zu sein. Tab. 16 fasst Vor- und Nachteile von ID1-ID2a zusammen.

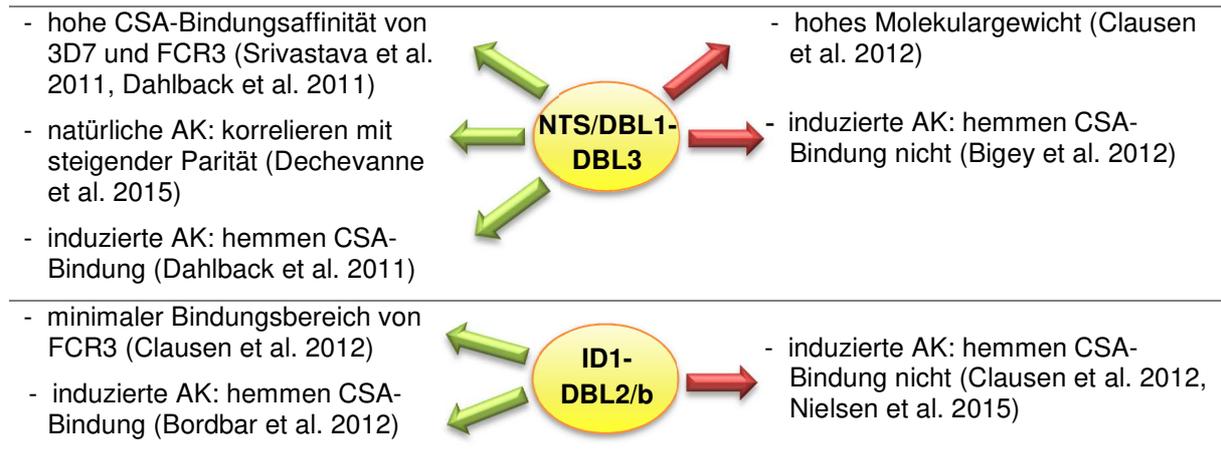
NTS/DBL1-DBL3 (NTS-DBL1-ID1-DBL2-ID2-DBL3) und ID1-DBL2b

NTS-DBL3 zeigt zunächst gute Voraussetzungen für einen Impfstoffkandidaten. Es bindet mit hoher Affinität an CSA, wobei DBL2-ID2b das Kernstück bildet und die Interaktion durch Beifügen der angrenzenden Domänen (DBL1, ID1 und DBL3)

nochmals verstärkt werden kann (Dahlback et al. 2011, Srivastava et al. 2011). Natürliche Antikörper gegen DBL1-DBL3 steigen mit zunehmender Schwangerschaftsanzahl an und induzierte Antikörper gegen NTS-DBL3 können die CSA-Bindung hemmen (Dechavanne et al. 2015, Dahlback et al. 2011). Allerdings ist NTS-DBL3 ein sehr großes Protein, was die Herstellung kompliziert und kostenintensiv macht. Clausen et al. zeigen, dass kleinere Fragmente, wie ID1-ID2a, bezüglich Affinität und Induktion von inhibitorischen Antikörpern ähnlich gute Ergebnisse aufweisen, sodass die Verwendung des gesamten NTS-DBL3-Bereiches unnötig erscheint (Clausen et al. 2012). Auf der Suche nach noch kleineren Bereichen definieren Clausen et al. ID1-DBL2b als minimale CSA-Bindungsregion (Clausen et al. 2012). ID1-DBL2 ruft aber nur in einer von drei Studien bindungshemmende Antikörper vor: Bordbar et al. finden hohe anti-ID1-DBL2-Antikörperlevel mit Hemmung der CSA-Bindung bei homologen sowie heterologen Stämmen, während Clausen et al. sowie Nielsen et al. keine inhibitorische Aktivität nachweisen können (Bordbar et al. 2012, Clausen et al. 2012, Nielsen et al. 2015). Da ID1-DBL2 eventuell zu klein ist, um eine ausreichende Immunantwort hervorzurufen, hat es sich nicht als Impfstoffkandidat etabliert. In Tab. 16 sind alle relevanten Studien zu NTS-DBL3 und ID1-DBL2 zusammengefasst.

Tab. 16 Gegenüberstellung von Studien, die die Einbeziehung N-terminaler VAR2CSA-Domänen in die Impfstoffentwicklung befürworten bzw. ablehnen

Studien/ Aspekte, die für die Einbeziehung in einen Impfstoff sprechen	Domänen von VAR2CSA	Studien/ Aspekte, die gegen die Einbeziehung in einen Impfstoff sprechen
<ul style="list-style-type: none"> - minimaler Bindungsbereich von 3D7 (Srivastava et al. 2011) - natürliche AK: assoziiert mit Geburtsgewicht↑ (Tuikue-Ndam et al. 2015) und Bindungshemmung (Bigey et al. 2011) - induzierte AK hemmen CSA-Bindung (Nielsen et al. 2009, 2015, Bigey et al. 2011, Doritchamou et al. 2013) 		<ul style="list-style-type: none"> - Bindungsaffinität für FCR3 kann nicht bestimmt werden (Dahlback et al. 2011, Clausen et al. 2012) - induzierte AK: hemmen CSA-Bindung nicht (Clausen et al. 2012)
<ul style="list-style-type: none"> - minimaler Bindungsbereich von FCR3 (Clausen et al. 2012) - natürliche AK: assoziiert mit Bindungshemmung (Doritchamou et al. 2016) - induzierte AK: hemmen CSA-Bindung (Clausen et al. 2012, Nielsen et al. 2015, FCR3) 		<ul style="list-style-type: none"> - natürliche AK: nicht assoziiert mit Parität und Fehlen von Infektion (Babakhanyan et al. 2014) - induzierte AK: hemmen CSA-Bindung nicht (Nielsen et al. 2015, 3D7)



AK - Antikörper

Impfstoffe am Ende von Phase I der klinischen Studien

Trotz zahlreicher Studien und verschiedenen Herangehensweisen ist der ideale Kandidat für einen Impfstoff noch nicht gefunden, der N-termiale VAR2CSA-Bereich scheint jedoch erfolgversprechend zu sein. Zwei Impfstoffe aus unterschiedlichen Arbeitsgruppen traten Anfang 2016 in die erste Phase der klinischen Studien ein: *PRIMALVAC* ist ein auf DBL1-DBL2 des 3D7-Stammes basierender, 105 kDa schwerer und in E-coli hergestellter VAR2CSA-Bereich; *PlacMa/Vac* dagegen basiert auf ID1-ID2a des FCR3-Stammes, einem 73 kDa schweren, in Drosophila Schneider-2 Zellen hergestellten VAR2CSA-Bereich (European.Vaccine.Initiative 2017, Nielsen 2017a). Beide Impfstoffe stehen am Ende von Phase I, in der die Verträglichkeit der Impfstoffe an nicht-exponierten europäischen (Phase Ia) und exponierten afrikanischen (Phase Ib) Probanden getestet wurde. *PlacMa/Vac* ist laut aktuellen Angaben sicher und wird gut toleriert (Nielsen 2017b). Für *PRIMALVAC* liegen noch keine Daten vor (European.Vaccine.Initiative 2017). In Phase II wird eine Gruppe von afrikanischen Frauen vor der ersten Schwangerschaft mit einem der Impfstoffe immunisiert und in Langzeitstudien klinische Parameter (z.B. Fehl- und Frühgeburt, intrauterine Wachstumsretardierung, erniedrigtes Geburtsgewicht, peri-/neonataler Tod) als primäre Endpunkte und parasitologische Messungen als sekundäre Endpunkte untersucht (Pehrson et al. 2017a). Die zwei Arbeitsgruppen einigten sich zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf ein einheitliches Studiendesign und gleiche Labormethoden (u.a. quantitative Antikörperanalyse mittels ELISA und Bindungshemmungsassay mittels 69-well-Petrischalen) (Chene et al. 2016).

Ob DBL1-DBL2 bzw. ID1-ID2a als Antigene ausreichen, um eine schützende Immunität gegen verschiedene plazentare Stämme aufzubauen, werden die

Ergebnisse der Phase II- /III-Studien in den folgenden Jahren zeigen. Dennoch sollte bereits jetzt über Alternativen und Optimierungsansätze nachgedacht werden, zumal, da auch die N-terminalen Bereiche zu einem großen Teil aus variablen Sequenzen bestehen. Tutterrow et al. gehen davon aus, dass die natürliche Immunität gegen plazentare Malaria auf hohen Antikörpertitern gegen multiple VAR2CSA-Domänen und -Varianten beruht (Tutterrow et al. 2012b). Die Kombination der N-terminalen Multidomänen mit weiteren Immunogenen von VAR2CSA oder von mehreren Genotypen könnte die Wirksamkeit eines Impfstoffes steigern. Welche VAR2CSA-Domänen und -Varianten sich dafür am besten eignen und inwieweit diese Ansätze sinnvoll und erfolgversprechend sind, wird im Folgenden diskutiert.

6.2.2 Kombination mit weiteren Bereichen von VAR2CSA

DBL3 und DBL5

Sowohl DBL3 als auch DBL5 enthalten Bindungsstellen für CSA (vgl. Tab. 6). Allerdings sind Bindungsaffinität und -spezifität im Vergleich zum gesamten VAR2CSA deutlich erniedrigt (Khunrae et al. 2010, Srivastava et al. 2011, Resende et al. 2009). Bei der Analyse der natürlich gebildeten Antikörper von mehrgebärenden Frauen aus Endemiegebieten fällt auf, dass Antikörper gegen DBL3 und DBL5 häufig signifikant erhöht vorliegen (vgl. Tab. 13). In einigen Studien kann zudem ein Zusammenhang zwischen erhöhten anti-DBL3- bzw. -DBL5-Antikörpern und verminderter plazentarer Infektion, erhöhtem Geburtsgewicht und CSA-Bindungshemmung hergestellt werden (Ndam et al. 2015, Salanti et al. 2004, Tuikue Ndam et al. 2006, Doritchamou et al. 2016, Mayor et al. 2013). Monoklonale Antikörper aus immortalisierten B-Zellen exponierter Frauen erkennen die DBL3- und DBL5-Domäne (Barfod et al. 2007). In Tierversuchen induzierte Antikörper gegen diese Domänen weisen eine hohe Reaktivität zur VAR2CSA-Oberfläche, auch von heterologen Stämmen, auf (vgl. Tab. 14). Sie erkennen folglich kreuzreaktiv verschiedene VAR2CSA-Varianten. Bei weiterer Untersuchung der anti-DBL3- und -DBL-5-Antikörper stellt sich jedoch heraus, dass sie die Proteinoberfläche zwar erkennen, die CSA-Bindung aber abgesehen von wenigen Ausnahmen nicht hemmen können (vgl. Tab. 14). Dies lässt zwei Vermutungen zu: I) DBL3 und DBL5 sind hochimmunogen, sie induzieren aber zur Beschäftigung des Immunsystems funktionslose Antikörper und lenken es so von funktionell wichtigeren Bereichen, wie beispielsweise dem N-terminalen Bereich, ab. II) Anti-DBL3- und anti-DBL5-Antikörper tragen auf andere Weise als der Bindungs-

hemmung, beispielsweise durch Opsonierung und Monozytenaktivierung, zur Eliminierung der Erreger bei. Lambert et al. zeigen, dass opsonierende Antikörper vor allem DBL3 und DBL5 erkennen (Lambert et al. 2014). Opsonierung mit Monozytenaktivierung und Phagozytose als Folge ist eine wichtige Komponente zur Bekämpfung der plazentaren Infektion und korreliert in einigen Studien mit verminderten malariaassoziierten Komplikationen (Ataide et al. 2011, Feng et al. 2009, Jaworowski et al. 2009). Auf der anderen Seite kann eine übermäßige Monozytenaktivierung zu einer verstärkten plazentaren Entzündungsreaktion führen. Hohe Monozytenzahlen und proinflammatorische Zytokine wie TNF werden in zahlreichen Studien mit negativen Folgen für Mutter und Kind in Verbindung gebracht (Muehlenbachs et al. 2010, Rogerson et al. 2003b, Rogerson et al. 2003a, Shulman et al. 2001, Menendez et al. 2000, Ordi et al. 2001, Fried et al. 1998a, Rogerson et al. 2003c). Tab. 17 gibt einen Überblick über die Studien zu DBL3 und DBL5.

Zusammenfassend kann man sagen, dass anti-DBL3- und anti-DBL5-Antikörper die Kreuzreaktivität eines Impfstoffes erhöhen und durch Opsonierung und Phagozytose an einer weiteren Stelle angreifen könnten. Die Tatsache, dass die Antikörper die CSA-Bindung jedoch nicht hemmen, sie gegebenenfalls funktionslos sind und sie durch Opsonierung die Inflamationsreaktion verstärken könnten, spricht jedoch eher gegen die Kombination von N-terminalen Domänen mit DBL3 oder DBL5.

DBL4

DBL4 ist eine von nur zwei Domänen, die keine Bindungsstellen für CSA aufweisen, (vgl. Tab. 6) und der minimale CSA-Bindungsereich wird um DBL2 herum in der N-terminalen VAR2CSA-Region lokalisiert (Clausen et al. 2012, Dahlback et al. 2011, Srivastava et al. 2011). Umso überraschender sind die Ergebnisse, dass sowohl natürliche als auch induzierte Antikörper die CSA-Bindung homologer und heterologer Parasitenstämme hemmen können (Doritchamou et al. 2016, Avril et al. 2011a, Khunrae et al. 2010, Magistrado et al. 2011, Nielsen et al. 2009, Pinto et al. 2011, Saveria et al. 2013). Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass die höher geordnete VAR2CSA-Struktur DBL4 in die Nähe der CSA-Bindungstasche bringt, sodass die Bindung von Antikörpern den Zugang zu der Tasche versperrt (Khunrae und Higgins 2010). Sterische Hindernisse und/oder die Aufhebung der nativen Domänenorganisation durch anti-DBL4-Antikörper könnten weitere Ursachen sein (Gangnard et al. 2015). Ditlev et al. und Gangnard et al. untersuchen mithilfe von

„Epitope Mapping“-Studien kleinere, besonders immunogene Bereiche innerhalb von DBL4. Allerdings können sie keine Epitope finden, die mit Bindungshemmung assoziiert sind (Ditlev et al. 2012, Gangnard et al. 2015). Die Bindungshemmung kann eher noch verstärkt werden, indem zu DBL4 eine benachbarte Interdomäne (ID4) hinzugefügt wird (Magistrado et al. 2011). Dahlback et al. und Nieslen et al. bestätigen die inhibierende Wirkung der Antikörper gegen DBL4-ID4 (Dahlback et al. 2011, Nielsen et al. 2015). DBL4 gilt zudem als am wenigsten variable Domäne von VAR2CSA (Bockhorst et al. 2007). In Tab. 17 werden die Studien zu DBL4 einander gegenübergestellt.

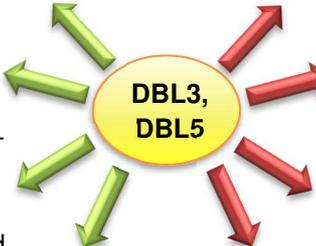
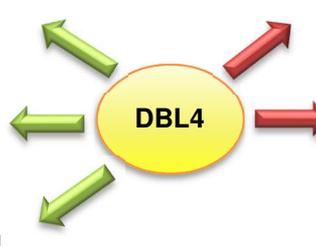
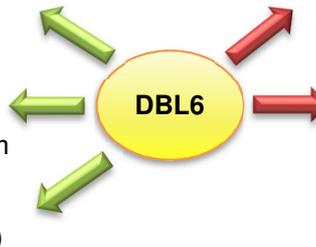
Das Beifügen von DBL4 bzw. DBL4-ID4 zu N-terminal gelegenen Domänen könnte die bindungshemmende Wirkung eines Impfstoffes potenzieren, da die Antikörper an zwei verschiedenen Stellen angreifen: an der minimalen Bindungsregion und an der 3D-Struktur des Proteins. Die Kopplung mit DBL4 ist eine mögliche Option bei unzureichender Wirksamkeit der sich in klinischer Erprobung befindenden Impfstoffe.

DBL6

Wie DBL3 und DBL5 bindet auch DBL6 CSA mit geringerer Affinität und Spezifität als das gesamte Protein (Tab. 6). Natürliche Antikörper gegen DBL6 liegen bei Mehrgebärenden zum Teil erhöht vor und können mit verminderter plazentarer Infektion, erhöhtem Geburtsgewicht und Gestationsalter assoziiert werden (Mayor et al. 2013, Oleinikov et al. 2007, Tuikue Ndam et al. 2006). Induzierte Antikörper erkennen die VAR2CSA-Oberfläche in den meisten Studien gut, können die CSA-Bindung aber nur in zwei Studien von Fernandez et al. hemmen (Tab. 14). DBL6 gilt mit sieben variablen Blöcken als am wenigsten konservierte Domäne von VAR2CSA. Bei genauerer Untersuchung dieser Blöcke fällt jedoch auf, dass sie aus einer limitierten Anzahl an Konsensussequenzen, also ähnlichen oder identischen Sequenzmustern, bestehen (Badaut et al. 2010). Deloron et al. und Gangnard et al. finden heraus, dass Antikörper aus gepooltem Plasma vor allem die variablen Blöcke 1 und 5 (VB1, VB5) von verschiedenen Parasitenstämmen erkennen können. VB1 und VB5 enthalten also kreuzreaktive Epitope. Diese Epitope könnten zur Herstellung eines Peptid-Impfstoffes (als lineares Polypeptid oder multiples antigenes Peptid) genutzt werden (Deloron et al. 2013, Gangnard et al. 2013). Tab. 17 fasst Studien zu DBL6 zusammen.

Durch Kombination der N-terminalen Multidomänen mit solchen Peptiden könnte die Kreuzreaktivität des Impfstoffes gesteigert werden. Dies bedarf jedoch noch weiterer Forschung, insbesondere bezüglich der Funktionalität der Antikörper.

Tab. 17 Gegenüberstellung von Studien, die die Einbeziehung C-terminaler VAR2CSA-Domänen in die Impfstoffentwicklung befürworten bzw. ablehnen

Studien/ Aspekte, die für die Einbeziehung in einen Impfstoff sprechen	Domänen von VAR2CSA	Studien/ Aspekte, die gegen die Einbeziehung in einen Impfstoff sprechen
<ul style="list-style-type: none"> - besitzen CSA-Bindungsstellen (Tab. 6) - natürliche AK: z.T. erhöht (Tab. 13), assoziiert mit plazentarer Infektion↓ (Tuikue Ndam et al. 2006, 2015), Geburtsgewicht↑ (<i>DBL3</i>: Mayor et al. 2013, <i>DBL5</i>: Salanti et al. 2004), hemmen CSA-Bindung (Doritchamou et al. 2016) - monoklonale und opsonierende AK: erkennen DBL3, DBL5 (Barfod et al. 2007, Lambert et al. 2014) - induzierte AK: erkennen kreuzreaktiv VAR2CSA (Tab. 14), hemmen CSA-Bindung (<i>DBL3</i>: Salanti et al. 2010, <i>DBL5</i>: Saveria et al. 2013 Fernandez et al. 2010) 		<ul style="list-style-type: none"> - geringe Affinität und Spezifität der Bindung (Srivastava et al. 2010, Khunrae et al. 2009, Rsende et al. 2009) - natürliche Antikörper: ggf. funktionslos zur Ablenkung des Immunsystems (Pinto et al. 2011) - opsonierende AK: aktivieren Monozyten und können so plazentare Inflammation verstärken (Rogerson et al. 2003a, b) - induzierte AK: hemmen CSA-Bindung im Allgemeinen nicht (Tab.13)
<ul style="list-style-type: none"> - wenig variabel (Bockhorst et al. 2004), indirekt an CSA-Bindung beteiligt (Gangnard et al. 2015) - natürliche AK: assoziiert mit Bindungshemmung (Doritchamou et al. 2016) - induzierte AK: hemmen CSA-Bindung (Tab. 14, Magistrado et al. 2011, Khunrae et al. 2010), <i>DBL4-ID4</i> (Dahlback et al. 2011, Nieslen et al. 2015, Magistrado et al. 2011) 		<ul style="list-style-type: none"> - besitzt keine CSA-Bindungsstellen (Tab. 6) - induzierte AK: z.T. keine Erkennung von VAR2CSA, keine Hemmung der CSA-Bindung (vgl. Tab. 14)
<ul style="list-style-type: none"> - besitzt CSA-Bindungsstellen (Tab. 6), geteilte variable Struktur motive (Gangnard et al. 2013, 2015, Deloron et al. 2013, Badeaut et al. 2010) - natürliche AK: z.T. erhöht (Tab. 13), assoziiert mit verminderter plazentarer Infektion (Tuikue Ndam et al. 2006), erhöhtem Geburtsgewicht und Gestationsalter (Mayor et al. 2013) - induzierte Antikörper: erkennen VAR2CSA-Oberfläche (Tab. 14), hemmen CSA-Bindung (Fernandez et al. 2008, 2010) 		<ul style="list-style-type: none"> - geringe Affinität und Spezifität der Bindung (Srivastava et al. 2010, Khunrae et al. 2009, Resende et al. 2009), sehr variabel (Badeaut et al. 2010, Gangnard et al. 2013) - induzierte AK: i.d.R. keine Bindungshemmung (Tab. 14)

6.2.3 Kombination von verschiedenen Genotypen

Trotz vergleichsweise guter Konservierung des var2csa-Gens besitzt VAR2CSA zahlreiche Polymorphismen (Trimnell et al. 2006). Ein Impfstoff, basierend auf nur einem Genotyp, könnte somit eine unzureichende Immunantwort mit stammesspezifischen Antikörpern hervorrufen oder nur in einer bestimmten Region wirksam sein.

Einige Studien belegen, dass natürlich gebildete Antikörper kreuzreaktiv wirksam sind und die CSA-Bindung verschiedener Stämme hemmen (Fried et al. 1998b, Ricke et al. 2000, Hommel et al. 2010). Ob diese Kreuzreaktivität durch Immunreaktion auf konservierte oder geteilte variable VAR2CSA-Bereiche oder durch häufige Infektionen mit unterschiedlichen VAR2CSA-Varianten hervorgerufen wird, ist noch nicht geklärt (Dahlback et al. 2006, Hommel et al. 2010). Auch die in Tierversuchen induzierten Antikörper gegen die Impfstoffkandidaten DBL1-DBL2 und ID1-ID2a können kreuzreaktiv heterologe Laborstämme und plazentare Isolate hemmen, allerdings zu einem geringeren Grad als die homologen Stämme (Bigey et al. 2011, Doritchamou et al. 2013, Nielsen et al. 2015). Doritchamou et al. kommen zu dem Ergebnis, dass die Kombination von anti-NTS-DBL2-Antikörpern gegen den 3D7-Stamm und den FCR3-Stamm zu einer stärkeren heterologen Bindungshemmung führt als Antikörper gegen nur einen der Stämme (Doritchamou et al. 2013). Die breitere Wirkung lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass durch die Kombination von 3D7 und FCR3 beide Varianten des dimorphen Areals, das innerhalb von DBL2 gefunden wurde, abgedeckt sind (Sander et al. 2009). Kürzlich wurde ein weiteres, deutlich größeres dimorphes Areal in der Interdomäne 1 (ID1) gefunden. Da ID1 innerhalb der führenden Impfstoffkandidaten DBL1-DBL2 und ID1-ID2a liegt, hat diese Erkenntnis Auswirkungen auf die Impfstoffentwicklung (Doritchamou et al. 2015). Ein Impfstoff, der beispielsweise sowohl den FCR3- als auch den 3D7-Stamm oder sowohl Cluster1 als auch Cluster2 des dimorphen Areals in ID1 enthält, könnte zu einer breiteren Immunantwort führen. Die Verbesserung der Impfstoffwirkung durch Kombination mehrerer Genotypen sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden. Zudem sollten polymorphe Areale innerhalb des N-terminalen VAR2CSA-Bereiches genauer analysiert werden.

Eine weitere Frage ist, ob geographisch unterschiedliche Orte unterschiedliche Impfstoffe je nach zugrundeliegenden VAR2CSA-Hauptvarianten erfordern. Beim

Vergleich weltweiter Parasitenstämme stellen mehrere Autoren fest, dass der Polymorphismus begrenzt ist und auf ähnlichen, geteilten Sequenzmotiven beruht (Bockhorst et al. 2007, Bordbar et al. 2014, Trimnell et al. 2006, Hommel et al. 2010). Enthält ein Impfstoff diese weltweit geteilten variablen Sequenzen, besteht die Hoffnung, dass auch er eine breite, stammesübergreifende Immunantwort hervorruft. Bei starker geographischer Variabilität des Impfstoff Erfolgs sollte jedoch über die Entwicklung regionsspezifischer Impfstoffe nachgedacht werden.

6.2.4 Verwenden von virusartigen Partikeln als Träger für einen Impfstoff

Das große Zeitintervall zwischen Impfung (vor Pubertät) und erstmaligem Kontakt mit plazentaren *P. falciparum*-Stämmen in der Schwangerschaft setzt eine lang anhaltende Wirkung des Impfstoff-Gedächtnisses voraus. Daher muss ein Impfstoff hohe IgG-Titer und bleibende Plasmazellen induzieren. Die Impfstoffe in Phase I verwenden lösliche VAR2CSA-Proteinfragmente (DBL1-DBL2 und ID1-ID2a) zusammen mit den Adjuvantien Alhydrogel bzw. GLA (glycopyransyl lipid adjuvant) (ClinicalTrials.gov 2016b, ClinicalTrials.gov 2016a). Sollte die Kombination aus löslichem Protein und Adjuvans keine ausreichende Immunreaktion bewirken, gibt es die Überlegung, die VAR2CSA-Proteine an virusartige Partikel (virus-like particles, VLPs) zu binden (Thrane et al. 2015). VLPs rufen eine potente humorale und zelluläre Immunantwort hervor und zeichnen sich durch eine hohe Effektivität, Sicherheit und kostengünstige Produktion aus (Kushnir et al. 2012). Die Kopplung von VAR2CSA-Antigenen an VLPs könnte dabei helfen, eine ausreichende, langanhaltende Immunreaktion bei möglichst geringer Dosis und Immunisierungsanzahl zu erreichen. Diese Option wird von Pehrson et al. in Betracht gezogen, sollten die Antikörperlevel in Phase I über ein Jahr zu gering sein (Pehrson et al. 2017a).

6.3 Weitere Herausforderungen und Blick in die Zukunft

Neben den bereits genannten, insbesondere die Größe und den Polymorphismus von VAR2CSA betreffenden Problemen ergeben sich bei der Impfstoffentwicklung weitere Herausforderungen. Darunter fallen besonders logistische Probleme: die Zielgruppe des Impfstoffes (Mädchen vor der Pubertät) ist schwierig zu erreichen und muss bis zum Ende der ersten Schwangerschaft über eine lange Zeitspanne hinweg

nachverfolgt werden. Die ersten Ergebnisse der primären und sekundären Endpunkte stehen erst nach Jahren zur Verfügung und sind nur dann verwendbar, wenn die Frau tatsächlich während der Schwangerschaft mit *P. falciparum* infiziert wurde (Pehrson et al. 2017a). Die gleichzeitige prophylaktische Einnahme von Sulfadoxin-Pyrimethamin erschwert die Interpretation der Daten und erfordert eine große Anzahl an Studienteilnehmerinnen. Zudem ist nicht geklärt, ab welchem Endemiegrad eine Impfung sinnvoll ist (Tuikue-Ndam und Deloron 2015). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass der Impfstoff nicht gegen Infektion mit *P. vivax* während der Schwangerschaft wirksam ist. Diese kann auch weiterhin in der Schwangerschaft zu Komplikationen wie Früh-, Fehl- und Totgeburten, erniedrigtem Geburtsgewicht und mütterlicher Anämie führen (Anstey et al. 2012).

Der Impfstoff *PlacMaIVac* (*PAMVAC*) wurde kürzlich als sicher und gut verträglich bei gesunden europäischen und exponierten afrikanischen Probanden eingestuft und die Vorbereitungen auf Phase II laufen (Nielsen 2017b). Wenn zusätzlich in Phase I eine ausreichende und dauerhafte Immunantwort hervorgerufen wird (durchschnittlich mindestens 50% Hemmung der Parasitenbindung), sollten die ersten Phase II Effektivitätsstudien in fünf Jahren im vollem Gange sein (Pehrson et al. 2017a).

Box 9

Der N-terminale VAR2CSA-Bereich als Impfstoffgrundlage

1. DBL1-DBL2 und ID1-ID2a sind Bestandteil der minimalen CSA-Bindungsregion, natürliche und induzierte Antikörper sind mit Bindungshemmung assoziiert (Bigey et al. 2011, Srivastava et al. 2011, Clausen et al. 2012, Nielsen et al. 2015, Doritchamou et al. 2016).
2. DBL1-DBL3 induziert eine gute Immunantwort, ist jedoch sehr groß (Dahlback et al. 2011, Clausen et al. 2012), ID1-DLB2 ist klein, weist aber in einigen Studien keine ausreichende Immunantwort auf (Clausen et al. 2012, Nielsen et al. 2015).
3. Zwei Impfstoffe befinden sich in Phase I der klinischen Studien:
PRIMALVAC: DBL1-DBL2 des 3D7-Stammes (European Vaccine Initiative 2017).
PlacMaIVac: ID1-ID2a des FCR3-Stammes (Nielsen 2017a).

Verbesserungsoptionen bei unzureichender Impfstoffwirkung

1. Die Kombination mit DBL3 und DBL5 könnte zwar die Kreuzreaktivität, nicht aber die Bindungshemmung verstärken.
2. Die Kombination mit DBL4 könnte die Bindungshemmungsaktivität verstärken und stellt eine mögliche Verbesserungsoption dar.
3. Die Kombination mit geteilten variablen Peptiden von DBL6 könnte die Kreuzreaktivität erhöhen, benötigt jedoch weitere Forschung.
4. Die Kombination mehrerer N-terminaler Genotypen (FCR3- und 3D7-Stamm; Cluster1 und Cluster2 des dimorphen Areals in ID1) könnte die kreuzreaktive Bindungshemmung verstärken und stellt eine gute Optimierungsoption dar (Doritchamou et al. 2013, 2015).
5. Die Bindung der Impfstoff-Antigene an virusartige Partikel (VLPs) könnte zu einer potenteren und länger anhaltenden Immunreaktion führen (Pehrson et al. 2017).

7 Schlussfolgerung

Die auf den N-terminalen Bereichen von VAR2CSA basierenden Impfstoffe haben in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse gezeigt, die nun in klinischen Studien überprüft werden.

Sollte die Immunreaktion unzureichend sein, gibt es verschiedene Verbesserungsoptionen. Die N-terminalen VAR2CSA-Bereiche könnten (I) mit weiteren Domänen, insbesondere DBL4, kombiniert werden, um eine verstärkte Hemmung der VAR2CSA-Bindung an CSA zu generieren, (II) aus mehreren Genotypen zusammengesetzt werden, um eine breitere Kreuzreaktivität zu erlangen und (III) an virusartige Partikel (VLP) gebunden werden, um eine potentere und länger andauernde Immunantwort hervorzurufen.

Ergebnisse aus Tests bisheriger Malariaimpfstoffe waren eher ernüchternd. Auch der am weitesten entwickelte Impfstoff RTS,S für Kinder zeigt eher eine geringe Effektivität und einen schnellen Wirkverlust über die Jahre (Mahmoudi und Keshavarz 2017). Der Polymorphismus von VAR2CSA und der Antigen-Drift zwischen verschiedenen Parasiten könnten ungeahnte Auswirkungen auf den Erfolg der Impfstoffe haben. Ebenso ist fraglich, ob die in Tierversuchen erzeugte Immunantwort auch im Menschen abläuft.

Die Hoffnung, dass ein Impfstoff wirksam vor den negativen Folgen einer *P. falciparum*-Infektion in der Schwangerschaft schützen kann, wird jedoch durch gute Grundlagenforschung, Beobachtung der natürlichen Immunitätsentwicklung, zahlreiche präklinische Studien und verschiedene Möglichkeiten zur Impfstoffoptimierung bekräftigt. Bei Erfolg könnte die Entwicklung weiterer syndromaler Impfstoffe, beispielsweise gegen zerebrale Malaria, in Betracht gezogen werden.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GD, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME, Rochford R, Meshnick SR, Rogerson SJ. 2003. Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression. *J Immunol*, 170 (5):2759-2764.
- Achidi EA, Kuoh AJ, Minang JT, Ngum B, Achimbom BM, Motaze SC, Ahmadou MJ, Troye-Blomberg M. 2005. Malaria infection in pregnancy and its effects on haemoglobin levels in women from a malaria endemic area of Fako Division, South West Province, Cameroon. *J Obstet Gynaecol*, 25 (3):235-240.
- Achur RN, Valiyaveetil M, Gowda DC. 2003. The low sulfated chondroitin sulfate proteoglycans of human placenta have sulfate group-clustered domains that can efficiently bind Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Biol Chem*, 278 (13):11705-11713.
- Achur RN, Valiyaveetil M, Alkhalil A, Ockenhouse CF, Gowda DC. 2000. Characterization of proteoglycans of human placenta and identification of unique chondroitin sulfate proteoglycans of the intervillous spaces that mediate the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to the placenta. *J Biol Chem*, 275 (51):40344-40356.
- Achur RN, Kakizaki I, Goel S, Kojima K, Madhunapantula SV, Goyal A, Ohta M, Kumar S, Takagaki K, Gowda DC. 2008. Structural interactions in chondroitin 4-sulfate mediated adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes in human placenta during pregnancy-associated malaria. *Biochemistry*, 47 (47):12635-12643.
- Ada GL. 1991. The ideal vaccine. *World J Microbiol Biotechnol*, 7 (2):105-109.
- Adam I, IE AE, Salih I, Elbashir MI. 2005. Submicroscopic Plasmodium falciparum infections during pregnancy, in an area of Sudan with a low intensity of malaria transmission. *Ann Trop Med Parasitol*, 99 (4):339-344.
- Adam I, Elhassan EM, Haggaz AE, Ali AA, Adam GK. 2011. A perspective of the epidemiology of malaria and anaemia and their impact on maternal and perinatal outcomes in Sudan. *J Infect Dev Ctries*, 5 (2):83-87.
- Adebami OJ, Owa JA, Oyedeji GA, Oyelami OA, Omoniyi-Esan GO. 2007. Associations between placental and cord blood malaria infection and fetal malnutrition in an area of malaria holoendemicity. *Am J Trop Med Hyg*, 77 (2):209-213.
- Adegnika AA, Verweij JJ, Agnandji ST, Chai SK, Breitling LP, Ramharter M, Frolich M, Issifou S, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. 2006. Microscopic and sub-microscopic Plasmodium falciparum infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. *Am J Trop Med Hyg*, 75 (5):798-803.
- Agan T, Ekabua J, Udoh A, Ekanem E, Efiok E, Mgbekem M. 2010. Prevalence of anemia in women with asymptomatic malaria parasitemia at first antenatal care visit at the University of Calabar Teaching Hospital, Calabar, Nigeria. *Int J Womens Health*, 2:229-233.
- Agnandji S, Lell B, Fernandes J. 2015. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial (Clinical Trials Partnership, RTS/S). *Lancet*, 386 (9988):31-45.
- Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. 2014. Submicroscopic infection of placenta by Plasmodium produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malar J*, 13:122.

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. 2011. *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Aufl. New York: John Wiley & Sons
- Alifrangis M, Nag S, Schousboe ML, Ishengoma D, Lusingu J, Pota H, Kavishe RA, Pearce R, Ord R, Lynch C, Dejene S, Cox J, Rwakimari J, Minja DT, Lemnge MM, Roper C. 2014. Independent origin of plasmodium falciparum antifolate super-resistance, Uganda, Tanzania, and Ethiopia. *Emerg Infect Dis*, 20 (8):1280-1286.
- Alkhalil A, Achur RN, Valiyaveetil M, Ockenhouse CF, Gowda DC. 2000. Structural requirements for the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate proteoglycans of human placenta. *J Biol Chem*, 275 (51):40357-40364.
- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*, 5 (3):266-271.
- Amaratunga C, Lopera-Mesa TM, Brittain NJ, Cholera R, Arie T, Fujioka H, Keefer JR, Fairhurst RM. 2011. A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to Plasmodium falciparum malaria. *PLoS One*, 6 (4):e14798.
- Ampomah P, Stevenson L, Ofori MF, Barfod L, Hviid L. 2014a. B-cell responses to pregnancy-restricted and -unrestricted Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 antigens in Ghanaian women naturally exposed to malaria parasites. *Infect Immun*, 82 (5):1860-1871.
- Ampomah P, Stevenson L, Ofori MF, Barfod L, Hviid L. 2014b. Kinetics of B cell responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 in Ghanaian women naturally exposed to malaria parasites. *J Immunol*, 192 (11):5236-5244.
- Amulic B, Salanti A, Lavstsen T, Nielsen MA, Deitsch KW. 2009. An upstream open reading frame controls translation of var2csa, a gene implicated in placental malaria. *PLoS Pathog*, 5 (1):e1000256.
- Andersen P, Nielsen MA, Resende M, Rask TS, Dahlback M, Theander T, Lund O, Salanti A. 2008. Structural insight into epitopes in the pregnancy-associated malaria protein VAR2CSA. *PLoS Pathog*, 4 (2):e42.
- Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN. 2012. Plasmodium vivax: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Adv Parasitol*, 80:151-201.
- Ataide R, Mwapasa V, Molyneux ME, Meshnick SR, Rogerson SJ. 2011. Antibodies that induce phagocytosis of malaria infected erythrocytes: effect of HIV infection and correlation with clinical outcomes. *PLoS One*, 6 (7):e22491.
- Ataide R, Hasang W, Wilson DW, Beeson JG, Mwapasa V, Molyneux ME, Meshnick SR, Rogerson SJ. 2010. Using an improved phagocytosis assay to evaluate the effect of HIV on specific antibodies to pregnancy-associated malaria. *PLoS One*, 5 (5):e10807.
- Ataide R, Murillo O, Dombrowski JG, Souza RM, Lima FA, Lima GF, Hristov AD, Valle SC, Di Santi SM, Epiphanyo S, Marinho CR. 2015. Malaria in Pregnancy Interacts with and Alters the Angiogenic Profiles of the Placenta. *PLoS Negl Trop Dis*, 9 (6):e0003824.
- Avril M, Cartwright MM, Hathaway MJ, Smith JD. 2011a. Induction of strain-transcendent antibodies to placental-type isolates with VAR2CSA DBL3 or DBL5 recombinant proteins. *Malar J*, 10:36.
- Avril M, Gamain B, Lepolard C, Viaud N, Scherf A, Gysin J. 2006. Characterization of anti-var2CSA-PfEMP1 cytoadhesion inhibitory mouse monoclonal antibodies. *Microbes Infect*, 8 (14-15):2863-2871.
- Avril M, Hathaway MJ, Cartwright MM, Gose SO, Narum DL, Smith JD. 2009. Optimizing expression of the pregnancy malaria vaccine candidate, VAR2CSA in Pichia pastoris. *Malar J*, 8:143.

- Avril M, Hathaway MJ, Srivastava A, Dechavanne S, Hommel M, Beeson JG, Smith JD, Gamain B. 2011b. Antibodies to a full-length VAR2CSA immunogen are broadly strain-transcendent but do not cross-inhibit different placental-type parasite isolates. *PLoS One*, 6 (2):e16622.
- Avril M, Kulasekara BR, Gose SO, Rowe C, Dahlback M, Duffy PE, Fried M, Salanti A, Misher L, Narum DL, Smith JD. 2008. Evidence for globally shared, cross-reacting polymorphic epitopes in the pregnancy-associated malaria vaccine candidate VAR2CSA. *Infect Immun*, 76 (4):1791-1800.
- Avril M, Cartwright MM, Hathaway MJ, Hommel M, Elliott SR, Williamson K, Narum DL, Duffy PE, Fried M, Beeson JG, Smith JD. 2010. Immunization with VAR2CSA-DBL5 recombinant protein elicits broadly cross-reactive antibodies to placental *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect Immun*, 78 (5):2248-2256.
- Awandare GA, Kempaiah P, Ochiel DO, Piazza P, Keller CC, Perkins DJ. 2011. Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. *Am J Hematol*, 86 (2):155-162.
- Babakhanyan A, Leke RG, Salanti A, Bobbili N, Gwanmesia P, Leke RJ, Quakyi IA, Chen JJ, Taylor DW. 2014. The antibody response of pregnant Cameroonian women to VAR2CSA ID1-ID2a, a small recombinant protein containing the CSA-binding site. *PLoS One*, 9 (2):e88173.
- Babakhanyan A, Fang R, Wey A, Salanti A, Sama G, Efudem C, Leke RJ, Chen JJ, Leke RG, Taylor DW. 2015. Comparison of the specificity of antibodies to VAR2CSA in Cameroonian multigravidae with and without placental malaria: a retrospective case-control study. *Malar J*, 14:480.
- Badaut C, Bertin G, Rustico T, Fievet N, Massougboji A, Gaye A, Deloron P. 2010. Towards the rational design of a candidate vaccine against pregnancy associated malaria: conserved sequences of the DBL6epsilon domain of VAR2CSA. *PLoS One*, 5 (6):e11276.
- Bancells C, Deitsch KW. 2013. A molecular switch in the efficiency of translation reinitiation controls expression of *var2csa*, a gene implicated in pregnancy-associated malaria. *Mol Microbiol*, 90 (3):472-488.
- Barber BE, Bird E, Wilkes CS, William T, Grigg MJ, Paramaswaran U, Menon J, Jelip J, Yeo TW, Anstey NM. 2015. *Plasmodium knowlesi* malaria during pregnancy. *J Infect Dis*, 211 (7):1104-1110.
- Barfod L, Dalgaard MB, Pleman ST, Ofori MF, Pleass RJ, Hviid L. 2011. Evasion of immunity to *Plasmodium falciparum* malaria by IgM masking of protective IgG epitopes in infected erythrocyte surface-exposed PfEMP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (30):12485-12490.
- Barfod L, Nielsen MA, Turner L, Dahlback M, Jensen AT, Hviid L, Theander TG, Salanti A. 2006. Baculovirus-expressed constructs induce immunoglobulin G that recognizes VAR2CSA on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect Immun*, 74 (7):4357-4360.
- Barfod L, Bernasconi NL, Dahlback M, Jarrossay D, Andersen PH, Salanti A, Ofori MF, Turner L, Resende M, Nielsen MA, Theander TG, Sallusto F, Lanzavecchia A, Hviid L. 2007. Human pregnancy-associated malaria-specific B cells target polymorphic, conformational epitopes in VAR2CSA. *Mol Microbiol*, 63 (2):335-347.
- Barfod L, Dobrilovic T, Magistrado P, Khunrae P, Viwami F, Bruun J, Dahlback M, Bernasconi NL, Fried M, John D, Duffy PE, Salanti A, Lanzavecchia A, Lim CT, Ndam NT, Higgins MK, Hviid L. 2010. Chondroitin sulfate A-adhering *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express functionally important antibody epitopes shared by multiple variants. *J Immunol*, 185 (12):7553-7561.
- Barthlott T, Holländer GA, Keller MP, Krenger W, Piali L. 2006. Immunologie - Grundlagen für Klinik und Praxis. 1. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.

- Bassey G, Nyengidiki TK, John CT. 2015. Prevalence of placenta Plasmodium parasitemia and pregnancy outcome in asymptomatic patients at delivery in a university teaching hospital in Nigeria. *Niger J Clin Pract*, 18 (1):27-32.
- Bayoumi NK, Elhassan EM, Elbashir MI, Adam I. 2009. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to Plasmodium falciparum malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 103 (2):111-117.
- Beaudet JM, Mansur L, Joo EJ, Kamhi E, Yang B, Clausen TM, Salanti A, Zhang F, Linhardt RJ. 2014. Characterization of human placental glycosaminoglycans and regional binding to VAR2CSA in malaria infected erythrocytes. *Glycoconj J*, 31 (2):109-116.
- Beeson JG, Brown GV. 2004. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes demonstrate dual specificity for adhesion to hyaluronic acid and chondroitin sulfate A and have distinct adhesive properties. *J Infect Dis*, 189 (2):169-179.
- Beeson JG, Rogerson SJ, Cooke BM, Reeder JC, Chai W, Lawson AM, Molyneux ME, Brown GV. 2000. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat Med*, 6 (1):86-90.
- Beeson JG, Mann EJ, Elliott SR, Lema VM, Tadesse E, Molyneux ME, Brown GV, Rogerson SJ. 2004. Antibodies to variant surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and adhesion inhibitory antibodies are associated with placental malaria and have overlapping and distinct targets. *J Infect Dis*, 189 (3):540-551.
- Benstetter M. 2015. First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA London, UK: European Medicines Agency.
- Bertin GI, Sabbagh A, Guillonneau F, Jafari-Guemouri S, Ezinmegnon S, Federici C, Hounkpatin B, Fievet N, Deloron P. 2013. Differential protein expression profiles between Plasmodium falciparum parasites isolated from subjects presenting with pregnancy-associated malaria and uncomplicated malaria in Benin. *J Infect Dis*, 208 (12):1987-1997.
- Biemba G, Gordeuk VR, Thuma PE, Mabeza GF, Weiss G. 1998. Prolonged macrophage activation and persistent anaemia in children with complicated malaria. *Tropical Medicine & International Health*, 3 (1):60-65.
- Bigey P, Gnidehou S, Doritchamou J, Quiviger M, Viwami F, Couturier A, Salanti A, Nielsen MA, Scherman D, Deloron P, Tuikue Ndam N. 2011. The NTS-DBL2X region of VAR2CSA induces cross-reactive antibodies that inhibit adhesion of several Plasmodium falciparum isolates to chondroitin sulfate A. *J Infect Dis*, 204 (7):1125-1133.
- Bir N, Yazdani SS, Avril M, Layez C, Gysin J, Chitnis CE. 2006. Immunogenicity of Duffy binding-like domains that bind chondroitin sulfate A and protection against pregnancy-associated malaria. *Infect Immun*, 74 (10):5955-5963.
- Bockhorst J, Lu F, Janes JH, Keebler J, Gamain B, Awadalla P, Su XZ, Samudrala R, Jovic N, Smith JD. 2007. Structural polymorphism and diversifying selection on the pregnancy malaria vaccine candidate VAR2CSA. *Mol Biochem Parasitol*, 155 (2):103-112.
- Boeuf P, Tan A, Romagosa C, Radford J, Mwapasa V, Molyneux ME, Meshnick SR, Hunt NH, Rogerson SJ. 2008. Placental hypoxia during placental malaria. *J Infect Dis*, 197 (5):757-765.
- Boeuf P, Aitken EH, Chandrasiri U, Chua CL, McInerney B, McQuade L, Duffy M, Molyneux M, Brown G, Glazier J, Rogerson SJ. 2013. Plasmodium falciparum malaria elicits inflammatory responses that dysregulate placental amino acid transport. *PLoS Pathog*, 9 (2):e1003153.

- Bogovic Crncic T, Laskarin G, Juretic K, Strbo N, Dupor J, Srsen S, Randic L, Le Bouteiller P, Tabiasco J, Rukavina D. 2005. Perforin and Fas/FasL cytolytic pathways at the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol*, 54 (5):241-248.
- Bordbar B, Tuikue-Ndam N, Bigey P, Doritchamou J, Scherman D, Deloron P. 2012. Identification of Id1-DBL2X of VAR2CSA as a key domain inducing highly inhibitory and cross-reactive antibodies. *Vaccine*, 30 (7):1343-1348.
- Bordbar B, Tuikue Ndam N, Renard E, Jafari-Guemouri S, Tavul L, Jennison C, Gnidehou S, Tahar R, Gamboa D, Bendezu J, Menard D, Barry AE, Deloron P, Sabbagh A. 2014. Genetic diversity of VAR2CSA ID1-DBL2Xb in worldwide *Plasmodium falciparum* populations: impact on vaccine design for placental malaria. *Infect Genet Evol*, 25:81-92.
- Bouyou-Akotet MK, Mavoungou E. 2009. Natural killer cell IFN-gamma-activity is associated with *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy. *Exp Parasitol*, 123 (3):265-268.
- Bouyou-Akotet MK, Ionete-Collard DE, Mabika-Manfoumbi M, Kendjo E, Matsiegui PB, Mavoungou E, Kombila M. 2003. Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Gabon. *Malar J*, 2:18.
- Bouyou-Akotet MK, Adegnika AA, Agnandji ST, Ngou-Milama E, Kombila M, Kremsner PG, Mavoungou E. 2005. Cortisol and susceptibility to malaria during pregnancy. *Microbes Infect*, 7 (11-12):1217-1223.
- Bouyou-Akotet MK, Issifou S, Meye JF, Kombila M, Ngou-Milama E, Luty AJ, Kremsner PG, Mavoungou E. 2004. Depressed natural killer cell cytotoxicity against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes during first pregnancies. *Clin Infect Dis*, 38 (3):342-347.
- Brabin BJ. 1983. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ*, 61 (6):1005-1016.
- Brabin BJ, Johnson PM. 2005. Placental malaria and pre-eclampsia through the looking glass backwards? *J Reprod Immunol*, 65 (1):1-15.
- Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menendez C, Verhoeff FH, McGready R, Fletcher KA, Owens S, D'Alessandro U, Nosten F, Fischer PR, Ordi J. 2004. The sick placenta-the role of malaria. *Placenta*, 25 (5):359-378.
- Braden BC, Poljak RJ. 1995. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB J*, 9 (1):9-16.
- Braden BC, Goldman ER, Mariuzza RA, Poljak RJ. 1998. Anatomy of an antibody molecule: structure, kinetics, thermodynamics and mutational studies of the antilysozyme antibody D1.3. *Immunol Rev*, 163:45-57.
- Brolin KJ, Persson KE, Wahlgren M, Rogerson SJ, Chen Q. 2010. Differential recognition of *P. falciparum* VAR2CSA domains by naturally acquired antibodies in pregnant women from a malaria endemic area. *PLoS One*, 5 (2):e9230.
- Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daeron M. 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113 (16):3716-3725.
- Buffet PA, Gamain B, Scheidig C, Baruch D, Smith JD, Hernandez-Rivas R, Pouvelle B, Oishi S, Fujii N, Fusai T, Parzy D, Miller LH, Gysin J, Scherf A. 1999. *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (22):12743-12748.
- Bull PC, Marsh K. 2002. The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. *Trends Microbiol*, 10 (2):55-58.

- Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwood BM. 1993. Placental malaria. I. Pathological classification. *Histopathology*, 22 (3):211-218.
- Burger RJ, van Eijk AM, Bussink M, Hill J, Ter Kuile FO. 2016. Artemisinin-Based Combination Therapy Versus Quinine or Other Combinations for Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in the Second and Third Trimester of Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Open Forum Infect Dis*, 3 (1):ofv170.
- Cael JJ, Winter WT, Arnott S. 1978. Calcium chondroitin 4-sulfate: molecular conformation and organization of polysaccharide chains in a proteoglycan. *J Mol Biol*, 125 (1):21-42.
- Carmona-Fonseca J, Arango E, Maestre A. 2013. Placental malaria in Colombia: histopathologic findings in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* infections. *Am J Trop Med Hyg*, 88 (6):1093-1101.
- Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, Mamoni R, Leite JA, Rodrigues MM, Soares IS, Oliveira TR, Wunderlich G, Lacerda MV, del Portillo HA, Araujo MO, Russell B, Suwanarusk R, Snounou G, Renia L, Costa FT. 2010. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*, 202 (4):638-647.
- Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JO, Williams S, Lowe B, Nyanoti M, Williams TN, Maitland K, Molyneux M, Newton CR, Peshu N, Watt SM, Roberts DJ. 2006. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood*, 108 (8):2569-2577.
- Cates JE, Unger HW, Briand V, Fievet N, Valea I, Tinto H, D'Alessandro U, Landis SH, Adu-Afarwuah S, Dewey KG, Ter Kuile FO, Desai M, Dellicour S, Ouma P, Gutman J, Onoko M, Slutsker L, Terlouw DJ, Kariuki S, Ayisi J, Madanitsa M, Mwapasa V, Ashorn P, Maleta K, Mueller I, Stanisci D, Schmiegelow C, Lusingu JPA, van Eijk AM, Bauserman M, Adair L, Cole SR, Westreich D, Meshnick S, Rogerson S. 2017. Malaria, malnutrition, and birthweight: A meta-analysis using individual participant data. *PLoS Med*, 14 (8):e1002373.
- Chai W, Beeson JG, Lawson AM. 2002. The structural motif in chondroitin sulfate for adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes comprises disaccharide units of 4-O-sulfated and non-sulfated N-acetylgalactosamine linked to glucuronic acid. *J Biol Chem*, 277 (25):22438-22446.
- Chaisavaneeyakorn S, Moore JM, Mirel L, Othoro C, Otieno J, Chaiyaroj SC, Shi YP, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V. 2003. Levels of macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in intervillous blood plasma samples from women with placental malaria and human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10 (4):631-636.
- Chan S, Frasnich A, Mandava CS, Ch'ng JH, Quintana MDP, Vesterlund M, Ghorbal M, Joannin N, Franzen O, Lopez-Rubio JJ, Barbieri S, Lanzavecchia A, Sanyal S, Wahlgren M. 2017. Regulation of PfEMP1-VAR2CSA translation by a *Plasmodium* translation-enhancing factor. *Nat Microbiol*, 2:17068.
- Chandrasiri UP, Randall LM, Saad AA, Bashir AM, Rogerson SJ, Adam I. 2014a. Low antibody levels to pregnancy-specific malaria antigens and heightened cytokine responses associated with severe malaria in pregnancy. *J Infect Dis*, 209 (9):1408-1417.
- Chandrasiri UP, Chua CL, Umbers AJ, Chaluluka E, Glazier JD, Rogerson SJ, Boeuf P. 2014b. Insight into the pathogenesis of fetal growth restriction in placental malaria: decreased placental glucose transporter isoform 1 expression. *J Infect Dis*, 209 (10):1663-1667.
- Chattopadhyay R, Sharma A, Srivastava VK, Pati SS, Sharma SK, Das BS, Chitnis CE. 2003. *Plasmodium falciparum* infection elicits both variant-specific and cross-reactive antibodies against variant surface antigens. *Infect Immun*, 71 (2):597-604.

- Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. 2008. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol*, 181 (8):5396-5404.
- Chene A, Briand V, Ibitokou S, Dechavanne S, Massougbodji A, Deloron P, Luty AJ, Gamain B, Fievet N. 2014. Placental cytokine and chemokine profiles reflect pregnancy outcomes in women exposed to *Plasmodium falciparum* infection. *Infect Immun*, 82 (9):3783-3789.
- Chene A, Houard S, Nielsen MA, Hundt S, D'Alessio F, Sirima SB, Luty AJ, Duffy P, Leroy O, Gamain B, Viebig NK. 2016. Clinical development of placental malaria vaccines and immunoassays harmonization: a workshop report. *Malar J*, 15:476.
- Cholera R, Brittain NJ, Gillrie MR, Lopera-Mesa TM, Diakite SA, Arie T, Krause MA, Guindo A, Tubman A, Fujioka H, Diallo DA, Doumbo OK, Ho M, Wellems TE, Fairhurst RM. 2008. Impaired cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (3):991-996.
- Chotivanich K, Udomsangpetch R, Suwanarusk R, Pukrittayakamee S, Wilairatana P, Beeson JG, Day NP, White NJ. 2012. *Plasmodium vivax* adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS One*, 7 (4):e34509.
- Chroboczek J, Szurgot I, Szolajska E. 2014. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim Pol*, 61 (3):531-539.
- Chua CL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. 2013. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol*, 29 (1):26-34.
- Clausen TM, Christoffersen S, Dahlback M, Langkilde AE, Jensen KE, Resende M, Agerbaek MO, Andersen D, Berisha B, Ditlev SB, Pinto VV, Nielsen MA, Theander TG, Larsen S, Salanti A. 2012. Structural and functional insight into how the *Plasmodium falciparum* VAR2CSA protein mediates binding to chondroitin sulfate A in placental malaria. *J Biol Chem*, 287 (28):23332-23345.
- ClinicalTrials.gov 2017. 13.09.2017. Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of a Placental Malaria Vaccine Candidate (PRIMVAC) in Healthy Adults (PRIMALVAC) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02658253>.
- ClinicalTrials.gov 2017. 13.09.2017. Safety and Immunogenicity of the Placental Malaria Vaccine Candidate PAMVAC Variously Adjuvanted (PAMVAC) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02647489>.
- Cohee LM, Kalilani-Phiri L, Boudova S, Joshi S, Mukadam R, Seydel KB, Mawindo P, Thesing P, Kamiza S, Makwakwa K, Muehlenbachs A, Taylor TE, Laufer MK. 2014. Submicroscopic malaria infection during pregnancy and the impact of intermittent preventive treatment. *Malar J*, 13:274.
- Conroy A, Serghides L, Finney C, Owino SO, Kumar S, Gowda DC, Liles WC, Moore JM, Kain KC. 2009. C5a enhances dysregulated inflammatory and angiogenic responses to malaria in vitro: potential implications for placental malaria. *PLoS One*, 4 (3):e4953.
- Conroy AL, Liles WC, Molyneux ME, Rogerson SJ, Kain KC. 2011. Performance characteristics of combinations of host biomarkers to identify women with occult placental malaria: a case-control study from Malawi. *PLoS One*, 6 (12):e28540.
- Conroy AL, Silver KL, Zhong K, Rennie M, Ward P, Sarma JV, Molyneux ME, Sled J, Fletcher JF, Rogerson S, Kain KC. 2013. Complement activation and the resulting placental vascular insufficiency drives fetal growth restriction associated with placental malaria. *Cell Host Microbe*, 13 (2):215-226.

- Cook GC. 1996. *Manson's Tropical Diseases*. 20. Aufl. London: W B Saunders
- Cooke BM, Rogerson SJ, Brown GV, Coppel RL. 1996. Adhesion of malaria-infected red blood cells to chondroitin sulfate A under flow conditions. *Blood*, 88 (10):4040-4044.
- Cooper NR. 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol*, 37:151-216.
- Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJ, Cot M, Fievet N, Massougbdji A, Deloron P, Tuikue Ndam N. 2015. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight. *Clin Infect Dis*, 60 (10):1481-1488.
- Covell G. 1950. Congenital malaria. *Trop Dis Bull*, 47 (12):1147-1167.
- Creasey AM, Staalsoe T, Raza A, Arnot DE, Rowe JA. 2003. Nonspecific immunoglobulin M binding and chondroitin sulfate A binding are linked phenotypes of *Plasmodium falciparum* isolates implicated in malaria during pregnancy. *Infect Immun*, 71 (8):4767-4771.
- Dahlback M, Nielsen MA, Salanti A. 2010. Can any lessons be learned from the ambiguous glycan binding of PfEMP1 domains? *Trends Parasitol*, 26 (5):230-235.
- Dahlback M, Jorgensen LM, Nielsen MA, Clausen TM, Ditlev SB, Resende M, Pinto VV, Arnot DE, Theander TG, Salanti A. 2011. The chondroitin sulfate A-binding site of the VAR2CSA protein involves multiple N-terminal domains. *J Biol Chem*, 286 (18):15908-15917.
- Dahlback M, Rask TS, Andersen PH, Nielsen MA, Ndam NT, Resende M, Turner L, Deloron P, Hviid L, Lund O, Pedersen AG, Theander TG, Salanti A. 2006. Epitope mapping and topographic analysis of VAR2CSA DBL3X involved in *P. falciparum* placental sequestration. *PLoS Pathog*, 2 (11):e124.
- de Mast Q, van Dongen-Lases EC, Swinkels DW, Nieman AE, Roestenberg M, Druilhe P, Arens TA, Luty AJ, Hermsen CC, Sauerwein RW, van der Ven AJ. 2009. Mild increases in serum hepcidin and interleukin-6 concentrations impair iron incorporation in haemoglobin during an experimental human malaria infection. *Br J Haematol*, 145 (5):657-664.
- Dechavanne S, Srivastava A, Gangnard S, Nunes-Silva S, Dechavanne C, Fievet N, Deloron P, Chene A, Gamain B. 2015. Parity-dependent recognition of DBL1X-3X suggests an important role of the VAR2CSA high-affinity CSA-binding region in the development of the humoral response against placental malaria. *Infect Immun*, 83 (6):2466-2474.
- Dekker C, Gordon L, Klein J. 2008. *Dose Optimization Strategies for Vaccines: The Role of Adjuvants and New Technologies*. The National Vaccine Advisory Committee (NVAC), U.S. Department of Health & Human Services.
- Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO. 2010. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. *PLoS Med*, 7 (1):e1000221.
- Deloron P, Milet J, Badaut C. 2013. *Plasmodium falciparum* variability and immune evasion proceed from antigenicity of consensus sequences from DBL6epsilon; generalization to all DBL from VAR2CSA. *PLoS One*, 8 (1):e54882.
- Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, Newman RD. 2007. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*, 7 (2):93-104.
- Dimasuay KG, Aitken EH, Rosario F, Njie M, Glazier J, Rogerson SJ, Fowkes FJ, Beeson JG, Powell T, Jansson T, Boeuf P. 2017. Inhibition of placental mTOR signaling provides a link between placental malaria and reduced birthweight. *BMC Med*, 15 (1):1.
- Diouf I, Fievet N, Doucoure S, Ngom M, Andrieu M, Mathieu JF, Gaye A, Thiaw OT, Deloron P. 2007. IL-12 producing monocytes and IFN-gamma and TNF-alpha producing T-lymphocytes are

- increased in placentas infected by *Plasmodium falciparum*. *J Reprod Immunol*, 74 (1-2):152-162.
- Ditlev SB, Nielsen MA, Resende M, Agerbaek MO, Pinto VV, Andersen PH, Magistrado P, Lusingu J, Dahlback M, Theander TG, Salanti A. 2012. Identification and characterization of B-cell epitopes in the DBL4epsilon domain of VAR2CSA. *PLoS One*, 7 (9):e43663.
- Dondorp AM, Angus BJ, Hardeman MR, Chotivanich KT, Silamut K, Ruangveerayuth R, Kager PA, White NJ, Vreeken J. 1997. Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 57 (5):507-511.
- Dondorp AM, Angus BJ, Chotivanich K, Silamut K, Ruangveerayuth R, Hardeman MR, Kager PA, Vreeken J, White NJ. 1999. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 60 (5):733-737.
- Doritchamou J, Sossou-tchatcha S, Cottrell G, Moussiliou A, Hounton Houngbeme C, Massougbdji A, Deloron P, Ndam NT. 2014. Dynamics in the cytoadherence phenotypes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes isolated during pregnancy. *PLoS One*, 9 (6):e98577.
- Doritchamou J, Sabbagh A, Jespersen JS, Renard E, Salanti A, Nielsen MA, Deloron P, Tuikue Ndam N. 2015. Identification of a Major Dimorphic Region in the Functionally Critical N-Terminal ID1 Domain of VAR2CSA. *PLoS One*, 10 (9):e0137695.
- Doritchamou J, Bertin G, Moussiliou A, Bigey P, Viwami F, Ezinmegnon S, Fievet N, Massougbdji A, Deloron P, Tuikue Ndam N. 2012. First-trimester *Plasmodium falciparum* infections display a typical "placental" phenotype. *J Infect Dis*, 206 (12):1911-1919.
- Doritchamou J, Bigey P, Nielsen MA, Gnidehou S, Ezinmegnon S, Burgain A, Massougbdji A, Deloron P, Salanti A, Ndam NT. 2013. Differential adhesion-inhibitory patterns of antibodies raised against two major variants of the NTS-DBL2X region of VAR2CSA. *Vaccine*, 31 (41):4516-4522.
- Doritchamou JY, Herrera R, Aebig JA, Morrison R, Nguyen V, Reiter K, Shimp RL, MacDonald NJ, Narum DL, Fried M, Duffy PE. 2016. VAR2CSA Domain-Specific Analysis of Naturally Acquired Functional Antibodies to *Plasmodium falciparum* Placental Malaria. *J Infect Dis*, 214 (4):577-586.
- Dorman EK, Shulman CE, Kingdom J, Bulmer JN, Mwendwa J, Peshu N, Marsh K. 2002. Impaired uteroplacental blood flow in pregnancies complicated by *falciparum* malaria. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 19 (2):165-170.
- Duffy MF, Maier AG, Byrne TJ, Marty AJ, Elliott SR, O'Neill MT, Payne PD, Rogerson SJ, Cowman AF, Crabb BS, Brown GV. 2006. VAR2CSA is the principal ligand for chondroitin sulfate A in two allogeneic isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 148 (2):117-124.
- Duffy PE, Fried M. 2003. Antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns. *Infect Immun*, 71 (11):6620-6623.
- Edelman GM. 1970. The structure and function of antibodies. *Sci Am*, 223 (2):34-42.
- Ekvall H. 2003. Malaria and anemia. *Curr Opin Hematol*, 10 (2):108-114.
- Elliott SR, Brennan AK, Beeson JG, Tadesse E, Molyneux ME, Brown GV, Rogerson SJ. 2005. Placental malaria induces variant-specific antibodies of the cytophilic subtypes immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 that correlate with adhesion inhibitory activity. *Infect Immun*, 73 (9):5903-5907.
- EMA. 2006. Guideline on clinical evaluation of new vaccines. . London, England: European Medicines Agency.

- EMA. 2015. Assessment report: Mosquirix™ London, UK: European Medicines Agency.
- Enweronu-Laryea CC, Adjei GO, Mensah B, Duah N, Quashie NB. 2013. Prevalence of congenital malaria in high-risk Ghanaian newborns: a cross-sectional study. *Malar J*, 12:17.
- European.Vaccine.Initiative 2017. 11.09.2017. PRIMALVAC - Recombinant VAR2CSA protein as vaccine candidate for placental malaria. Heidelberg, Deutschland. <http://www.euvaccine.eu/portfolio/project-index/primalvac>.
- Feng G, Aitken E, Yosaatmadja F, Kalilani L, Meshnick SR, Jaworowski A, Simpson JA, Rogerson SJ. 2009. Antibodies to variant surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes are associated with protection from treatment failure and the development of anemia in pregnancy. *J Infect Dis*, 200 (2):299-306.
- Fernandez-Arias C, Mashoof S, Huang J, Tsuji M. 2015. Circumsporozoite protein as a potential target for antimalarials. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 13 (8):923-926.
- Fernandez P, Petres S, Mecheri S, Gysin J, Scherf A. 2010. Strain-transcendent immune response to recombinant Var2CSA DBL5-epsilon domain block P. falciparum adhesion to placenta-derived BeWo cells under flow conditions. *PLoS One*, 5 (9):e12558.
- Fernandez P, Viebig NK, Dechavanne S, Lepolard C, Gysin J, Scherf A, Gamain B. 2008. Var2CSA DBL6-epsilon domain expressed in HEK293 induces limited cross-reactive and blocking antibodies to CSA binding parasites. *Malar J*, 7:170.
- Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. 2011. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis*, 53 (3):296-302.
- Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, Chaouat G. 2001. Plasmodium falciparum induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *J Infect Dis*, 183 (10):1530-1534.
- Flick K, Scholander C, Chen Q, Fernandez V, Pouvelle B, Gysin J, Wahlgren M. 2001. Role of nonimmune IgG bound to PfEMP1 in placental malaria. *Science*, 293 (5537):2098-2100.
- Fowler VL, Barnett PV. 2012. Progress in the development of DNA vaccines against foot-and-mouth disease. *Expert Rev Vaccines*, 11 (4):481-493.
- Francis SE, Malkov VA, Oleinikov AV, Rosnagle E, Wendler JP, Mutabingwa TK, Fried M, Duffy PE. 2007. Six genes are preferentially transcribed by the circulating and sequestered forms of Plasmodium falciparum parasites that infect pregnant women. *Infect Immun*, 75 (10):4838-4850.
- Fried M, Duffy PE. 1996. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*, 272 (5267):1502-1504.
- Fried M, Duffy PE. 2002. Two DBLgamma subtypes are commonly expressed by placental isolates of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 122 (2):201-210.
- Fried M, Duffy PE. 2015. Designing a VAR2CSA-based vaccine to prevent placental malaria. *Vaccine*, 33 (52):7483-7488.
- Fried M, Lauder RM, Duffy PE. 2000. Plasmodium falciparum: adhesion of placental isolates modulated by the sulfation characteristics of the glycosaminoglycan receptor. *Exp Parasitol*, 95 (1):75-78.
- Fried M, Muehlenbachs A, Duffy PE. 2012. Diagnosing malaria in pregnancy: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10 (10):1177-1187.

- Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE. 1998a. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. *J Immunol*, 160 (5):2523-2530.
- Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. 1998b. Maternal antibodies block malaria. *Nature*, 395 (6705):851-852.
- Fried M, Domingo GJ, Gowda CD, Mutabingwa TK, Duffy PE. 2006. Plasmodium falciparum: chondroitin sulfate A is the major receptor for adhesion of parasitized erythrocytes in the placenta. *Exp Parasitol*, 113 (1):36-42.
- Fried M, Hixson KK, Anderson L, Ogata Y, Mutabingwa TK, Duffy PE. 2007. The distinct proteome of placental malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 155 (1):57-65.
- Fried M, Avril M, Chaturvedi R, Fernandez P, Lograsso J, Narum D, Nielsen MA, Oleinikov AV, Resende M, Salanti A, Saveria T, Williamson K, Dicko A, Scherf A, Smith JD, Theander TG, Duffy PE. 2013. Multilaboratory approach to preclinical evaluation of vaccine immunogens for placental malaria. *Infect Immun*, 81 (2):487-495.
- Galbraith RM, Fox H, Hsi B, Galbraith GM, Bray RS, Faulk WP. 1980. The human materno-foetal relationship in malaria. II. Histological, ultrastructural and immunopathological studies of the placenta. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74 (1):61-72.
- Gamain B, Trimnell AR, Scheidig C, Scherf A, Miller LH, Smith JD. 2005. Identification of multiple chondroitin sulfate A (CSA)-binding domains in the var2CSA gene transcribed in CSA-binding parasites. *J Infect Dis*, 191 (6):1010-1013.
- Gamble C, Ekwaru JP, ter Kuile FO. 2006. Insecticide-treated nets for preventing malaria in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD003755.
- Gangnard S, Lewit-Bentley A, Dechavanne S, Srivastava A, Amirat F, Bentley GA, Gamain B. 2015. Structure of the DBL3X-DBL4epsilon region of the VAR2CSA placental malaria vaccine candidate: insight into DBL domain interactions. *Sci Rep*, 5:14868.
- Gangnard S, Badaut C, Ramboarina S, Baron B, Ramdani T, Gamain B, Deloron P, Lewit-Bentley A, Bentley GA. 2013. Structural and immunological correlations between the variable blocks of the VAR2CSA domain DBL6epsilon from two Plasmodium falciparum parasite lines. *J Mol Biol*, 425 (10):1697-1711.
- Gangnard S, Tuikue Ndam NG, Gnidehou S, Quiviger M, Juillerat A, Faure G, Baron B, Viwami F, Deloron P, Bentley GA. 2010. Functional and immunological characterization of the var2CSA-DBL5epsilon domain of a placental Plasmodium falciparum isolate. *Mol Biochem Parasitol*, 173 (2):115-122.
- Ganz T, Nemeth E. 2012. Hcpidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1823 (9):1434-1443.
- Ghimire TR, Benson RA, Garside P, Brewer JM. 2012. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunol Lett*, 147 (1-2):55-62.
- Gill GV, Beeching N. 2011. *Tropical Medicine*. 6. Aufl. Liverpool: Wiley-Blackwell.
- Gill J, Chitnis CE, Sharma A. 2009. Structural insights into chondroitin sulphate A binding Duffy-binding-like domains from Plasmodium falciparum: implications for intervention strategies against placental malaria. *Malar J*, 8:67.
- Girardi G. 2008. Complement inhibition keeps mothers calm and avoids fetal rejection. *Immunol Invest*, 37 (5):645-659.

- Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE. 2006. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med*, 203 (9):2165-2175.
- Glazier JD, Cetin I, Perugino G, Ronzoni S, Grey AM, Mahendran D, Marconi AM, Pardi G, Sibley CP. 1997. Association between the activity of the system A amino acid transporter in the microvillous plasma membrane of the human placenta and severity of fetal compromise in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res*, 42 (4):514-519.
- Gnidehou S, Jessen L, Gangnard S, Ermont C, Triqui C, Quiviger M, Guitard J, Lund O, Deloron P, Ndam NT. 2010. Insight into antigenic diversity of VAR2CSA-DBL5epsilon domain from multiple *Plasmodium falciparum* placental isolates. *PLoS One*, 5 (10).
- Goel MK, Khanna P, Rajput M. 2013. Congenital malaria--a neglected problem. *J Indian Med Assoc*, 111 (10):697-698, 701.
- Goel S, Gowda DC. 2011. How specific is *Plasmodium falciparum* adherence to chondroitin 4-sulfate? *Trends Parasitol*, 27 (9):375-381.
- Goel S, Valiyaveetil M, Achur RN, Goyal A, Mattei D, Salanti A, Trenholme KR, Gardiner DL, Gowda DC. 2010. Dual stage synthesis and crucial role of cytoadherence-linked asexual gene 9 in the surface expression of malaria parasite var proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (38):16643-16648.
- Gonzalez R, Sevene E, Jagoe G, Slutsker L, Menendez C. 2016. A Public Health Paradox: The Women Most Vulnerable to Malaria Are the Least Protected. *PLoS Med*, 13 (5):e1002014.
- Gordon MC, Zimmerman PD, Landon MB, Gabbe SG, Kniss DA. 1995. Insulin and glucose modulate glucose transporter messenger ribonucleic acid expression and glucose uptake in trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi. *Am J Obstet Gynecol*, 173 (4):1089-1097.
- Gowda AS, Madhunapantula SV, Achur RN, Valiyaveetil M, Bhavanandan VP, Gowda DC. 2007. Structural basis for the adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin 4-sulfate and design of novel photoactivable reagents for the identification of parasite adhesive proteins. *J Biol Chem*, 282 (2):916-928.
- Gowda DC. 2006. Role of chondroitin-4-sulfate in pregnancy-associated malaria. *Adv Pharmacol*, 53:375-400.
- Gueneuc A, Deloron P, Bertin GI. 2017. Usefulness of a biomarker to identify placental dysfunction in the context of malaria. *Malar J*, 16 (1):11.
- Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. 2009. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update*, 15 (5):517-535.
- Gupta R 2015. 18.08.2015. Malarial fever and its ayurvedic management. [nur Abbildung] www.namahjournal.com/pic/Malarial-fever-v-19-i-4.jpg.
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol*, 18:927-974.
- Gutman J, Kalilani L, Taylor S, Zhou Z, Wiegand RE, Thwai KL, Mwandama D, Khairallah C, Madanitsa M, Chaluluka E, Dzinjalama F, Ali D, Mathanga DP, Skarbinski J, Shi YP, Meshnick S, ter Kuile FO. 2015. The A581G Mutation in the Gene Encoding *Plasmodium falciparum* Dihydropteroate Synthetase Reduces the Effectiveness of Sulfadoxine-Pyrimethamine Preventive Therapy in Malawian Pregnant Women. *J Infect Dis*, 211 (12):1997-2005.
- Guyatt HL, Snow RW. 2001. The epidemiology and burden of *Plasmodium falciparum*-related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 64 (1-2 Suppl):36-44.

- Guyatt HL, Snow RW. 2004. Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Rev*, 17 (4):760-769, table of contents.
- Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. 1998. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol*, 275 (5):861-872.
- Hemmer CJ, Holst FG, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, Reisinger EC. 2006. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health*, 11 (6):817-823.
- Higgins MK. 2008. The structure of a chondroitin sulfate-binding domain important in placental malaria. *J Biol Chem*, 283 (32):21842-21846.
- Hill J, Hoyt J, Achieng F, Ouma P, L'Lanziva A, Kariuki S, Desai M, Webster J. 2016. User and Provider Acceptability of Intermittent Screening and Treatment and Intermittent Preventive Treatment with Dihydroartemisinin-Piperaquine to Prevent Malaria in Pregnancy in Western Kenya. *PLoS One*, 11 (3):e0150259.
- Hof H, Dörries R. 2014. *Medizinische Mikrobiologie*. 5. Aufl. Stuttgart: Thieme, Duale Reihe.
- Hommel M, Elliott SR, Soma V, Kelly G, Fowkes FJ, Chesson JM, Duffy MF, Bockhorst J, Avril M, Mueller I, Raiko A, Stanisc DI, Rogerson SJ, Smith JD, Beeson JG. 2010. Evaluation of the antigenic diversity of placenta-binding *Plasmodium falciparum* variants and the antibody repertoire among pregnant women. *Infect Immun*, 78 (5):1963-1978.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. 1994. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (11):4854-4858.
- Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. 2005. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*, 19 (7):681-693.
- Huynh BT, Fievet N, Gbaguidi G, Dechavanne S, Borgella S, Guezo-Mevo B, Massougbdji A, Ndam NT, Deloron P, Cot M. 2011. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg*, 85 (2):214-220.
- Hviid L. 2005. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta Trop*, 95 (3):270-275.
- Hviid L, Jensen AT. 2015. PfEMP1 - A Parasite Protein Family of Key Importance in *Plasmodium falciparum* Malaria Immunity and Pathogenesis. *Adv Parasitol*, 88:51-84.
- Ilunga PM, Mukuku O, Mawaw PM, Mutombo AM, Lubala TK, Shongo Ya Pongombo M, Kakudji Luhete P, Wembonyama SO, Mutombo Kabamba A, Luboya Numbi O. 2016. Risk factors for low birth weight in Lubumbashi, Democratic Republic of the Congo. *Med Sante Trop*, 26 (4):386-390.
- Imamura T, Sugiyama T, Cuevas LE, Makunde R, Nakamura S. 2002. Expression of tissue factor, the clotting initiator, on macrophages in *Plasmodium falciparum*-infected placentas. *J Infect Dis*, 186 (3):436-440.
- Isitman G, Lisovsky I, Tremblay-McLean A, Kovacs C, Harris M, Routy JP, Bruneau J, Wainberg MA, Tremblay C, Bernard NF. 2016. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of Effector Cells from HIV-Infected Elite and Viral Controllers. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 32 (10-11):1079-1088.
- Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, Hirt R, Cardesa A, Alonso PL. 2000. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol*, 31 (1):85-93.

- Jakeman GN, Saul A, Hogarth WL, Collins WE. 1999. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology*, 119 (Pt 2):127-133.
- Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, Ericsson A, Palmberg I, Tranberg M, Ganapathy V, Powell TL, Jansson T. 2006. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J Physiol*, 576 (Pt 3):935-946.
- Jansson T, Ylven K, Wennergren M, Powell TL. 2002. Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction. *Placenta*, 23 (5):392-399.
- Jaworowski A, Fernandes LA, Yosaatmadja F, Feng G, Mwapasa V, Molyneux ME, Meshnick SR, Lewis J, Rogerson SJ. 2009. Relationship between human immunodeficiency virus type 1 coinfection, anemia, and levels and function of antibodies to variant surface antigens in pregnancy-associated malaria. *Clin Vaccine Immunol*, 16 (3):312-319.
- Jensen AT, Zornig HD, Buhmann C, Salanti A, Koram KA, Riley EM, Theander TG, Hviid L, Staalsoe T. 2003. Lack of gender-specific antibody recognition of products from domains of a var gene implicated in pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun*, 71 (7):4193-4196.
- Johnson G, Wu TT. 2000. Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res*, 28 (1):214-218.
- Jones HN, Jansson T, Powell TL. 2009. IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297 (5):C1228-1235.
- Jones LA, Kreem S, Shweash M, Paul A, Alexander J, Roberts CW. 2010. Differential modulation of TLR3- and TLR4-mediated dendritic cell maturation and function by progesterone. *J Immunol*, 185 (8):4525-4534.
- Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. 2008. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J*, 7:26.
- Kai OK, Roberts DJ. 2008. The pathophysiology of malarial anaemia: where have all the red cells gone? *BMC Med*, 6:24.
- Kakuru A, Jagannathan P, Muhindo MK, Natureeba P, Awori P, Nakalembe M, Opira B, Olwoch P, Ategeka J, Nayebara P, Clark TD, Feeney ME, Charlebois ED, Rizzuto G, Muehlenbachs A, Havlir DV, Kamya MR, Dorsey G. 2016. Dihydroartemisinin-Piperaquine for the Prevention of Malaria in Pregnancy. *N Engl J Med*, 374 (10):928-939.
- Kalanda BF, van Buuren S, Verhoeff FH, Brabin BJ. 2005. Anthropometry of fetal growth in rural Malawi in relation to maternal malaria and HIV status. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 90 (2):F161-165.
- Karl PI. 1995. Insulin-like growth factor-1 stimulates amino acid uptake by the cultured human placental trophoblast. *J Cell Physiol*, 165 (1):83-88.
- Kasumba IN, Nalunkuma AJ, Mujuzi G, Kitaka FS, Byaruhanga R, Okong P, Egwang TG. 2000. Low birthweight associated with maternal anaemia and Plasmodium falciparum infection during pregnancy, in a peri-urban/urban area of low endemicity in Uganda. *Ann Trop Med Parasitol*, 94 (1):7-13.

- Kattenberg JH, Ochodo EA, Boer KR, Schallig HD, Mens PF, Leeflang MM. 2011. Systematic review and meta-analysis: rapid diagnostic tests versus placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women. *Malar J*, 10:321.
- Kaufmann P, Huppertz B, Frank HG. 1996. The fibrinoids of the human placenta: origin, composition and functional relevance. *Ann Anat*, 178 (6):485-501.
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B. 2003. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*, 69 (1):1-7.
- Keen J, Serghides L, Ayi K, Patel SN, Ayisi J, van Eijk A, Steketee R, Udhayakumar V, Kain KC. 2007. HIV impairs opsonic phagocytic clearance of pregnancy-associated malaria parasites. *PLoS Med*, 4 (5):e181.
- Keller CC, Kremsner PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB, Perkins DJ. 2004. Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infect Immun*, 72 (8):4868-4873.
- Khan FA. 2009. *The Elements of Immunology*. 1. Aufl. India: Chennai Micro Print.
- Khan KH. 2013. DNA vaccines: roles against diseases. *Germes*, 3 (1):26-35.
- Khan SA, Ahmed S, Mushahid N, Anwer M, Saeed S, Khan FA, Shamshad GU, Joyia Z. 2013. Comparison of real time polymerase chain reaction with microscopy and antigen detection assay for the diagnosis of malaria. *J Coll Physicians Surg Pak*, 23 (10):787-792.
- Khunrae P, Higgins MK. 2010. Structural insights into chondroitin sulfate binding in pregnancy-associated malaria. *Biochem Soc Trans*, 38 (5):1337-1341.
- Khunrae P, Philip JM, Bull DR, Higgins MK. 2009. Structural comparison of two CSPG-binding DBL domains from the VAR2CSA protein important in malaria during pregnancy. *J Mol Biol*, 393 (1):202-213.
- Khunrae P, Dahlback M, Nielsen MA, Andersen G, Ditlev SB, Resende M, Pinto VV, Theander TG, Higgins MK, Salanti A. 2010. Full-length recombinant Plasmodium falciparum VAR2CSA binds specifically to CSPG and induces potent parasite adhesion-blocking antibodies. *J Mol Biol*, 397 (3):826-834.
- Kidanto HL, Mogren I, Lindmark G, Massawe S, Nystrom L. 2009. Risks for preterm delivery and low birth weight are independently increased by severity of maternal anaemia. *S Afr Med J*, 99 (2):98-102.
- Kleine B, Rossmannith W. 2014. *Hormone und Hormonsystem - Lehrbuch der Endokrinologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
- Koura GK, Ouedraogo S, Le Port A, Watier L, Cottrell G, Guerra J, Choudat I, Rachas A, Bouscaillou J, Massougbdji A, Garcia A. 2012. Anaemia during pregnancy: impact on birth outcome and infant haemoglobin level during the first 18 months of life. *Trop Med Int Health*, 17 (3):283-291.
- Kraemer SM, Smith JD. 2003. Evidence for the importance of genetic structuring to the structural and functional specialization of the Plasmodium falciparum var gene family. *Mol Microbiol*, 50 (5):1527-1538.
- Kraemer SM, Smith JD. 2006. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol*, 9 (4):374-380.
- Kraemer SM, Kyes SA, Aggarwal G, Springer AL, Nelson SO, Christodoulou Z, Smith LM, Wang W, Levin E, Newbold CI, Myler PJ, Smith JD. 2007. Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in Plasmodium falciparum: comparisons of geographically diverse isolates. *BMC Genomics*, 8:45.

- Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, Behr C, Hviid L. 1998. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet*, 351 (9118):1768-1772.
- Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. 2012. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31 (1):58-83.
- Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Kim CE. 2005. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chem Immunol Allergy*, 88:64-79.
- Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD, Beer AE, Gilman-Sachs A. 2003. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod*, 18 (4):767-773.
- Laban NM, Kobayashi T, Hamapumbu H, Sullivan D, Mharakurwa S, Thuma PE, Shiff CJ, Moss WJ, Southern Africa International Centers of Excellence for Malaria R. 2015. Comparison of a PfHRP2-based rapid diagnostic test and PCR for malaria in a low prevalence setting in rural southern Zambia: implications for elimination. *Malar J*, 14:25.
- Lala PK, Chakraborty C. 2003. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta*, 24 (6):575-587.
- Lambert LH, Bullock JL, Cook ST, Miura K, Garboczi DN, Diakite M, Fairhurst RM, Singh K, Long CA. 2014. Antigen reversal identifies targets of opsonizing IgGs against pregnancy-associated malaria. *Infect Immun*, 82 (11):4842-4853.
- Lamikanra AA, Theron M, Kooij TW, Roberts DJ. 2009. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One*, 4 (12):e8446.
- Landis SH, Lokomba V, Ananth CV, Atibu J, Ryder RW, Hartmann KE, Thorp JM, Tshetu A, Meshnick SR. 2009. Impact of maternal malaria and under-nutrition on intrauterine growth restriction: a prospective ultrasound study in Democratic Republic of Congo. *Epidemiol Infect*, 137 (2):294-304.
- Lavstsen T, Salanti A, Jensen AT, Arnot DE, Theander TG. 2003. Sub-grouping of *Plasmodium falciparum* 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. *Malar J*, 2:27.
- Lee WC, Malleret B, Lau YL, Mauduit M, Fong MY, Cho JS, Suwanarusk R, Zhang R, Albrecht L, Costa FT, Preiser P, McGready R, Renia L, Nosten F, Russell B. 2014. Glycophorin C (CD236R) mediates vivax malaria parasite rosetting to normocytes. *Blood*, 123 (18):e100-109.
- Leibson PJ. 1997. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity*, 6 (6):655-661.
- Lindsay S, Ansell J, Selman C, Cox V, Hamilton K, Walraven G. 2000. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet*, 355 (9219):1972.
- Löscher T, Burchard G. 2010. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin*. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Lucchi NW, Peterson DS, Moore JM. 2008. Immunologic activation of human syncytiotrophoblast by *Plasmodium falciparum*. *Malar J*, 7:42.
- Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. 2003. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*, 101 (10):4148-4154.

- Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, Kone A, Harley R, Plowe CV, Doumbo OK, Sztein MB. 2004. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun*, 72 (10):5630-5637.
- Macrailld CA, Anders RF, Foley M, Norton RS. 2011. Apical membrane antigen 1 as an anti-malarial drug target. *Curr Top Med Chem*, 11 (16):2039-2047.
- Magistrado PA, Minja D, Doritchamou J, Ndam NT, John D, Schmiegelow C, Massougbojji A, Dahlback M, Ditlev SB, Pinto VV, Resende M, Lusingu J, Theander TG, Salanti A, Nielsen MA. 2011. High efficacy of anti DBL4varepsilon-VAR2CSA antibodies in inhibition of CSA-binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from pregnant women. *Vaccine*, 29 (3):437-443.
- Mahmoudi S, Keshavarz H. 2017. Efficacy of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine: The need for an alternative development plan. *Hum Vaccin Immunother*, 13 (9):2098-2101.
- Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Omu A, Al-Shamali E, Ashkanani L. 2001. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Hum Reprod*, 16 (10):2219-2226.
- Malhotra I, Dent A, Mungai P, Muchiri E, King CL. 2005. Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. *J Clin Microbiol*, 43 (8):3630-3635.
- Malowany JI, Butany J. 2012. Pathology of sickle cell disease. *Semin Diagn Pathol*, 29 (1):49-55.
- Manyando C, Njunju EM, Virtanen M, Hamed K, Gomes M, Van Geertruyden JP. 2015. Exposure to artemether-lumefantrine (Coartem) in first trimester pregnancy in an observational study in Zambia. *Malar J*, 14:77.
- Marin-Menendez A, Bardaji A, Martinez-Espinosa FE, Botto-Menezes C, Lacerda MV, Ortiz J, Cistero P, Piqueras M, Felger I, Mueller I, Ordi J, del Portillo H, Menendez C, Wahlgren M, Mayor A. 2013. Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLoS Negl Trop Dis*, 7 (4):e2155.
- Maubert B, Fievet N, Tami G, Boudin C, Deloron P. 1998. *Plasmodium falciparum*-isolates from Cameroonian pregnant women do not rosette. *Parasite*, 5 (3):281-283.
- Maubert B, Fievet N, Tami G, Cot M, Boudin C, Deloron P. 1999. Development of antibodies against chondroitin sulfate A-adherent *Plasmodium falciparum* in pregnant women. *Infect Immun*, 67 (10):5367-5371.
- Mavoungou E, Bouyou-Akotet MK, Kremsner PG. 2005. Effects of prolactin and cortisol on natural killer (NK) cell surface expression and function of human natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp44 and NKp30). *Clin Exp Immunol*, 139 (2):287-296.
- Mayor A, Bardaji A, Felger I, King CL, Cistero P, Dobano C, Stanisic DI, Siba P, Wahlgren M, del Portillo H, Mueller I, Menendez C, Ordi J, Rogerson S. 2012. Placental infection with *Plasmodium vivax*: a histopathological and molecular study. *J Infect Dis*, 206 (12):1904-1910.
- Mayor A, Kumar U, Bardaji A, Gupta P, Jimenez A, Hamad A, Sigauque B, Singh B, Quinto L, Kumar S, Gupta PK, Chauhan VS, Dobano C, Alonso PL, Menendez C, Chitnis CE. 2013. Improved pregnancy outcomes in women exposed to malaria with high antibody levels against *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*, 207 (11):1664-1674.
- Mayxay M, Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Loareesuwan S, White NJ. 2001. Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP-2 in successfully treated acute falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95 (2):179-182.

- McClure EM, Meshnick SR, Lazebnik N, Mungai P, King CL, Hudgens M, Goldenberg RL, Siega-Riz AM, Dent AE. 2014. A cohort study of Plasmodium falciparum malaria in pregnancy and associations with uteroplacental blood flow and fetal anthropometrics in Kenya. *Int J Gynaecol Obstet*, 126 (1):78-82.
- McGready R, Davison BB, Stepniewska K, Cho T, Shee H, Brockman A, Udomsangpetch R, Looareesuwan S, White NJ, Meshnick SR, Nosten F. 2004. The effects of Plasmodium falciparum and P. vivax infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*, 70 (4):398-407.
- McGready R, Lee SJ, Wiladphaingern J, Ashley EA, Rijken MJ, Boel M, Simpson JA, Paw MK, Pimanpanarak M, Mu O, Singhasivanon P, White NJ, Nosten FH. 2012. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: a population-based study. *Lancet Infect Dis*, 12 (5):388-396.
- McGregor IA. 1984. Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*, 33 (4):517-525.
- McKee AS, Burchill MA, Munks MW, Jin L, Kappler JW, Friedman RS, Jacobelli J, Marrack P. 2013. Host DNA released in response to aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (12):E1122-1131.
- McLean AR, Ataide R, Simpson JA, Beeson JG, Fowkes FJ. 2015. Malaria and immunity during pregnancy and postpartum: a tale of two species. *Parasitology*, 142 (8):999-1015.
- Megnekou R, Staalsoe T, Taylor DW, Leke R, Hviid L. 2005. Effects of pregnancy and intensity of Plasmodium falciparum transmission on immunoglobulin G subclass responses to variant surface antigens. *Infect Immun*, 73 (7):4112-4118.
- Megnekou R, Djontu JC, Bigoga JD, Lissom A, Magagoum SH. 2015a. Role of some biomarkers in placental malaria in women living in Yaounde, Cameroon. *Acta Trop*, 141 (Pt A):97-102.
- Megnekou R, Tenou S, Bigoga JD, Djontu JC, Medou FM, Lissom A. 2015b. Placental malaria and modulation of immune and hormonal responses in Cameroonian women. *Acta Trop*, 147:23-30.
- Mendes C, Dias F, Figueiredo J, Mora VG, Cano J, de Sousa B, do Rosario VE, Benito A, Berzosa P, Arez AP. 2011. Duffy negative antigen is no longer a barrier to Plasmodium vivax--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis*, 5 (6):e1192.
- Menendez C, Mayor A. 2007. Congenital malaria: the least known consequence of malaria in pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med*, 12 (3):207-213.
- Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, Font F, Alonso PL. 2000. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis*, 181 (5):1740-1745.
- Meyer CG. 2007. *Tropenmedizin Infektionskrankheiten*. 2. Aufl. Landsberg: ecomed Medizin.
- Miller LH, Ackerman HC, Su XZ, Wellems TE. 2013. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*, 19 (2):156-167.
- Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C, Thompson WN, Bienzle U. 2000. Submicroscopic Plasmodium falciparum infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health*, 5 (3):167-173.
- Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, von Gaertner C, Boye R, Fricke K, Hannibal I, Karakaya F, Schaller M, Ulmen U, Acquah PA, Dietz E, Eggelte TA, Bienzle U. 2006. Detection and clinical manifestation of placental malaria in southern Ghana. *Malar J*, 5:119.

- Mohammed AH, Salih MM, Elhassan EM, Mohmmmed AA, Elzaki SE, El-Sayed BB, Adam I. 2013. Submicroscopic Plasmodium falciparum malaria and low birth weight in an area of unstable malaria transmission in Central Sudan. *Malar J*, 12:172.
- Mohan K, Dubey ML, Ganguly NK, Mahajan RC. 1995. Plasmodium falciparum: role of activated blood monocytes in erythrocyte membrane damage and red cell loss during malaria. *Exp Parasitol*, 80 (1):54-63.
- Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. 2017. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol*.
- Mokuolu OA, Falade CO, Orogade AA, Okafor HU, Adedoyin OT, Oguonu TA, Dada-Adegbola HO, Oguntayo OA, Ernest SK, Hamer DH, Callahan MV. 2009. Malaria at parturition in Nigeria: current status and delivery outcome. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2009:473971.
- Moore JM, Nahlen BL, Misore A, Lal AA, Udhayakumar V. 1999. Immunity to placental malaria. I. Elevated production of interferon-gamma by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria. *J Infect Dis*, 179 (5):1218-1225.
- Moore KA, Simpson JA, Paw MK, Pimanpanarak M, Wiladphaingern J, Rijken MJ, Jittamala P, White NJ, Fowkes FJ, Nosten F, McGready R. 2016. Safety of artemisinins in first trimester of prospectively followed pregnancies: an observational study. *Lancet Infect Dis*.
- Moore KL, Persaud TVN. 1996. *Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen*. 4. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer.
- Moore KL, Persaud TVN. 2007. *Embryologie: Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik*. 5. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Moormann AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ, Nyirenda T, Meshnick SR. 1999. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis*, 180 (6):1987-1993.
- Mosha D, Mazuguni F, Mrema S, Sevene E, Abdulla S, Genton B. 2014. Safety of artemether-lumefantrine exposure in first trimester of pregnancy: an observational cohort. *Malar J*, 13:197.
- Muehlenbachs A, Mutabingwa TK, Edmonds S, Fried M, Duffy PE. 2006. Hypertension and maternal-fetal conflict during placental malaria. *PLoS Med*, 3 (11):e446.
- Muehlenbachs A, Fried M, McGready R, Harrington WE, Mutabingwa TK, Nosten F, Duffy PE. 2010. A novel histological grading scheme for placental malaria applied in areas of high and low malaria transmission. *J Infect Dis*, 202 (10):1608-1616.
- Muehlenbachs A, Nabasumba C, McGready R, Turyakira E, Tumwebaze B, Dhorda M, Nyehangane D, Nalusaji A, Nosten F, Guerin PJ, Piola P. 2012. Artemether-lumefantrine to treat malaria in pregnancy is associated with reduced placental haemozoin deposition compared to quinine in a randomized controlled trial. *Malar J*, 11:150.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 281 (5380):1191-1193.
- Murphy K, Travers P, Walport M. 2009. *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Muthusamy A, Achur RN, Bhavanandan VP, Fouda GG, Taylor DW, Gowda DC. 2004. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes adhere both in the intervillous space and on the villous surface of human placenta by binding to the low-sulfated chondroitin sulfate proteoglycan receptor. *Am J Pathol*, 164 (6):2013-2025.

- Muthusamy A, Achur RN, Valiyaveetil M, Botti JJ, Taylor DW, Leke RF, Gowda DC. 2007. Chondroitin sulfate proteoglycan but not hyaluronic acid is the receptor for the adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in human placenta, and infected red blood cell adherence up-regulates the receptor expression. *Am J Pathol*, 170 (6):1989-2000.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P. 2012. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie*. 10. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Ndam NT, Deneud-Ndam L, Doritchamou J, Viwami F, Salanti A, Nielsen MA, Fievet N, Massougbdji A, Luty AJ, Deloron P. 2015. Protective Antibodies against Placental Malaria and Poor Outcomes during Pregnancy, Benin. *Emerg Infect Dis*, 21 (5):813-823.
- Ndao CT, Dumont A, Fievet N, Doucoure S, Gaye A, Lehesran JY. 2009. Placental malarial infection as a risk factor for hypertensive disorders during pregnancy in Africa: a case-control study in an urban area of Senegal, West Africa. *Am J Epidemiol*, 170 (7):847-853.
- Ndungu FM, Urban BC, Marsh K, Langhorne J. 2005. Regulation of immune response by *Plasmodium*-infected red blood cells. *Parasite Immunol*, 27 (10-11):373-384.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. 2004. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*, 113 (9):1271-1276.
- Newman RD, Hailemariam A, Jimma D, Degifie A, Kebede D, Rietveld AE, Nahlen BL, Barnwell JW, Steketee RW, Parise ME. 2003. Burden of malaria during pregnancy in areas of stable and unstable transmission in Ethiopia during a nonepidemic year. *J Infect Dis*, 187 (11):1765-1772.
- Nicklas W, Cußler K, Hartinger J. 1997. *Tierschutzaspekte bei der Immunisierung von Versuchstieren*. Heidelberg, Langen: Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V.
- Nielsen MA 2017. 11.09.2017. Placental Malaria Vaccine (PlacMalVac). Kopenhagen, Dänemark. http://cmp.ku.dk/funding_collaborations/placmalvac/.
- Nielsen MA 2017. 11.09.2017. Placental Malaria Vaccine (PlacMalVac), main results and significance. Kopenhagen, Dänemark. http://cmp.ku.dk/funding_collaborations/placmalvac/results/.
- Nielsen MA, Salanti A. 2015. High-Throughput Testing of Antibody-Dependent Binding Inhibition of Placental Malaria Parasites. *Methods Mol Biol*, 1325:241-253.
- Nielsen MA, Resende M, Alifrangis M, Turner L, Hviid L, Theander TG, Salanti A. 2007. *Plasmodium falciparum*: VAR2CSA expressed during pregnancy-associated malaria is partially resistant to proteolytic cleavage by trypsin. *Exp Parasitol*, 117 (1):1-8.
- Nielsen MA, Pinto VV, Resende M, Dahlback M, Ditlev SB, Theander TG, Salanti A. 2009. Induction of adhesion-inhibitory antibodies against placental *Plasmodium falciparum* parasites by using single domains of VAR2CSA. *Infect Immun*, 77 (6):2482-2487.
- Nielsen MA, Resende M, de Jongh WA, Ditlev SB, Mordmuller B, Houard S, Ndam NT, Agerbaek MO, Hamborg M, Massougbdji A, Issifou S, Strobaek A, Poulsen L, Leroy O, Kremsner PG, Chippaux JP, Luty AJ, Deloron P, Theander TG, Dyring C, Salanti A. 2015. The Influence of Sub-Unit Composition and Expression System on the Functional Antibody Response in the Development of a VAR2CSA Based *Plasmodium falciparum* Placental Malaria Vaccine. *PLoS One*, 10 (9):e0135406.
- Nietfeld JJ, Huber-Bruning O, Bylsma JW. 1994. Cytokines and proteoglycans. *EXS*, 70:215-242.
- Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. 2004. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? *Trends Parasitol*, 20 (9):425-432.

- Nweneka CV, Doherty CP, Cox S, Prentice A. 2010. Iron delocalisation in the pathogenesis of malarial anaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 104 (3):175-184.
- O'Neil-Dunne I, Achur RN, Agbor-Enoh ST, Valiyaveetil M, Naik RS, Ockenhouse CF, Zhou A, Megnekou R, Leke R, Taylor DW, Gowda DC. 2001. Gravity-dependent production of antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy. *Infect Immun*, 69 (12):7487-7492.
- Odhiambo CO, Otieno W, Adhiambo C, Odera MM, Stoute JA. 2008. Increased deposition of C3b on red cells with low CR1 and CD55 in a malaria-endemic region of western Kenya: implications for the development of severe anemia. *BMC Med*, 6:23.
- Ofori M, Ansah E, Agyepong I, Ofori-Adjei D, Hviid L, Akanmori B. 2009. Pregnancy-associated malaria in a rural community of Ghana. *Ghana Med J*, 43 (1):13-18.
- Okoko BJ, Ota MO, Yamuah LK, Idiong D, Mkpanam SN, Avieka A, Banya WA, Osinusi K. 2002. Influence of placental malaria infection on foetal outcome in the Gambia: twenty years after Ian Mcgregor. *J Health Popul Nutr*, 20 (1):4-11.
- Oleinikov AV, Rossnagle E, Francis S, Mutabingwa TK, Fried M, Duffy PE. 2007. Effects of sex, parity, and sequence variation on seroreactivity to candidate pregnancy malaria vaccine antigens. *J Infect Dis*, 196 (1):155-164.
- Oleinikov AV, Francis SE, Dorfman JR, Rossnagle E, Balcaitis S, Getz T, Avril M, Gose S, Smith JD, Fried M, Duffy PE. 2008. VAR2CSA domains expressed in *Escherichia coli* induce cross-reactive antibodies to native protein. *J Infect Dis*, 197 (8):1119-1123.
- Oraneli BU, Okeke OC, Ubachukwu PO. 2013. Effect of placental malaria on birth weight of babies in Nnewi, Anambra state, Nigeria. *J Vector Borne Dis*, 50 (1):13-17.
- Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Kahigwa E, Hirt R, Cardesa A, Alonso PL, Menendez C. 1998. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol*, 22 (8):1006-1011.
- Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacin A, Kahigwa E, Ferrer B, Cardesa A, Alonso PL. 2001. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J Infect Dis*, 183 (7):1100-1107.
- Orish VN, Onyeabor OS, Boampong JN, Aforakwah R, Nwaefuna E, Iriemenam NC. 2012. Adolescent pregnancy and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and anaemia—a pilot study from Sekondi-Takoradi metropolis, Ghana. *Acta Trop*, 123 (3):244-248.
- Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V. 1999. A low interleukin-10 tumor necrosis factor- α ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis*, 179 (1):279-282.
- Othoro C, Moore JM, Wannemuehler KA, Moses S, Lal A, Otieno J, Nahlen B, Slutsker L, Shi YP. 2008. Elevated gamma interferon-producing NK cells, CD45RO memory-like T cells, and CD4 T cells are associated with protection against malaria infection in pregnancy. *Infect Immun*, 76 (4):1678-1685.
- Paget-McNicol S, Gatton M, Hastings I, Saul A. 2002. The *Plasmodium falciparum* var gene switching rate, switching mechanism and patterns of parasite recrudescence described by mathematical modelling. *Parasitology*, 124 (Pt 3):225-235.
- Parry E, Godfrey R, Mabey D, Gill G. 2004. *Principles of Medicine in Africa*. 3. Aufl. Cambridge: Cambridge University Press.

- Pasternak ND, Dzikowski R. 2009. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol*, 41 (7):1463-1466.
- Pehrson C, Salanti A, Theander TG, Nielsen MA. 2017a. Pre-clinical and clinical development of the first placental malaria vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 16 (6):613-624.
- Pehrson C, Heno KK, Adams Y, Resende M, Mathiesen L, Soegaard M, de Jongh WA, Theander TG, Salanti A, Nielsen MA. 2017b. Comparison of functional assays used in the clinical development of a placental malaria vaccine. *Vaccine*, 35 (4):610-618.
- Pehrson C, Mathiesen L, Heno KK, Salanti A, Resende M, Dzikowski R, Damm P, Hansson SR, King CL, Schneider H, Wang CW, Lavstsen T, Theander TG, Knudsen LE, Nielsen MA. 2016. Adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in ex vivo perfused placental tissue: a novel model of placental malaria. *Malar J*, 15 (1):292.
- Perkins DJ, Weinberg JB, Kremsner PG. 2000. Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis*, 182 (3):988-992.
- Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. 2011. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci*, 7 (9):1427-1442.
- Peters PJ, Thigpen MC, Parise ME, Newman RD. 2007. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf*, 30 (6):481-501.
- Peters W, Pasvol G. 2006. *Atlas of Tropical Medicine and Parasitology*. 6. Aufl. Edinburgh: Elsevier Health Sciences Mosby.
- Pfleiderer M, Wichmann O. 2014. *Von der Zulassung von Impfstoffen zur Empfehlung durch die Ständige Impfkommission in Deutschland*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag GmbH.
- Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. 2000. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol*, 109 (1):30-33.
- Pinto VV, Ditlev SB, Jensen KE, Resende M, Dahlback M, Andersen G, Andersen P, Theander TG, Salanti A, Nielsen MA. 2011. Differential induction of functional IgG using the *Plasmodium falciparum* placental malaria vaccine candidate VAR2CSA. *PLoS One*, 6 (3):e17942.
- Pinto VV, Salanti A, Joergensen LM, Dahlback M, Resende M, Ditlev SB, Agger EM, Arnot DE, Theander TG, Nielsen MA. 2012. The effect of adjuvants on the immune response induced by a DBL4varepsilon-ID4 VAR2CSA based *Plasmodium falciparum* vaccine against placental malaria. *Vaccine*, 30 (3):572-579.
- Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Warikar N, Seal A, McGready R, Sugiarto P, Tjitra E, Anstey NM, Price RN. 2008. Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant *plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections are endemic. *Clin Infect Dis*, 46 (9):1374-1381.
- Poovassery J, Moore JM. 2009. Association of malaria-induced murine pregnancy failure with robust peripheral and placental cytokine responses. *Infect Immun*, 77 (11):4998-5006.
- Poovassery JS, Sarr D, Smith G, Nagy T, Moore JM. 2009. Malaria-induced murine pregnancy failure: distinct roles for IFN-gamma and TNF. *J Immunol*, 183 (8):5342-5349.
- Porter RR. 1973. Structural studies of immunoglobulins. *Science*, 180 (4087):713-716.

- Radeva-Petrova D, Kayentao K, ter Kuile FO, Sinclair D, Garner P. 2014. Drugs for preventing malaria in pregnant women in endemic areas: any drug regimen versus placebo or no treatment. *Cochrane Database Syst Rev*, (10):CD000169.
- Raghupathy R. 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today*, 18 (10):478-482.
- Rasti N, Namusoke F, Chene A, Chen Q, Staalsoe T, Klinkert MQ, Mirembe F, Kironde F, Wahlgren M. 2006. Nonimmune immunoglobulin binding and multiple adhesion characterize *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes of placental origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (37):13795-13800.
- RBM. 2015. Action and Investment to defeat Malaria 2016 - 2030, for a Malaria-Free World. London, United Kingdom: World Health Organisation, Roll Back Malaria Partnership (RBM).
- Reister F. 2007. Gynäkologie und Geburtshilfe. 1. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer.
- Resende M, Nielsen MA, Dahlback M, Ditlev SB, Andersen P, Sander AF, Ndam NT, Theander TG, Salanti A. 2008. Identification of glycosaminoglycan binding regions in the *Plasmodium falciparum* encoded placental sequestration ligand, VAR2CSA. *Malar J*, 7:104.
- Resende M, Ditlev SB, Nielsen MA, Bodevin S, Bruun S, Pinto VV, Clausen H, Turner L, Theander TG, Salanti A, Dahlback M. 2009. Chondroitin sulphate A (CSA)-binding of single recombinant Duffy-binding-like domains is not restricted to *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 expressed by CSA-binding parasites. *Int J Parasitol*, 39 (11):1195-1204.
- Ricke CH, Staalsoe T, Koram K, Akanmori BD, Riley EM, Theander TG, Hviid L. 2000. Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A. *J Immunol*, 165 (6):3309-3316.
- Riedl J, Mordmüller B, Koder S, Pabinger I, Kremsner PG, Hoffman SL, Ramharter M, Ay C. 2016. Alterations of blood coagulation in controlled human malaria infection. *Malar J*, 15 (1):15.
- Rieger H, Yoshikawa HY, Quadt K, Nielsen MA, Sanchez CP, Salanti A, Tanaka M, Lanzer M. 2015. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate is cooperative and shear enhanced. *Blood*, 125 (2):383-391.
- Rink L, Kruse A, Haase H. 2012. Immunologie für Einsteiger. 1. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Roberts JM, Lain KY. 2002. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*, 23 (5):359-372.
- Robinson DP, Klein SL. 2012. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav*, 62 (3):263-271.
- Robinson HL, Pertmer TM. 2000. DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications. *Adv Virus Res*, 55:1-74.
- Rogerson SJ, Mkundika P, Kanjala MK. 2003a. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria at delivery: comparison of blood film preparation methods and of blood films with histology. *J Clin Microbiol*, 41 (4):1370-1374.
- Rogerson SJ, Mwapasa V, Meshnick SR. 2007a. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg*, 77 (6 Suppl):14-22.
- Rogerson SJ, Beeson JG, Mhango CG, Dzinjalama FK, Molyneux ME. 2000a. *Plasmodium falciparum* rosette formation is uncommon in isolates from pregnant women. *Infect Immun*, 68 (1):391-393.

- Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. 2007b. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*, 7 (2):105-117.
- Rogerson SJ, van den Broek NR, Chaluluka E, Qongwane C, Mhango CG, Molyneux ME. 2000b. Malaria and anemia in antenatal women in Blantyre, Malawi: a twelve-month survey. *Am J Trop Med Hyg*, 62 (3):335-340.
- Rogerson SJ, Pollina E, Getachew A, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME. 2003b. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg*, 68 (1):115-119.
- Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, Abrams ET, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME. 2003c. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun*, 71 (1):267-270.
- Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. 2015. Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci*:1-19.
- Rouhani M, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND. 2015. Comparative analysis of the profiles of IgG subclass-specific responses to *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1 and merozoite surface protein-1 in naturally exposed individuals living in malaria hypoendemic settings, Iran. *Malar J*, 14:58.
- Rovira-Vallbona E, Monteiro I, Bardaji A, Serra-Casas E, Neafsey DE, Quelhas D, Valim C, Alonso P, Dobano C, Ordi J, Menendez C, Mayor A. 2013. VAR2CSA signatures of high *Plasmodium falciparum* parasitemia in the placenta. *PLoS One*, 8 (7):e69753.
- Rowe JA, Kyes SA, Rogerson SJ, Babiker HA, Raza A. 2002. Identification of a conserved *Plasmodium falciparum* var gene implicated in malaria in pregnancy. *J Infect Dis*, 185 (8):1207-1211.
- Ruizendaal E, Tahita MC, Geskus RB, Versteeg I, Scott S, d'Alessandro U, Lompo P, Derra K, Traore-Coulibaly M, de Jong MD, Schallig H, Tinto H, Mens PF. 2017. Increase in the prevalence of mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates collected from early to late pregnancy in Nanoro, Burkina Faso. *Malar J*, 16 (1):179.
- Sadler TW. 2014. Embryologie Taschenlehrbuch. 12. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Salanti A, Staalsoe T, Lavstsen T, Jensen AT, Sowa MP, Arnot DE, Hviid L, Theander TG. 2003. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol Microbiol*, 49 (1):179-191.
- Salanti A, Resende M, Ditlev SB, Pinto VV, Dahlback M, Andersen G, Manczak T, Theander TG, Nielsen MA. 2010. Several domains from VAR2CSA can induce *Plasmodium falciparum* adhesion-blocking antibodies. *Malar J*, 9:11.
- Salanti A, Jensen AT, Zornig HD, Staalsoe T, Joergensen L, Nielsen MA, Khattab A, Arnot DE, Klinkert MQ, Hviid L, Theander TG. 2002. A sub-family of common and highly conserved *Plasmodium falciparum* var genes. *Mol Biochem Parasitol*, 122 (1):111-115.
- Salanti A, Dahlback M, Turner L, Nielsen MA, Barfod L, Magistrado P, Jensen AT, Lavstsen T, Ofori MF, Marsh K, Hviid L, Theander TG. 2004. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med*, 200 (9):1197-1203.
- Sander AF, Salanti A, Lavstsen T, Nielsen MA, Magistrado P, Lusingu J, Ndam NT, Arnot DE. 2009. Multiple var2csa-type PfEMP1 genes located at different chromosomal loci occur in many *Plasmodium falciparum* isolates. *PLoS One*, 4 (8):e6667.

- Sartelet H, Schleiermacher D, Le-Hesran JY, Graesslin O, Gaillard D, Fe M, Lechki C, Gaye A, Le Bouteiller P, Birembaut P. 2005. Less HLA-G expression in Plasmodium falciparum-infected third trimester placentas is associated with more natural killer cells. *Placenta*, 26 (6):505-511.
- Sasaki S, Takeshita F, Xin KQ, Ishii N, Okuda K. 2003. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods*, 31 (3):243-254.
- Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S. 2007. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*, 149 (1):139-145.
- Saveria T, Duffy PE, Fried M. 2015. Evaluation of Pregnancy Malaria Vaccine Candidates: The Binding Inhibition Assay. *Methods Mol Biol*, 1325:231-239.
- Saveria T, Oleinikov AV, Williamson K, Chaturvedi R, Lograsso J, Keitany GJ, Fried M, Duffy P. 2013. Antibodies to Escherichia coli-expressed C-terminal domains of Plasmodium falciparum variant surface antigen 2-chondroitin sulfate A (VAR2CSA) inhibit binding of CSA-adherent parasites to placental tissue. *Infect Immun*, 81 (4):1031-1039.
- Schantz-Dunn J, Nour NM. 2009. Malaria and pregnancy: a global health perspective. *Rev Obstet Gynecol*, 2 (3):186-192.
- Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, Pouvelle B, Gysin J, Lanzer M. 1998. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in Plasmodium falciparum. *EMBO J*, 17 (18):5418-5426.
- Schmidt CQ, Kennedy AT, Tham WH. 2015. More than just immune evasion: Hijacking complement by Plasmodium falciparum. *Mol Immunol*, 67 (1):71-84.
- Schofield L, Grau GE. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, 5 (9):722-735.
- Semblat JP, Raza A, Kyes SA, Rowe JA. 2006. Identification of Plasmodium falciparum var1CSA and var2CSA domains that bind IgM natural antibodies. *Mol Biochem Parasitol*, 146 (2):192-197.
- Sennang N, Rogerson S, Wahyuni S, Yusuf I, Syafruddin D. 2014. Antibody response against three Plasmodium falciparum merozoite antigens in Mamuju District, West Sulawesi Province, Indonesia. *Malar J*, 13:381.
- Shulman CE, Marshall T, Dorman EK, Bulmer JN, Cutts F, Peshu N, Marsh K. 2001. Malaria in pregnancy: adverse effects on haemoglobin levels and birthweight in primigravidae and multigravidae. *Trop Med Int Health*, 6 (10):770-778.
- Silver KL, Zhong K, Leke RG, Taylor DW, Kain KC. 2010. Dysregulation of angiopoietins is associated with placental malaria and low birth weight. *PLoS One*, 5 (3):e9481.
- Silver KL, Conroy AL, Leke RG, Leke RJ, Gwanmesia P, Molyneux ME, Taylor DW, Rogerson SJ, Kain KC. 2011. Circulating soluble endoglin levels in pregnant women in Cameroon and Malawi--associations with placental malaria and fetal growth restriction. *PLoS One*, 6 (9):e24985.
- Sinclair D, Zani B, Donegan S, Olliaro P, Garner P. 2009. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):CD007483.
- Singer LM, Newman RD, Diarra A, Moran AC, Huber CS, Stennies G, Sirima SB, Konate A, Yameogo M, Sawadogo R, Barnwell JW, Parise ME. 2004. Evaluation of a malaria rapid diagnostic test for assessing the burden of malaria during pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*, 70 (5):481-485.

- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 363 (9414):1017-1024.
- Singh K, Gittis AG, Nguyen P, Gowda DC, Miller LH, Garboczi DN. 2008. Structure of the DBL3x domain of pregnancy-associated malaria protein VAR2CSA complexed with chondroitin sulfate A. *Nat Struct Mol Biol*, 15 (9):932-938.
- Singh N, Bharti PK, Singh MP, Singh R, Yeboah-Antwi K, Desai M, Udhayakumar V, Muniyandi M, Hamer DH, Wylie BJ. 2015. What is the burden of submicroscopic malaria in pregnancy in central India? *Pathog Glob Health*, 109 (1):30-38.
- Smith JD, Gamain B, Baruch DI, Kyes S. 2001. Decoding the language of var genes and *Plasmodium falciparum* sequestration. *Trends Parasitol*, 17 (11):538-545.
- Snow RW, Nahlen B, Palmer A, Donnelly CA, Gupta S, Marsh K. 1998. Risk of severe malaria among African infants: direct evidence of clinical protection during early infancy. *J Infect Dis*, 177 (3):819-822.
- Souza RM, Ataide R, Dombrowski JG, Ippolito V, Aitken EH, Valle SN, Alvarez JM, Epiphanyo S, Marinho CR. 2013. Placental histopathological changes associated with *Plasmodium vivax* infection during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis*, 7 (2):e2071.
- Spieß H, Heininger U, Jilg W. 2011. *Impfkompendium*. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Srivastava A, Gangnard S, Dechavanne S, Amirat F, Lewit Bentley A, Bentley GA, Gamain B. 2011. Var2CSA minimal CSA binding region is located within the N-terminal region. *PLoS One*, 6 (5):e20270.
- Srivastava A, Gangnard S, Round A, Dechavanne S, Juillerat A, Raynal B, Faure G, Baron B, Ramboarina S, Singh SK, Belrhali H, England P, Lewit-Bentley A, Scherf A, Bentley GA, Gamain B. 2010. Full-length extracellular region of the var2CSA variant of PfEMP1 is required for specific, high-affinity binding to CSA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (11):4884-4889.
- Staalsoe T, Shulman CE, Bulmer JN, Kawuondo K, Marsh K, Hviid L. 2004. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, 363 (9405):283-289.
- Staalsoe T, Megnekou R, Fievet N, Ricke CH, Zornig HD, Leke R, Taylor DW, Deloron P, Hviid L. 2001. Acquisition and decay of antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes that protect against placental parasitemia. *J Infect Dis*, 184 (5):618-626.
- Stanisic DI, Fowkes FJ, Koinari M, Javati S, Lin E, Kiniboro B, Richards JS, Robinson LJ, Schofield L, Kazura JW, King CL, Zimmerman P, Felger I, Siba PM, Mueller I, Beeson JG. 2015. Acquisition of antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response. *Infect Immun*, 83 (2):646-660.
- Stefan I. 2015. Combination therapy - a way to forestall artemisinin resistance and optimize uncomplicated malaria treatment. *J Med Life*, 8 (3):326-328.
- Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toerner A, Meuer S, Sohn C. 2008. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol*, 129 (3):401-412.
- Steinborn A, Schmitt E, Kisielewicz A, Rechenberg S, Seissler N, Mahnke K, Schaiër M, Zeier M, Sohn C. 2012. Pregnancy-associated diseases are characterized by the composition of the systemic regulatory T cell (Treg) pool with distinct subsets of Tregs. *Clin Exp Immunol*, 167 (1):84-98.

- Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. 2001. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*, 64 (1-2 Suppl):28-35.
- Stevenson L, Huda P, Jeppesen A, Laursen E, Rowe JA, Craig A, Streicher W, Barfod L, Hviid L. 2015. Investigating the function of Fc-specific binding of IgM to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 mediating erythrocyte rosetting. *Cell Microbiol*, 17 (6):819-831.
- Suguitan AL, Jr., Leke RG, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, Fogako J, Megnekou R, Taylor DW. 2003a. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis*, 188 (7):1074-1082.
- Suguitan AL, Jr., Cadigan TJ, Nguyen TA, Zhou A, Leke RJ, Metenou S, Thuita L, Megnekou R, Fogako J, Leke RG, Taylor DW. 2003b. Malaria-associated cytokine changes in the placenta of women with pre-term deliveries in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*, 69 (6):574-581.
- Sule-Odu AO, Ogunledun A, Olatunji AO. 2002. Impact of asymptomatic maternal malaria parasitaemia at parturition on perinatal outcome. *J Obstet Gynaecol*, 22 (1):25-28.
- Sulica A, Morel P, Metes D, Herberman RB. 2001. Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *Int Rev Immunol*, 20 (3-4):371-414.
- Sun Y, Hu YH, Liu CS, Sun L. 2010. Construction and analysis of an experimental Streptococcus iniae DNA vaccine. *Vaccine*, 28 (23):3905-3912.
- Tako EA, Zhou A, Lohoue J, Leke R, Taylor DW, Leke RF. 2005. Risk factors for placental malaria and its effect on pregnancy outcome in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*, 72 (3):236-242.
- Talundzic E, Shah S, Fawole O, Owino S, Moore JM, Peterson DS. 2012. Sequence polymorphism, segmental recombination and toggling amino acid residues within the DBL3X domain of the VAR2CSA placental malaria antigen. *PLoS One*, 7 (2):e31565.
- Taylor DW, Zhou A, Marsillio LE, Thuita LW, Leke EB, Branch O, Gowda DC, Long C, Leke RF. 2004. Antibodies that inhibit binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A and to the C terminus of merozoite surface protein 1 correlate with reduced placental malaria in Cameroonian women. *Infect Immun*, 72 (3):1603-1607.
- The Nobel Assembly at Karolinska Institutet 2016. 17.03.2016. The 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine <http://www.nobelprizemedicine.org/press-materials/>.
- Thevenon AD, Zhou JA, Megnekou R, Ako S, Leke RG, Taylor DW. 2010. Elevated levels of soluble TNF receptors 1 and 2 correlate with Plasmodium falciparum parasitemia in pregnant women: potential markers for malaria-associated inflammation. *J Immunol*, 185 (11):7115-7122.
- Thongsong B, Subramanian RK, Ganapathy V, Prasad PD. 2005. Inhibition of amino acid transport system a by interleukin-1beta in trophoblasts. *J Soc Gynecol Investig*, 12 (7):495-503.
- Thrane S, Janitzek CM, Agerbaek MO, Ditlev SB, Resende M, Nielsen MA, Theander TG, Salanti A, Sander AF. 2015. A Novel Virus-Like Particle Based Vaccine Platform Displaying the Placental Malaria Antigen VAR2CSA. *PLoS One*, 10 (11):e0143071.
- Thrane S, Janitzek CM, Matondo S, Resende M, Gustavsson T, de Jongh WA, Clemmensen S, Roeffen W, van de Vegte-Bolmer M, van Gemert GJ, Sauerwein R, Schiller JT, Nielsen MA, Theander TG, Salanti A, Sander AF. 2016. Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines. *J Nanobiotechnology*, 14:30.
- Tjitra E, Suprianto S, McBroom J, Currie BJ, Anstey NM. 2001. Persistent ICT malaria P.f/P.v panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of Plasmodium falciparum malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnoses of Plasmodium vivax in convalescence. *J Clin Microbiol*, 39 (3):1025-1031.

- Trimnell AR, Kraemer SM, Mukherjee S, Phippard DJ, Janes JH, Flamoe E, Su XZ, Awadalla P, Smith JD. 2006. Global genetic diversity and evolution of var genes associated with placental and severe childhood malaria. *Mol Biochem Parasitol*, 148 (2):169-180.
- Tuikue-Ndam N, Deloron P. 2015. Developing vaccines to prevent malaria in pregnant women. *Expert Opin Biol Ther*, 15 (8):1173-1182.
- Tuikue Ndam N, Bischoff E, Proux C, Lavstsen T, Salanti A, Guitard J, Nielsen MA, Coppee JY, Gaye A, Theander T, David PH, Deloron P. 2008. Plasmodium falciparum transcriptome analysis reveals pregnancy malaria associated gene expression. *PLoS One*, 3 (3):e1855.
- Tuikue Ndam NG, Salanti A, Bertin G, Dahlback M, Fievet N, Turner L, Gaye A, Theander T, Deloron P. 2005. High level of var2csa transcription by Plasmodium falciparum isolated from the placenta. *J Infect Dis*, 192 (2):331-335.
- Tuikue Ndam NG, Salanti A, Le-Hesran JY, Cottrell G, Fievet N, Turner L, Sow S, Dangou JM, Theander T, Deloron P. 2006. Dynamics of anti-VAR2CSA immunoglobulin G response in a cohort of senegalese pregnant women. *J Infect Dis*, 193 (5):713-720.
- Tutterrow YL, Salanti A, Avril M, Smith JD, Pagano IS, Ako S, Fogako J, Leke RG, Taylor DW. 2012a. High avidity antibodies to full-length VAR2CSA correlate with absence of placental malaria. *PLoS One*, 7 (6):e40049.
- Tutterrow YL, Avril M, Singh K, Long CA, Leke RJ, Sama G, Salanti A, Smith JD, Leke RG, Taylor DW. 2012b. High levels of antibodies to multiple domains and strains of VAR2CSA correlate with the absence of placental malaria in Cameroonian women living in an area of high Plasmodium falciparum transmission. *Infect Immun*, 80 (4):1479-1490.
- Tyberghein A, Deroost K, Schwarzer E, Arese P, Van den Steen PE. 2014. Immunopathological effects of malaria pigment or hemozoin and other crystals. *Biofactors*, 40 (1):59-78.
- Ulfig N. 2005. Embryologie Kurzlehrbuch. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Umbers AJ, Aitken EH, Rogerson SJ. 2011a. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. *Trends Parasitol*, 27 (4):168-175.
- Umbers AJ, Boeuf P, Clapham C, Stanistic DI, Baiwog F, Mueller I, Siba P, King CL, Beeson JG, Glazier J, Rogerson SJ. 2011b. Placental malaria-associated inflammation disturbs the insulin-like growth factor axis of fetal growth regulation. *J Infect Dis*, 203 (4):561-569.
- UN. 2015. Millenniums-Entwicklungsziele, Bericht 2015. New York: United Nations.
- Uneke CJ. 2008a. Impact of placental Plasmodium falciparum malaria on pregnancy and perinatal outcome in sub-Saharan Africa: part III: placental malaria, maternal health, and public health. *Yale J Biol Med*, 81 (1):1-7.
- Uneke CJ. 2008b. Diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in pregnancy in sub-Saharan Africa: the challenges and public health implications. *Parasitol Res*, 102 (3):333-342.
- Unger HW, Ashorn P, Cates JE, Dewey KG, Rogerson SJ. 2016. Undernutrition and malaria in pregnancy - a dangerous dyad? *BMC Med*, 14 (1):142.
- Unger HW, Ome-Kaius M, Karl S, Singirok D, Siba P, Walker J, Wangnapi RA, Mueller I, Rogerson SJ. 2015. Factors associated with ultrasound-aided detection of suboptimal fetal growth in a malaria-endemic area in Papua New Guinea. *BMC Pregnancy Childbirth*, 15:83.
- Valente B, Campos PA, do Rosario VE, Varandas L, Silveira H. 2011. Prevalence and risk factors of Plasmodium falciparum infections in pregnant women of Luanda, Angola. *Trop Med Int Health*, 16 (10):1206-1214.

- van den Broek NR, Letsky EA. 2000. Etiology of anemia in pregnancy in south Malawi. *Am J Clin Nutr*, 72 (1 Suppl):247S-256S.
- Viebig NK, Gamain B, Scheidig C, Lepolard C, Przyborski J, Lanzer M, Gysin J, Scherf A. 2005. A single member of the *Plasmodium falciparum* var multigene family determines cytoadhesion to the placental receptor chondroitin sulphate A. *EMBO Rep*, 6 (8):775-781.
- Viebig NK, Levin E, Dechavanne S, Rogerson SJ, Gysin J, Smith JD, Scherf A, Gamain B. 2007. Disruption of var2csa gene impairs placental malaria associated adhesion phenotype. *PLoS One*, 2 (9):e910.
- Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA. 2000. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood*, 95 (4):1481-1486.
- Walker-Abbey A, Djokam RR, Eno A, Leke RF, Titanji VP, Fogako J, Sama G, Thuita LH, Beardslee E, Snounou G, Zhou A, Taylor DW. 2005. Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. *Am J Trop Med Hyg*, 72 (3):229-235.
- Walter PR, Garin Y, Blot P. 1982. Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol*, 109 (3):330-342.
- Wang CW, Hviid L. 2015. Rifins, rosetting, and red blood cells. *Trends Parasitol*, 31 (7):285-286.
- Wang H, Wang C. 2014. [Levo-L-methyl tryptophan induces immune imbalance at maternal-fetal interface in mice]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 30 (1):4-7.
- Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. 2015. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 6:368.
- Warrell DA, Gilles HM. 2002. *Essential Malariology* 4. Aufl. London: Arnold.
- Watkinson M, Rushton DI, Lunn PG. 1985. Placental malaria and foetoplacental function: low plasma oestradiols associated with malarial pigmentation of the placenta. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 79 (4):448-450.
- WHO. 2006. *Guidelines for the Treatment of Malaria*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO. 2007. *Malaria in Pregnancy - Guidelines for measuring key monitoring and evaluation indicators*. France: World Health Organisation
- WHO. 2012. *WHA Global Nutrition Targets 2025: Low Birth Weight Policy Brief*. Geneva, Switzerland: World Health Organisation, World Health Assembly.
- WHO. 2013. *Vector Control Technical Expert Group Report to MPAC September 2013*. Geneva, Switzerland: World Health Organisation.
- WHO. 2014. *World Malaria Report*. Geneva, Switzerland: World Health Organisation
- WHO. 2015a. *Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 6*. Geneve, Switzerland: World Health Organization.
- WHO. 2015b. *Guidelines for the Treatment of Malaria*. Geneve, Switzerland: World Health Organisation
- WHO. 2015c. *Global technical strategy for malaria 2016 - 2030*. United Kingdom: World Health Organisation
- WHO. 2016a. *Malaria Microscopy Quality Assurance Manual* Geneve, Switzerland: World Health Organization.
- WHO. 2016b. *World Malaria Report*. Geneva, Switzerland: World Health Organisation

- WHO 2016. 15.03.2016. Malaria fact sheet, in: World Health Organization, Media center <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.
- Williams J, Njie F, Cairns M, Bojang K, Coulibaly SO, Kayentao K, Abubakar I, Akor F, Mohammed K, Bationo R, Dabira E, Soulama A, Djimde M, Guirou E, Awine T, Quaye SL, Ordi J, Doumbo O, Hodgson A, Oduro A, Magnussen P, Ter Kuile FO, Woukeu A, Milligan P, Tagbor H, Greenwood B, Chandramohan D. 2016a. Non-falciparum malaria infections in pregnant women in West Africa. *Malar J*, 15 (1):53.
- Williams JE, Cairns M, Njie F, Laryea Quaye S, Awine T, Oduro A, Tagbor H, Bojang K, Magnussen P, Ter Kuile FO, Woukeu A, Milligan P, Chandramohan D, Greenwood B. 2016b. The Performance of a Rapid Diagnostic Test in Detecting Malaria Infection in Pregnant Women and the Impact of Missed Infections. *Clin Infect Dis*, 62 (7):837-844.
- Wilson IA, Stanfield RL. 1994. Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol*, 4 (6):857-867.
- Winke S. 1993. Mikrobiologische und serologiesche Diagnostik. 3. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer.
- Woldearegai TG, Kreamsner PG, Kun JF, Mordmuller B. 2013. Plasmodium vivax malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 107 (5):328-331.
- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. 2007. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg*, 77 (6 Suppl):119-127.
- Wu TT, Kabat EA. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med*, 132 (2):211-250.
- Xiao R, Sorensen TK, Williams MA, Luthy DA. 2003. Influence of pre-eclampsia on fetal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 13 (3):157-162.
- Yang H, Qiu L, Chen G, Ye Z, Lu C, Lin Q. 2008. Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril*, 89 (3):656-661.
- Yeo TW, Lampah DA, Tjitra E, Piera K, Gitawati R, Kenangalem E, Price RN, Anstey NM. 2010. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to Plasmodium vivax, compared with Plasmodium falciparum: a prospective study in Papua, Indonesia. *J Infect Dis*, 202 (1):109-112.
- Zamudio S, Baumann MU, Illsley NP. 2006. Effects of chronic hypoxia in vivo on the expression of human placental glucose transporters. *Placenta*, 27 (1):49-55.
- Zhang J, Dunk C, Croy AB, Lye SJ. 2016. To serve and to protect: the role of decidual innate immune cells on human pregnancy. *Cell Tissue Res*, 363 (1):249-265.

9 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Entwicklungszyklus der Malariaparasiten (Gupta, R. 2012)	4
Abb. 2	Inzidenz der Malariaerkrankungen pro 1000 Einwohnern, 2013 (World Malaria Report 2014, WHO)	6
Abb. 3	Aufbau von Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP-1) (Smith et al. 2001)	8
Abb. 4	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen PfEMP-1 und verschiedenen endothelialen und plazentaren Rezeptoren	10
Abb. 5	Aufbau der Plazenta (Ulfig 2005)	17
Abb. 6	Immunologische Veränderungen während der Schwangerschaft und Folgen (angelehnt an Robinson und Klein 2012)	21
Abb. 7	Schematische Darstellung der IgG-Struktur (Barthlott et al. 2006)	23
Abb. 8	<i>P. falciparum</i> -Risikogebiete und entsprechende Anzahl an Schwangerschaften auf den verschiedenen Kontinenten im Jahr 2007 (Dellicour et al. 2010)	30
Abb. 9	Vereinfachte Darstellung der Interaktion zwischen VAR2CSA und CSA in der Plazenta	40
Abb. 10	Immunhistochemische Lokalisation von CSA in der Plazenta (Muthusamy et al. 2004)	41
Abb. 11	Schematische Darstellung von Chondroitinsulfat (Goel und Gowda 2011)	42
Abb. 12	Schematische Darstellung von VAR2CSA (Goel und Gowda 2011) und BL3x (Khunrae und Higgins 2010)	43
Abb. 13	Hauptmerkmale der plazentaren Malaria	53
Abb. 14	Mögliche pathogenetische Vorgänge, die zur Entstehung des erniedrigten Geburtsgewichts und der mütterlichen Anämie beitragen	62
Abb. 15	Schritte zur Impfstoffentwicklung	85

Tabellenverzeichnis

Tab. I	Malariaerreger und Malariaformen (angelehnt an Löscher und Burchard 2010) ..	IV
Tab. 1	Epidemiologische Einteilung von Malariagebieten (angelehnt an Löscher und Burchard 2010)	7
Tab. 2	Übersicht über die von der WHO 2015 empfohlenen Malariatherapien	15
Tab. 3	Klinische Prüfphasen bei der Entwicklung von Impfstoffen (Spiess et al. 2011)...	28
Tab. 4	Folgen von Malaria in der Schwangerschaft in Regionen unterschiedlicher Transmission (Warrell und Gilles 2002)	31
Tab. 5	Publikationen von Autoren mit Schwerpunktthema „Malaria in der Schwangerschaft“	39
Tab. 6	Bindung der einzelnen DBL-Domänen an CSA	48
Tab. 7	Schematische Darstellung der verschiedenen VAR2CSA-Fragmenten mit Dissoziationskonstanten	50
Tab. 8	Bindung von plazentaren Isolaten bzw. VAR2CSA* an anderen Rezeptoren als CSA	51
Tab. 9	Klassifikation der plazentaren Pathologie (Tab. aus Rogerson et al. 2007b, Klassifikation nach Ismail et al. 2000)	54
Tab. 10	Assoziationen von Zytokinen mit klinischen Parametern	57
Tab. 11	Prävalenzen von peripherer und plazentarer Parasitämie bei Erstgebärenden im Vergleich zu Mehrgebärenden in verschiedenen afrikanischen Ländern zum Zeitpunkt der Geburt	65
Tab. 12	Korrelation von Antikörpern gegen CSA-selektive <i>P. falciparum</i> -Stämme mit Parität, Hemmung der CSA-Bindung, verminderter plazentarer Parasitämie und klinischen Parametern	67
Tab. 13	Antikörper gegen verschiedene VAR2CSA-Domänen bei Mehrgebärenden im Vergleich zu Erstgebärenden	69
Tab. 14	Reaktivität und Bindungshemmung von Antikörpern gegen einzelne VAR2CSA-Domänen	76
Tab. 15	Hemmung der CSA-Bindung durch Antikörper gegen verschiedene Multidomänen von VAR2CSA	80
Tab. 16	Gegenüberstellung von Studien, die die Einbeziehung N-terminaler VAR2CSA-Domänen in die Impfstoffentwicklung befürworten bzw. ablehnen	95/96
Tab. 17	Gegenüberstellung von Studien, die die Einbeziehung C-terminaler VAR2CSA-Domänen in die Impfstoffentwicklung befürworten bzw. ablehnen	100

Überblick Boxen

Box 1	Aktueller Wissensstand: Funktion, Vorkommen und Struktur von CSA	43
Box 2	Aktueller Wissensstand und weiterer Forschungsbedarf: Struktur, Funktion und Polymorphismus von VAR2CSA	47
Box 3	Aktueller Wissensstand und weiterer Forschungsbedarf: Interaktion von CSA und VAR2CSA – der minimale CSA-Bindungsbereich	50
Box 4	Aktueller Wissensstand und weiterer Forschungsbedarf: Weitere relevante Bindungsstrukturen von infizierten Erythrozyten in der Plazenta	52
Box 5	Aktueller Wissensstand und weiterer Forschungsbedarf: Pathogenese und Folgen der plazentaren Inflammation	63
Box 6	Aktueller Wissensstand und weiterer Forschungsbedarf: Entwicklung einer natürlichen Immunität gegen Malaria in der Schwangerschaft	74
Box 7	Aktueller Wissensstand und weiterer Forschungsbedarf: Präklinische Studien zur Impfstoffentwicklung	83
Box 8	VAR2CSA als erfolgversprechender Impfstoffkandidat sowie Probleme und Herausforderungen von VAR2CSA als Impfstoffkandidat	87
Box 9	Der N-terminale VAR2CSA-Bereich als Impfstoffgrundlage und Verbesserungsoptionen bei unzureichender Impfstoffwirkung	103

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Udo Markert für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und für seine persönliche, engagierte Betreuung. Mit offenem Ohr für neue Ideen und vielen hilfreichen Denkanstößen begleitete er die Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, auf die ich mich in jeder Lage verlassen konnte. Besonders möchte ich mich bei Ulrike und Gregor für das aufmerksame Korrekturlesen, ihre Geduld und Unterstützung bedanken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Udo Markert, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers