

Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. J. Knobloch

Sektion Humanparasitologie

Leiter: Professor Dr. P. G. Kremsner

**Subpopulationen dendritischer Zellen  
im Nabelschnurblut afrikanischer Neugeborener  
und ihre Veränderungen im Zusammenhang mit  
maternaler *Plasmodium falciparum*-Belastung**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Lutz Philipp Breitling  
aus  
Hannover

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner  
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stefanovic

*Pour participante no. X032  
et son enfant  
décédé trop tôt*



## **Inhalt**

ABKÜRZUNGEN .....	6
<b><u>1</u></b> <b><u>EINLEITUNG</u></b> .....	<b><u>7</u></b>
1.1     DENDRITISCHE ZELLEN .....	7
1.2     MALARIA .....	10
1.3     MATERNOFETALE PARASITO-IMMUNOLOGIE.....	13
1.4     FRAGESTELLUNG .....	14
<b><u>2</u></b> <b><u>STUDIENPOPULATION, MATERIALIEN UND METHODEN</u></b> .....	<b><u>16</u></b>
2.1     STUDIENPOPULATION .....	16
2.2     MATERIALIEN .....	17
2.3     METHODEN.....	19
<b><u>3</u></b> <b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	<b><u>28</u></b>
3.1     CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATION .....	28
3.2     DC IM NABELSCHNURBLUT .....	31
<b><u>4</u></b> <b><u>DISKUSSION</u></b> .....	<b><u>44</u></b>
4.1     ALLGEMEINE STATISTISCHE VORBEMERKUNGEN .....	44
4.2     BEURTEILUNG DER METHODEN .....	44
4.3     CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATION .....	45
4.4     DC IM NABELSCHNURBLUT .....	45
<b><u>5</u></b> <b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....	<b><u>62</u></b>
<b><u>6</u></b> <b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b> .....	<b><u>63</u></b>
<b><u>DANKSAGUNGEN / REMERCIEMENTS</u></b> .....	<b><u>70</u></b>
<b><u>CURRICULUM VITAE</u></b> .....	<b><u>71</u></b>
<b><u>APPENDIX</u></b> .....	<b><u>72</u></b>
I.     WRITTEN INFORMED CONSENT .....	72
II.    DATENERHEBUNGSBOGEN .....	75
III.   ZUSAMMENSETZUNG VON IMDM .....	77

**Abkürzungen**

Ag	Antigen	MHC	major histocompatibility complex
Ak	Antikörper	MPFI	mittlere PerCP-Fluoreszenz-Intensität
ANOVA	analysis of variance	MTx	Malaria-toxin
APC	antigen presenting cell	Mφ	Makrophage
ARDS	acute respiratory distress syndrome	NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
BDCA	Blut-DC-Antigen	NK	natural killer
BSA	bovines Serumalbumin	NO	Stickstoffmonoxid
CB	cord blood	NOS	NO-Synthetase
CBDC	cord blood DC	PAM	pregnancy associated malaria
CD	cluster of differentiation antigen	PAMP	pathogen associated molecular pattern
CLR	C-type lectin receptor	PBMC	peripheral blood mononuclear cells
CM	cerebral malaria	PBS	phosphate buffered saline
CTLA	cytotoxic T lymphocyte antigen	PCB	Partec Calibration Beads
DC	dendritic cell	PCR	polymerase chain reaction
DC1	Th1-induzierende DC	pDC	plasmazytoide DC
DC2	Th2-induzierende DC	PE	Phycoerythrin
DC-SIGN	DC specific ICAM3 grabbing nonintegrin	PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
DT	Dicker Tropfen	Pf	Plasmodium falciparum
FACS	fluorescence activated cell sorting	PFA	para-Formaldehyd
FAS	Fetales Alkoholsyndrom	PfEMP	Pf-Erythrozytenmembran-protein
FCS	fetal calf serum	PPD	purified protein derivative
Fite	Fluorescein-Isothiocyanat	preDC	precursor DC
FL	Fluoreszenzkanal	PRR	pattern recognition receptor
FSC	forward scatter light	Py	Plasmodium yoelii
GLURP	Glutamin-reiches Protein	rDC	regulatorische DC
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol	SD	standard deviation
HBSS	Hank's Balanced Salts Solution	SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
HIV	Humanes Immundefizienzvirus	SMA	schwere Malariaanämie
HLA	Humanes Leukozytenantigen	sMHC	soluble MHC molecule
HZ	Hämozoin	SSC	sideward scatter light
iDC	immature DC	SSD	Schwangerschaftsdauer
IFN	Interferon	TCR	T cell receptor
Ig	Immunglobulin	TGF	transforming growth factor
IKZ	isotypkorrigierte Zellzahl	Th1, Th2	Immunreaktionstyp 1 bzw. 2
IL	Interleukin	TLR	Toll-like receptor
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium	TNF	Tumornekrosefaktor
iRBC	infected red blood cell	T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
KI	Konfidenzintervall	URM	Unité de Recherches Médicales
LT	Lymphotoxin	VSA	variant surface antigen
Lym	Lymphozyten	WBC	white blood cells
LZG	Lymphozytengate	WIC	written informed consent
mDC	myeloide DC	ZNS	Zentralnervensystem

„Nur wer nicht sucht, ist vor Irrtum sicher.“

Albert Einstein (1879-1955)

# 1 Einleitung

## 1.1 Dendritische Zellen

### 1.1.1 Definition

Als „dendritische Zellen“ (engl. *dendritic cells*; DC) werden „erst in jüngster Zeit als eigene Zellgruppe definierte Zellen mit bäumchenartigen Zellausläufern, mit denen sie Lymphozyten umfassen [und] Antigen-Antikörper-Komplexe präsentieren“, bezeichnet (Hoffmann-La Roche AG 1999). Abzugrenzen von den DC im Sinne dieser Arbeit sind die folliculären dendritischen Zellen (Janeway und Travers 1997).

### 1.1.2 Ursprung und Entwicklung

DC entstehen sowohl aus myeloiden als auch aus lymphoiden CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen (engl. *progenitor*) des Knochenmarks (Banchereau *et al.* 2000). Im Laufe ihrer Entwicklung nehmen sie unterschiedliche Funktionen in diversen anatomischen Kompartimenten wahr (Lipscomb und Masten 2002). Die aus den *progenitor*-Zellen entstehenden DC werden im Allgemeinen als *precursor*-DC (dt. Vorgänger, Vorläufer; preDC) bezeichnet und sind im Knochenmark und peripheren Blut nachweisbar. Sie können entweder bei Pathogenkontakt primär als Zytokinproduzenten im peripheren Blut tätig werden oder sich unter weiterer Reifung zu sog. immaturren DC (iDC) in nicht-lymphatischen Geweben ansiedeln. Reife DC entstehen schließlich durch Antigenaufnahme und/oder Aktivierung aus den iDC. Vom lymphoiden Progenitor ausgehend, entstehen zunächst plasmazytoide, Interferon-produzierende preDC, aus denen im Weiteren die reifen plasmazytoiden DC (pDC) hervorgehen. Die Endprodukte der myeloiden Reihe sind die sog. Langerhans-DC und interstitielle DC sowie solche DC, deren unmittelbare Vorläufer Monozyten sind (Shortman und Liu 2002).

### 1.1.3 Die Rolle der DC bei der Immunreaktion

Aufgrund ihrer ausgeprägten Kapazität, T-Zellen im Rahmen der Immunreaktion zu aktivieren, gelten die DC als die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (engl.

*antigen presenting cells*; APC) und als essentiell für die Regulation der Immunantwort (Janeway und Travers 1997). Auch ihre bedeutende Rolle im System der angeborenen Immunität wird heutzutage anerkannt (Lipscomb und Masten 2002) sowie zunehmend ihr tolerogenes Potenzial (Steinman 2003).

### **1.1.3.1 Erworbene Immunität**

Die in der adaptiven Immunreaktion als Stimulatoren weiterer Zellgruppen eine zentrale Rolle spielenden T-Zellen müssen zunächst von APC aktiviert werden, die das betreffende Antigen durch Infektion, Phagozytose oder ähnliche Vorgänge aufgenommen haben und auf ihrer Oberfläche präsentieren (Sallusto *et al.* 1995). Allein DC scheinen in der Lage zu sein, diese APC-Funktion bei Erstkontakt mit einem Antigen („primäre Immunreaktion“) auszuüben (Banchereau *et al.* 2000).

Durch sequenzielle Reifungsschritte der Chemokin-Responsivität werden auf Endozytose spezialisierte iDC zunächst bspw. von Entzündungsherden angezogen, während die ausgereiften Formen nach Antigenaufnahme oder zytokinbedingter Aktivierung die phagozytotischen Fähigkeiten praktisch verlieren und in die T-Zell-Regionen der Lymphorgane migrieren (Sallusto *et al.* 1995). Hier beginnen sie ihrerseits T-Zellen durch Chemokin-Produktion anzulocken und sind in diesem Stadium für die Interaktion mit anderen Immunzellen spezialisiert, deren Resultat die Identifikation, Aktivierung und Expansion der für das auslösende Antigen spezifischen T-Lymphozyten und damit die wirksame Initiierung einer (primären) adaptiven Immunantwort ist (Ngo *et al.* 1998; Tseng *et al.* 2001).

### **1.1.3.2 Angeborene Immunität**

Der Begriff der „angeborenen Immunität“ wird auf Antigen-unspezifische Abwehrmechanismen angewandt. Die Funktion zellulärer Mechanismen wird dabei häufig mit dem *danger*-Konzept verbunden (Matzinger 2002). Hiernach erkennt das Immunsystem im engeren Sinne Antigen-unspezifische Gefahrensignale, die zur Aktivierung führen. Antigenkontakt ohne Gefahrensignal führt zu Toleranz. Eine Vielzahl exogener Strukturen, sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), werden von Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*; PRR) auf DC erkannt und wirken als *danger*-Signal, das Reifung und Aktivierung der DC zur Folge hat. Die *danger*-aktivierten DC stellen durch die Verknüpfung Antigen-unspezifischer PAMP

mit der nachfolgenden Stimulation Antigen-spezifischer Effektorzellen eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunreaktion dar und bewerkstelligen die koordinierte Aktivierung beider Systeme.

### 1.1.3.3 DC und das Th1/Th2-Paradigma

Immunreaktionen können anhand dominierender Zytokine und Wirkungen klassifiziert werden. Tab. 1 beschreibt die hierbei klassischerweise gegenübergestellten Extrema Th1 und Th2 (Constant und Bottomly 1997; O'Garra 1998; Gor *et al.* 2003).

**Tab. 1: Charakteristika von Th1- und Th2-Reaktionen (vereinfacht).** IL = Interleukin; INF = Interferon; TNF = Tumor-Nekrose-Faktor.

	Th1-Reaktionen	Th2-Reaktionen
Zytokine	IL-2, INF- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$	IL-4, IL-5, IL-10, IL-13
Immunantwort	pro-inflammatorisch, zellvermittelt	tolerant, humoral

DC determinieren den Th1:Th2-Bias der von ihnen ausgelösten Immunantwort, indem sie die interagierende T-Zelle zur Entwicklung in eine Th1- oder Th2-Zelle anregen. Dabei wurden zunächst mDC der Th1- und pDC der Th2-Seite zugeordnet (Rissoan *et al.* 1999). Sie werden daher mitunter auch als „DC1“ und „DC2“ bezeichnet. IL-12 scheint eine entscheidende Rolle in der Th1:Th2-Polarisierung zu spielen (Lipscomb und Masten 2002). Kommt es im Rahmen der DC-T-Zell-Interaktion nicht zur Produktion dieses Th1-Stimulus durch die DC, resultiert die Ausdifferenzierung der T-Zelle zu einer Th2-Zelle. Obwohl eine Präferenz der mDC für Th1- und der pDC für Th2-Antworten zu existieren scheint, gilt eine gewisse Plastizität ihrer Polarisierungskapazitäten mittlerweile als gesichert (Kelsall *et al.* 2002; MacDonald *et al.* 2002; Reis e Sousa 2004).

## 1.1.4 DC im Nabelschnurblut

### 1.1.4.1 Immunphänotypisierung

Im Nabelschnurblut wurden sowohl mDC als auch pDC nachgewiesen (Borras *et al.* 2001). Zur Identifizierung dieser zwei Zellpopulationen werden Oberflächenmoleküle herangezogen, deren Expressionmuster die Unterscheidung der Subtypen voneinander und von anderen Zellarten ermöglichen. Tab. 2 zeigt die häufig zur Charakterisierung von DC genutzten Marker und andere in der vorliegenden Arbeit erwähnten Oberflächenmoleküle bzw. deren Expressionsmuster auf den frisch aus peripherem Blut

isolierten mDC und pDC. Typischerweise zur Charakterisierung der Subpopulationen verwendete Antigenmuster sind hierbei *lineage*<sup>-</sup> (CD3<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, [CD16<sup>-</sup>], CD19<sup>-</sup>, CD20<sup>-</sup>, [CD56<sup>-</sup>]) CD11c<sup>+</sup> CD123<sup>low</sup> für die mDC und *lineage*<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>high</sup> für die pDC.

**Tab. 2: Phänotypen frisch aus dem Blut isolierter DC nach Robinson *et al.* (1999) und Dzionek *et al.* (2000).** ±,+,++,+++ : steigende Oberflächenexpression. Diverse myeloide oder lymphoplasmazytoide Subpopulationen sowie kultivierte / stimulierte Zellen können andere Phänotypen aufweisen. Leicht widersprüchliche Angaben sind nicht zwangsläufig wiedergegeben.

Marker	mDC	pDC	Marker	mDC	pDC
BDCA-1 (CD1c)	+	-	CD33	+	±
BDCA-2	-	+	CD34	-/± <sup>d)</sup>	-/± <sup>d)</sup>
BDCA-3	- <sup>a)</sup>	-	CD36	+	+
BDCA-4	-	+	CD56	- <sup>c)</sup>	-
CD3	-	-	CD80 (B7-1)	-	-
CD11c	++	-	CD83 (DC activation antigen)	-	-
CD14	± <sup>b)</sup>	-	CD86 (B7-2)	±/+++ <sup>d)</sup>	-/+ <sup>d)</sup>
CD16	-	-	CD123	+	++
CD19	-	-	HLA-DR	++	+
CD20	-	-			

a) BDCA-1<sup>-</sup> Untergruppe positiv      c) Untergruppe positiv  
b) Expression invers korreliert mit CD1c      d) widersprüchliche Angaben

#### 1.1.4.2 Subtypen-Verteilung der CBDC

Die Daten zum peripheren Blut des Erwachsenen scheinen recht eindeutig zu sein und eine gewisse myeloide Dominanz ist wiederholt nachgewiesen worden (siehe bspw. Szabolcs *et al.* 2003; Ueda *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu gibt es bis heute keinen Konsens bezüglich der DC-Subtypenverteilung und des mDC:pDC-Ratio im Nabelschnurblut. Die begrenzte Literatur hierzu leidet an fehlender Standardisierung der Identifikations- und Phänotypisierungsverfahren. Dies wird in Tab. 3 verdeutlicht. In jüngerer Zeit scheint sich eine myeloide Dominanz (Schibler *et al.* 2002; Szabolcs *et al.* 2003; Ueda *et al.* 2003; Darmochwal-Kolarz *et al.* 2004) oder ein zumindest nahezu ausgeglichenes Verhältnis der mDC und pDC zu etablieren (Hagendorens *et al.* 2003; Crespo *et al.* 2004; Drohan *et al.* 2004).

## 1.2 Malaria

Malaria gilt als die wichtigste parasitäre Erkrankung des Menschen (White 1996). Schätzwerte klinischer Episoden *per annum* reichen bis 515 Millionen (Snow *et al.* 2005). Die Erreger der Malaria des Menschen sind mückenübertragene Protozoen der

Gattung *Plasmodium* (Mehlhorn und Piekarski 1995). In weiten Teilen Afrikas inkl. Gabun ist *Plasmodium falciparum* (Pf) vorherrschend (White 1996), weshalb die Ausführungen i. Allg. die von Pf ausgelöste „Malaria tropica“ beschreiben.

**Tab. 3: Übersicht über Enumerationsstudien von DC in Nabelschnurblut.** Bei abweichenden Charakterisierungsmethoden sind diejenigen Daten angegeben, die am ehesten den BDCA-1<sup>+</sup> mDC bzw. BDCA-2<sup>+</sup> pDC entsprechen. Erläuterungen im Text.

Quelle	mDC:pDC-Ratio <sup>a</sup>	Absolutzahlen <sup>a</sup> /ml		Phänotypisierung <sup>c</sup>	
		mDC	pDC	mDC	pDC
Sorg <i>et al.</i> (1999)	nur pDC	—	5000	— <sup>d</sup>	CD11c <sup>-</sup> CD123 <sup>+</sup> lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
Borras <i>et al.</i> (2001)	~0.33	?	?	CD11c <sup>+</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	CD11c <sup>-</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
Schibler <i>et al.</i> (2002)	~4	155.000	39.000	CD1c <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	BDCA-2 <sup>+</sup>
Hagendorens <i>et al.</i> (2003)	1.0	10.000–15.000	10.000–15.000	CD11c <sup>+</sup> CD123 <sup>dim</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	CD11c <sup>-</sup> CD123 <sup>high</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
Szabolcs <i>et al.</i> (2003)	~2	23.500	12.000	CD11c <sup>+</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup>	CD123 <sup>+</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup>
Ueda <i>et al.</i> (2003)	4.25	?	?	CD11c <sup>+</sup> CD123 <sup>-</sup> lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	CD123 <sup>bright</sup> lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
Darmochwal-Kolarz <i>et al.</i> (2004)	4.84	?	?	CD1c <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	BDCA-2 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup>
Drohan <i>et al.</i> (2004)	~0.7	?	?	CD11c <sup>+</sup> lin <sup>-</sup>	CD11c <sup>-</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
Crespo <i>et al.</i> (2004)	~1.2	8.900	7.300	CD123 <sup>dim</sup> CD33 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup>	CD123 <sup>bright</sup> CD33 <sup>-/dim</sup> CD16 <sup>-</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup>

a) teilweise Schätzwerte

c) Zusammensetzung der *lineage*-Cocktails variiert

b) mittlere Zellzahl /ml

d) nach Anreicherung wurden alle Zellen als pDC (CD11<sup>-</sup>) charakterisiert

### 1.2.1 Pathophysiologie

Kurz gesagt, führt bei der Malariaerkrankung die Ruptur parasitierter Erythrozyten (engl. *infected red blood cells*; iRBC) zur Freisetzung eines Malariatoxins (MTx), das zur Produktion u. a. von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 durch Immunzellen des Patienten führt. Es kommt zur Auslösung einer Zytokin-Kaskade, die zum einen die Krankheitserscheinungen, zum anderen die effektive Aktivierung des Immunsystems und damit die Beseitigung des Erregers bewirkt (White 1996).

Als MTx ist mittlerweile ein Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker (GPI) parasitärer Oberflächenantigene erkannt worden (Schofield *et al.* 1993).

In der pathophysiologisch so bedeutsamen Zytokinkaskade scheinen die Th1-Zytokine TNF- $\alpha$  und Lymphotoxin (LT) zur Aggravierung der Erkrankung beizutragen (Hunt und Grau 2003). INF- $\gamma$  soll insbesondere im ZNS nachteilig wirken (Sanni *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu scheinen die Th2-Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  während der Malariaerkrankung dem Schutz des Wirtes zu dienen. TGF- $\beta$  ist positiv mit dem Überleben in diversen Mausmodellen korreliert und für zügige Parasiten-Zerstörung essentiell (Omer und Riley 1998). Es inhibiert TNF- $\alpha$  und stimuliert die Freisetzung von IL-10, welches seinerseits zur Verminderung der Produktion inflammatorischer Zytokine beiträgt (de Waal Malefyt *et al.* 1991).

Die dargestellten Mechanismen sind gemeinsam an der Verursachung der Organpathologien beteiligt. Neben Bewusstseinsstörungen bis zum Koma sind dies bspw. Nierenversagen und Lungenödem. Parasitenstoffwechsel und anaerobe Glykolyse des Wirtes führen zu Hypoglykämie und laktazidotischer Stoffwechsellage. Die Anämie bei Malaria ist multifaktoriell bedingt, wobei Sequestration und Splenomegalie ebenso eine Rolle spielen wie gestörte Hämatopoese, iRBC-Ruptur und vermehrte Erythrophagozytose (Weatherall *et al.* 2002).

### **1.2.2 Klinik und Therapie**

Meist beginnt die Malaria unspezifisch als Grippe-ähnliche Erkrankung, aber auch fulminante Verläufe sind gelegentlich zu beobachten. Nach 1 bis 2 Tagen kommt es zu Fieber. Schwere Verläufe zeigen Komplikationen wie unerweckbares Koma (engl. *cerebral malaria*; CM), schwere Anämie (engl. *severe malarial anemia*; SMA), Nierenversagen und Lungenödem bzw. ARDS (engl. *acute respiratory distress syndrome*) (White 1996).

Die medikamentöse Kausaltherapie der Malaria wird durch die rasante Entstehung und Ausbreitung von Resistenzen kompliziert. Derzeit sind insbesondere Artemisinin-haltige Kombinationen Hoffnungsträger (Kremsner und Krishna 2004).

### **1.2.3 Immunologie**

#### **1.2.3.1 Antikörper und Zytokine**

Antikörper (Ak) behindern Parasitenfunktionen und vermitteln zytotoxische Abwehrmechanismen (Artavanis-Tsakonas *et al.* 2003). Durch wiederholte Infektionen

soll ein breit gefächertes Ak-Repertoire entstehen, welches klinische Erkrankungen immer unwahrscheinlicher werden lässt (Ofori *et al.* 2002).

Insgesamt scheint eine Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Reizen für eine dem Wirt optimal nützliche Immunreaktion ausschlaggebend zu sein, da eine Parasitenvernichtung durch Th1-vermittelte zelluläre Mechanismen bei erträglicher Pathologie erreicht werden muss (Artavanis-Tsakonas *et al.* 2003).

### 1.2.3.2 Dendritische Zellen

Die Schlüsselposition der DC in der Initiierung der Immunabwehr weist ihnen eine zentrale Rolle in der Reaktion gegen Plasmodien zu, was durch Ergebnisse aus Tiermodellen unterstrichen wird (Übersicht in Ndungu *et al.* 2005). Im Mausmodell mit *P. chabaudi* wurde gezeigt, dass DC in der Milz schon in der Frühphase der Infektion aktiviert werden und früher als andere Zellen die maximale INF- $\gamma$ -Produktion erreichen (Leisewitz *et al.* 2004) Für die Auseinandersetzung mit *P. yoelii* (Py) konnte gezeigt werden, dass ohne CD11c<sup>+</sup> DC keine zytotoxische Reaktion gegen die Py-Sporoziten zustande kommt (Jung *et al.* 2002).

Während Pf-Schizonten offenbar pDC aktivieren (Pichyangkul *et al.* 2004), hat Pf Wege gefunden, DC und andere APC zu kompromittieren (Urban und Roberts 2002; Sher *et al.* 2003). Dies führt sowohl zur Hemmung CD4-abhängiger Reaktionen als auch der CD8<sup>+</sup> Zytotoxizität (Ocana-Morgner *et al.* 2003). Beim Menschen wurden Hinweise auf eine gestörte Funktion der DC bei akut an Pf-Malaria erkrankten Kindern (Urban *et al.* 2001a) und bei tödlich verlaufender Malaria (Urban *et al.* 2005) gefunden.

## 1.3 Maternofetale Parasito-Immunologie

Die Schwangerschaft stellt eine immunologische Ausnahmesituation dar, in der das maternale Immunsystem das sogenannte fetale Allograft tolerieren muss. Dies wird nach etablierter Meinung durch eine Verschiebung des maternalen Th1:Th2-Äquilibrium in Richtung der tolerogen-regulatorischen Th2-Situation erreicht (Kanellopoulos-Langevin *et al.* 2003).

Das neonatale Immunsystem seinerseits wurde generell als unreif betrachtet (Delespesse *et al.* 1998). Mittlerweile ist differenzierteres Wissen über im Vergleich zum Erwachsenen veränderte Häufigkeiten und funktionelle Eigenschaften verschiedener

Immunzelltypen des Nabelschnurblutes vorhanden (Marchant und Goldman 2005; Marshall-Clarke *et al.* 2000).

Eine maternale Malariainfektion während der Schwangerschaft (engl. *pregnancy-associated malaria*; PAM) scheint nachteilig auf die Schwangerschaft zu wirken und zu Komplikationen wie Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht zu führen. Für diese Sequelae wird neben sequestrationsbedingten Mikrozirkulationsstörungen in der Plazenta eine infektionsbedingte Verschiebung des plazentalen Zytokinmilieus zugunsten des fruchtschädigenden Th1-Musters verantwortlich gemacht (Okoko *et al.* 2003; Brabin *et al.* 2004). Demgegenüber wurde bei betroffenen Kindern ein gewisser Th2-Shift der Immunreaktionen gefunden (Ismaili *et al.* 2003).

## **1.4 Fragestellung**

### **1.4.1 Motivation und Zielsetzung**

Wie dargestellt wurde, sind die verschiedenen DC-Populationen maßgeblich an einer Vielzahl immunologischer Phänomene einschließlich der Th1:Th2-Regulation beteiligt. Dennoch sind die bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Bedeutung der DC in der Wirtsreaktion gegen Malaria eher begrenzt und dies, obwohl es sich um die wohl bedeutendste Parasitose des Menschen handelt. Die angeführten epidemiologischen Fakten, ernsten Komplikationen und durch Resistenzen verursachten therapeutischen Schwierigkeiten dieser Krankheit bedingen dabei die Notwendigkeit, die Interaktionen zwischen Wirt und Parasit detailliert zu verstehen, um neuen therapeutischen Möglichkeiten, inklusive der Entwicklung eines effektiven Impfstoffs als ultimativer Lösung des Problems, näher zu kommen.

Keinerlei Daten scheinen bez. der DC im Nabelschnurblut afrikanischer Neugeborener veröffentlicht worden zu sein. Diese Kinder stellen aufgrund der hohen Gefährdung durch schwere Pf-Erkrankungen in den ersten Lebensjahren eine besonders wichtige Forschungspopulation dar. Des Weiteren spielt die Th1:Th2-(Dys-)Regulation in der Pathogenese der Malaria eine große Rolle. Bei den häufig auftretenden mütterlichen Pf-Infektionen während der Schwangerschaft scheint dies nicht nur mit dem verschlechterten Geburtsergebnis verbunden zu sein, sondern sich auch im neonatalen Immunsystem widerzuspiegeln. Ein Verständnis dieser Zusammenhänge ist besonders relevant, weil

gerade diese stark exponierten Kinder in hochendemischen Gebieten im Rahmen zukünftiger Impfprogramme Priorität genießen müssen.

Die CBDC sind an den dargestellten Vorgängen aufgrund ihrer prominenten Bedeutung in der Initiierung und Modulation der Wirtsabwehr vermutlich maßgeblich beteiligt. Eine genauere Untersuchung der CBDC im Zusammenhang mit maternaler Malaria ist daher nicht nur für die Grundlagenforschung wichtig, sondern könnte früher oder später auch bedeutende therapeutische Konsequenzen haben. Aus diesem Grund sollten mit den Arbeiten für die vorliegende Inauguraldissertation erstmalig Basisdaten zur Verteilung der DC-Subpopulationen im Nabelschnurblut in einer afrikanischen, stark parasitenexponierten Population erhoben und die Frage beantwortet werden, ob Neugeborene von Müttern mit unterschiedlicher Malaria-Vorgeschichte Auffälligkeiten hinsichtlich der Verteilung der DC-Typen im Nabelschnurblut aufweisen. Da eine an der HLA-DR-Expression messbare funktionelle Beeinträchtigung der DC durch Pf-Exposition in der Literatur beschrieben wurde, untersuchten wir auch dieses Molekül als Surrogatmarker für die APC-Kapazität der Zellen.

#### **1.4.2 Studiendesign und -umfang**

Als Studiendesign wurde hierzu eine Querschnittsfeldstudie gewählt. Nach Niederkunft wurde Blut von Neugeborenen (Nabelschnur), Plazenten und Müttern gewonnen und eine Fluoreszenz-durchflusszytometrische Enumeration zweier DC-Subpopulationen im Nabelschnurblut durchgeführt. Der maternale Malariastatus wurde mikroskopisch und anamnestisch erhoben.

Da keine ausreichenden Ausgangsdaten bezüglich des Ausmaßes zu erwartender Messgrößenunterschiede zwischen den Patientengruppen vorhanden waren, konnte keine systematische Studienumfangbestimmung durchgeführt werden. Somit wurden so viele Proben verarbeitet wie aufgrund der begrenzten Ressourcen möglich war.

## **2 Studienpopulation, Materialien und Methoden**

### **2.1 Studienpopulation**

#### **2.1.1 Studienregion**

Die Studie wurde in der *Unité de Recherches Médicales* (URM) des *Hôpital Albert Schweitzer* in Lambaréné/Gabun durchgeführt. Lambaréné ist eine semi-urbane Siedlung mit 20–30.000 Einwohnern und liegt bei etwa 10° 15' Ost 0° 40' Süd. Die Region weist der äquatornahen Lage entsprechend ein tropisches Klima auf. Wildling *et al.* (1995) aus unserem Institut untersuchten die epidemiologische Situation der Malaria in der Studienregion im Jahr 1992 und beschrieben eine stabile, hyperendemische Malariatransmission. Hyperendemiegebiete sind durch eine Milz- oder Parasitämierung von 50–75% in der Altersgruppe 2–9 Jahre charakterisiert (White 1996).

#### **2.1.2 Studienteilnehmer**

##### **2.1.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien**

Alle Frauen, die in der Zeit der Studiendurchführung im *Hôpital Régional Lambaréné* oder im *Hôpital Albert Schweitzer* niederkamen, wurden als Studienteilnehmerinnen in Betracht gezogen. Ausschlusskriterien waren Mehrlingsschwangerschaft, höhergradige Fehlbildungen oder kritischer Zustand des Neugeborenen sowie operative Entbindung.

##### **2.1.2.2 Rekrutierung und ethische Aspekte**

Die Hebammen der zwei beteiligten geburtshilflichen Abteilungen wurden gebeten, vor jeder Geburt die URM zu verständigen. Bei Anruf wurden die Frauen so bald wie möglich aufgesucht und je nach Verfassung sofort oder nach einiger Zeit über die beabsichtigte Studie aufgeklärt. Diese Aufklärung erfolgte nach Vorgabe durch den Aufklärungsbogen der Mutterstudie (siehe Appendix). Nach Zustimmung zur Studienteilnahme wurde mit der Probenentnahme begonnen. Es wurde jeweils eine schriftliche Bestätigung der Zustimmung (engl. *written informed consent*; WIC) eingeholt. Bei minderjährigen Teilnehmerinnen wurde der WIC von einem volljährigen Vertreter erbeten und das mündliche Einverständnis der Patientin war obligat.

Eine Minderheit der Studienteilnehmerinnen wurde bereits anlässlich ihrer Vorsorgeuntersuchungen für die longitudinale Hauptstudie rekrutiert.

Das Dissertationsprojekt wurde als Protokollergänzung der „*Study of the immune response in children and adults with malaria from Gabon*“ unter der Bezeichnung „Physiologie und Bedeutung der Immunreaktion von Erwachsenen und Kindern bei Infektionen mit *Plasmodium falciparum*“ an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt und unterlag damit der Prüfung und Zustimmung durch die Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Das ursprüngliche Protokoll der Mutterstudie war von dieser und dem entsprechenden Gremium der Albert-Schweitzer-Stiftung genehmigt worden.

## 2.2 Materialien

Warenzeichen und Markennamen sind nicht zwangsläufig gekennzeichnet.

### 2.2.1 Fluoreszenzantikörper

Tab. 4 beschreibt die bei der FACS-Analyse zur Anwendung gekommenen Antikörper.

**Tab. 4: Verwendete Fluoreszenzantikörper.**

Spezifität	Fluorochrom <sup>a</sup>	Isotyp	Hersteller
BDCA-1 (CD1c)	PE	Maus-IgG2a	MiltenyiBiotec (Auburn/CA, USA)
BDCA-2	PE	Maus-IgG1	
BDCA-2	Fitc	Maus-IgG1	
BDCA-4	PE	Maus-IgG1	
<i>lineage cocktail 1</i> (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)	Fitc	Maus-IgG1 Maus-IgG2b	
CD34	Fitc	Maus-IgG1	BD Biosciences (San Jose/CA, USA)
HLA-DR	PerCP	Maus-IgG2a	
Isotypkontrolle	PE	Maus-IgG1	
Isotypkontrolle	PE	Maus-IgG2a	
Isotypkontrolle	Fitc	Maus-IgG1	
Isotypkontrolle	Fitc	Maus-IgG2b	
Isotypkontrolle	PerCP	Maus-IgG2a	

a) PE = Phycoerythrin; Fitc = Fluorescein-Isothiocyant; PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein

### 2.2.2 Chemikalien

#### 2.2.2.1 Medikamente zur Patientenversorgung

Die in Tab. 5 aufgelisteten Medikamente wurden den an der Studie teilnehmenden Müttern bei Bedarf ausgehändigt, wobei die Patientinnen mündlich und ggf. schriftlich

über Dosierung und Anwendungsschema aufgeklärt wurden. Bezogen wurden die Medikamente über die International Dispensary Association (Amsterdam, Holland).

**Tab. 5: Verabreichte Medikamente.**

Bezeichnung	Hersteller	Indikation
Sulphadoxine 500 mg Pyrimethamine 25 mg	Pharmamed (Malta)	Pf-Parasitämie
Ferrous Sulphate 200 mg	Weifa AS (Kragerø, Norwegen)	Anämie
Paracetamol 500 mg	Micro Labs Limited (Hosur, Indien)	Schmerzen
Multivitamin	Pharmamed (Malta)	Neurasthenische Beschwerden

### 2.2.2.2 Medienzusätze

Um Wachstum von mykotischen und bakteriellen Verunreinigungen zu verhindern bzw. aufgrund der Zellkulturversuche für die Hauptstudie wurden den weiter unten beschriebenen Lösungen die folgenden Zusätze beigemischt (Tab. 6).

**Tab. 6: Zusätze zu den Lösungen.**

Bezeichnung	Hersteller
Natrium-Penicillin G Streptomycin	Yamanouchi Pharma B.V. (Leiderdorp, Holland)
Fetales Kälberserum (FCS) Glutamat Pyruvat	GIBCO, Invitrogen Corp. (Paisley/Scotland, Vereinigtes Königreich)

### 2.2.2.3 Sonstiges

In Tab. 7 sind die sonstigen Chemikalien angeführt, die in den verschiedenen Schritten des Versuchsprotokolls benutzt wurden.

**Tab. 7: Weitere verwendete Chemikalien.**

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
0.5 M Ethylendiamin- tetraacetat (EDTA)	GIBCO, Invitrogen Corp. (Paisley/Scotland, Vereinigtes Königreich)
Ficoll 5.7%, pyrogenfrei, spezifische Dichte 1,077 g/ml	Apotheek AZL (Leiden, Holland)
FcR Blocking Reagent	BD Biosciences (San Jose/CA, USA)

### 2.2.3 Ausgangspuffer und -medien

Eine Reihe verschiedener Lösungen wurde im Rahmen der etablierten Protokolle für Reinigungs-, Kultur- und Analyseschritte verwendet (Tab. 8).

**Tab. 8: Ausgangslösungen.**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Phosphate Buffered Saline (PBS)	0.01 M Phosphatpuffer, 0.0027 M KCl, 0.137 M NaCl, pH 7.4	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Hank's Balanced Salts Solution (HBSS)	KCl 0.4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.06 g/l NaCl 8.0 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.04788 g/l D-Glukose 1.0 g/l	GIBCO, Invitrogen Corp. (Paisley/Scotland, Vereinigtes Königreich)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium with L-Glutamin and 25mM HEPES (IMDM)	s. Appendix	

### 2.2.4 Zusammengesetzte Puffer und Medien

Die Zusammensetzungen der komplexen Lösungen sind aus Tab. 9 ersichtlich.

**Tab. 9: Komplexe Puffer und Medien.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
HBSS+	50.000 IE Penicillin, 250 µl Streptomycin in 500 ml HBSS
IMDM+	10% FCS in 50.000 IE Penicillin, 250 µl Streptomycin, 5 ml Pyruvat/Glutamat in 500 ml IMDM
Waschpuffer	0.5 % BSA, 2 mM EDTA in PBS

### 2.2.5 Geräte und Software

Tab. 10 zeigt die wichtigsten im Rahmen der Forschungsarbeit regelmäßig zur Anwendung gekommenen Geräte und Software.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Specimen- und Datengewinnung

Nach der Aufklärung und Einwilligung der Mutter zur Studienteilnahme, wurden so bald wie möglich nach der Niederkunft etwa 20 ml Heparin-Nabelschnurblut aus den Umbilikalgefäßen abgenommen. Aus der Plazenta wurde Gewebe entnommen, so bald wie möglich schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert, um später für PCR-

Untersuchungen im Rahmen der Hauptstudie zur Verfügung zu stehen. Etwa 20 ml maternalen Heparin-Bluts wurden durch periphere Venenpunktur gewonnen. Sowohl im Falle des Nabelschnur- als auch des Mutterblutes wurden nach Möglichkeit 1-2 ml EDTA-Blut für das Blutbild abgenommen. Die Blutproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

**Tab. 10: Geräte und Software.**

Bezeichnung	Hersteller
Automatic-Sarpette	DESAGA, Sarstedt-Gruppe (Nümbrecht, Deutschland)
Pipetman 1000 µl	Gilson (Middleton/WI, USA)
Pipetman 100 µl	
Pipetman 20 µl	
Cell-Dyn 3000	ABBOTT (Wiesbaden, Deutschland)
Grundig Squixx CDP 4101 AS 10 CD-Abspielgerät mit Ultra Bass	Grundig (Nürnberg, Deutschland)
FlowMax (FACS-Software)	Partec GmbH (Münster, Deutschland)
R 2.0.1 (Statistikprogramm)	R Foundation for Statistical Computing (Wien, Österreich)
FileMaker Pro 7 (Datenbankprogramm)	Filemaker, Inc. (Santa Clara/CA, USA)
CyFlow, blauer Laser (FACS)	Partec GmbH (Münster, Deutschland)
Zentrifuge Centra-4x	International Equipment Company (Dunstable/England, Vereinigtes Königreich)
Zentrifuge EBA12	Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)

Daten über die Krankenvorgeschichte und den Status praesens wurden durch Einsicht in das *carnet de santé* (Mutterpass), ggf. Auswertung der Informationen aus der longitudinalen Mutterstudie, die Klinikunterlagen, Anamnese und bedarfsweise körperliche Untersuchung erhoben, wobei der Datenerhebungsbogen der Mutterstudie als Vorlage diente (siehe Appendix).

### 2.3.2 Dicker Tropfen

Der Malaria-Status von Mutter-, Nabelschnur- und Plazentablut wurde lichtmikroskopisch im Dicken Tropfen (DT) bestimmt. Dieser wurde wie zuvor beschrieben (Borrmann *et al.* 2002) durchgeführt: 10 µl Blut wurden auf einem Objektträger auf einer Fläche von etwa 10 mm \* 18 mm verteilt, getrocknet und Giemsa-gefärbt. Zur

Quantifizierung der Parasitämie bei positivem DT wurde die mittlere Zahl Parasiten pro Gesichtsfeld bestimmt und mit dem mikroskop-spezifischen Faktor 600 multipliziert, um die Zahl der Parasiten pro  $\mu\text{l}$  Blut zu erhalten. Zur Diagnose eines negativen DT wurden mindestens 100 Gesichtsfelder untersucht. Alle unklar zu beurteilenden DT wurden von einem erfahreneren Untersucher kontrollgelesen. Die DT der zur Mutterstudie gehörenden Geburten wurden primär von speziell hierzu ausgebildeten Laborassistenten gelesen.

### **2.3.3 Blutbild**

Das Blutbild für Mutter- und Nabelschnurblut wurde mit einer ABBOTT Cell-Dyn 3000 in EDTA-Blut bestimmt, den Herstellervorgaben entsprechend 0.5–4 Stunden nach Blutentnahme. Bei mehrfachen Blutbildbestimmungen wurden unter Ausschluss von Ausreißern Mittelwerte zur weiteren Analyse gebildet.

### **2.3.4 Isolierung der mononukleären Zellen**

Die mononukleären Zellen (PBMC) wurden durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus dem heparinisierten Vollblut isoliert. Nach Verdünnung von bis zu 20 ml Vollblut mit HBSS+ auf ein Endvolumen von 40 ml wurde die Zellsuspension in einem Falcon-Gefäß per Stripette mit 10 ml Ficoll unterschichtet. Anschließend wurde bei  $\sim 1500g$  25 min zentrifugiert (Zentrifuge Centra-4x). Die mononukleären Zellen wurden mit einer Pasteur-Pipette aus der Ficoll-Serum-Grenzschicht abgenommen. Nach zweimaligem Waschen in HBSS+ (zunächst 40, dann 10 ml Endvolumen; jeweils 10 min bei ca. 1000g) wurden die Zellen je nach Pellet-Größe in 1–4 ml IMDM+ verdünnt. Nach mikroskopischer Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer, wurde eine Konzentration von 10 Mio. Zellen /ml IMDM+ hergestellt (Kultursuspension).

### **2.3.5 Durchflusszytometrie**

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie ist ein mittlerweile sehr etabliertes Verfahren zur Quantifizierung und Charakterisierung von Zellpopulationen (Jaroszeski und Heller 1998), weshalb hier keine Darstellung *in extenso* gegeben werden braucht.

Fluoreszenz-markierte Antikörper gegen Antigene auf oder in den zu untersuchenden Zellen werden an diese gebunden. Anschließend werden einzelne Zellen in Suspension von einem Laser angestrahlt. Aufgrund des Streulichts in verschiedenen Winkeln

(Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht; engl. *forward scatter* [FSC], *sideward scatter* [SSC] *light*) können Rückschlüsse auf die Zellmorphologie (Größe bzw. Granularität) gezogen werden. Durch Quantifizierung der Emission von Fluoreszenzlicht wird die Menge der an der Zelle gebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörper und somit die Häufigkeit des untersuchten Antigens bestimmt. Charakteristische Kombinationen von Streulicht-Mustern und Antigenexpression erlauben die Identifizierung bestimmter Zellarten.

Durch Anwendung von Fluorochromen unterschiedlicher Emmissionsfrequenz können auf Durchflusszytometern mit mehreren Fluoreszenzdetektoren (Kanälen) mehrere Antigene gleichzeitig untersucht werden. Für die vorliegende Arbeit wurde ein 3-Kanal-CyFlow (Partec GmbH, Deutschland) benutzt.

#### **2.3.5.1 Zellfärbung**

Ein Aliquot der Kultursuspension wurde bei ca. 3000 U/min (Zentrifuge EBA12) für 3 Minuten in einem Eppendorf-Reagiergefäß abzentrifugiert und mit derselben Einstellung zweimal in Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden Aliquots zu je 1 Mio. Zellen in 65 µl Waschpuffer gebildet. Nach Zugabe von 10 µl FcR-Blocking Reagent je Aliquot zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung wurden die Fluoreszenz-Antikörper zugegeben und das Volumen mit Waschpuffer auf 100 µl aufgestockt. Die Proben wurden bei Zimmertemperatur in Dunkelheit für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Waschpuffer auf 1 ml aufgestockt, abzentrifugiert und in 200 µl Waschpuffer resuspendiert.

Zur Identifizierung der DC wurden PE-markierte Antikörper gegen die relativ spezifischen DC-Marker BDCA-1 (CD1c) und BDCA-2 verwendet. Da einige wenige nicht-DC diese Moleküle exprimieren können, wurde eine Fitc-markierte Mischung von Antikörpern gegen Oberflächenmarker verschiedener Zellreihen (engl. *lineage cocktail*) hinzugegeben. DC mussten nicht nur positiv für einen der DC-Marker, sondern auch negativ für die *lineage*-Marker sein (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56). HLA-DR-PerCP wurde zur Bestimmung der Oberflächenexpression von HLA-DR zugegeben. Die Notwendigkeit, den Stammzellmarker CD34 zu berücksichtigen, wurde durch entsprechende Probenansätze untersucht und verworfen (s. u.). Die jeweils notwendigen Antikörper-Mengen wurden in Vorversuchen bestimmt.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu quantifizieren und so gut wie möglich zu korrigieren, wurden im Allgemeinen für jede Probe den Färbungen entsprechende Isotypkontrollen angesetzt.

#### **2.3.5.2 Geräte-Kalibrierung**

Die Geräteeigenschaften des CyFlow wurden regelmäßig mit Hilfe der Partec Calibration Beads (PCB) kontrolliert. Zur quantitativen Bestimmung der Fluoreszenzsensitivität des Gerätes wurden die *gains* (Verstärkungen) der Fluoreszenzkanäle in einem nach Herstellerangaben durchgeführten Kalibrierungsvorgang solchermaßen eingestellt, dass die Signale der PCB jeweils im Intensitätskanal 100 am häufigsten registriert wurden. Die entsprechenden *gains* wurden gespeichert, um später durch mathematische Korrektur den Einfluss von Veränderungen der Geräteeigenschaften auf die Messergebnisse minimieren bzw. dieselben normalisieren zu können (s. u.).

#### **2.3.5.3 Probenaufnahme**

Die Zellsuspension wurde in 3.5 ml Sarstedt-Röhren je nach Bedarf mit PBS verdünnt, um eine Probenaufnahme mit weniger als 800 Events pro Sekunde zu ermöglichen, da Geschwindigkeiten über 1000 Events pro Sekunde Unregelmäßigkeiten in der Zelldetektion, insbesondere in den FSC- und SSC-Signalen, zeigten. Für Isotypkontrollen wurden jeweils mindestens 200.000 Events registriert. Für gefärbte Proben wurden mindestens 300.000 Events aufgenommen. Die Probenaufnahme wurde für alle Patienten mit den gleichen Signalverstärkungen durchgeführt.

Als Trägerlösung im Durchflusszytometer (engl. *sheat fluid*) wurde evian-Mineralwasser benutzt, das gegen Kontaminationen mit  $\text{NaN}_3$  versetzt wurde. Die *sheat fluid* des Herstellers war in Gabun nicht verfügbar.

#### **2.3.5.4 Enumeration der DC-Subpopulationen**

Zur Quantifizierung der BDCA-1<sup>+</sup> mDC bzw. BDCA-2<sup>+</sup> pDC wurden zunächst die mit den entsprechenden Isotyp-Antikörper gefärbten Kontrollansätze analysiert. Nach Ausführung der im Folgenden für die Proben beschriebenen Schritte wurden die Gates, die hierbei erstellt worden waren, auf die Isotyp-Kontrolle angewandt, um zu bestimmen, wie viele Zellen aufgrund unspezifischer Antikörperbindung in diesen Gates zu erwarten waren. In einigen Fällen wurden die auf die Isotyp-Kontrollen

angewandten Gates angepasst, um Eventwolken auszuklammern, die eindeutig nicht in der zugehörigen Probe erkennbar waren.

Zur Probenanalyse wurde zunächst ein Gate R1 im FSC/SSC-Plot um die Lymphozyten-Wolke und den unteren Bereich der Monozyten gezogen, da hier die DC zu erwarten sind (Dzionic *et al.* 2000) und dann selektiv die innerhalb von R1 liegenden Zellen angezeigt.

Ein zweites Gate R2 wurde um die im FL1-FL2-Plot (FL1 = Fitc; FL2 = PE) abgrenzbare  $FL1^- FL2^+$  Zellpopulation (*lineage^-* BDCA-Marker<sup>+</sup>) gelegt. Nach selektiver Darstellung nur dieser Zellen erfolgte die Erstellung von Gate R3 um die im SSC-FSC-Plot im für DC typischen Bereich liegenden Zellen. Durch ausschließliche Darstellung solcher Zellen, die sowohl in R2 als auch in R3 erschienen, sollte sichergestellt werden, dass wirklich nur markierte DC, nicht aber Zelldebris oder atypische Zellen mit anormalem SSC/FSC-Muster als DC gezählt wurden.

Die für Berechnungen (s. u.) notwendige Anzahl von Lymphozyten in der Probe wurde mit Hilfe eines Lymphozytengates im SSC-FSC-Plot bestimmt.

#### **2.3.5.5 Bestimmung der HLA-DR-Oberflächen-Markierung**

Die Expression von HLA-DR auf der DC-Oberfläche wurde auf zweierlei Weise analysiert,

- a. als prozentualer Anteil anti-HLA-DR-PerCP<sup>+</sup> Zellen an den DC, und
- b. als mittlere FL3-Intensität (FL3 = PerCP) der HLA-DR<sup>+</sup> DC.

Zur Bestimmung des Anteils HLA-DR<sup>+</sup> Zellen an den DC wurde bei selektiver Darstellung der DC (Zellen, die sowohl in R2 als auch R3 erschienen) ein weiteres Gate um die als FL3<sup>+</sup> abgrenzbare Punktvolke gelegt und der entsprechende Prozentwert notiert. Als Maß für die Stärke der HLA-DR-Expression wurde die mittlere FL3-Intensität der Zellen in der eingegrenzten FL3<sup>+</sup> Zellpopulation festgehalten. Dieser Wert musste mit Hilfe der Kalibrierungswerte normalisiert werden (s. 2.3.6).

### **2.3.6 Berechnungen**

#### **2.3.6.1 Isotypkorrigierte Zellzahlen**

Die in Gll. 1 und 2 definierten Isotypkorrigierten Zellzahlen der mDC (IKZ.1) und pDC (IKZ.2) sind für die weiteren Berechnungen notwendige Größen, die angeben, wie viele

Zellen pro detektiertes Event in einem Probenansatz *lineage*<sup>-</sup> DC-Marker<sup>+</sup> sind, wenn die unspezifische Bindung von Fluoreszenzantikörpern abgezogen wird.

<p>[Gl. 1] <math>IKZ.1 = (R2R3-BDCA-1^+ / \text{Events in Probe1 gesamt}) -</math>  <math>((R2R3-iso1 / \text{Events in Kontrolle1 gesamt}) * (1 - Q2Q4))</math></p> <p>[Gl. 2] <math>IKZ.2 = (R2R3-BDCA-2^+ / \text{Events in Probe2 gesamt}) -</math>  <math>((R2R3-iso1 / \text{Events in Kontrolle2 gesamt}) * (1 - Q2Q4))</math></p>
---

R2R3 bezeichnet hierbei die Anzahl der in den Gates R2 und R3 eines Probenansatzes erscheinenden mDC bzw. pDC bzw. im Falle der jeweiligen Isotypkontrolle die in diesen Gates aufgrund unspezifischer Bindung aufleuchtenden Zellen. Q2Q4 ist derjenige Anteil von Zellen des Lymphozytengates einer Probe, der aufgrund der Expression von *lineage*-Markern in den FITC<sup>+</sup> Quadranten des FL1-FL2-Plots (Q2, Q4) erscheint. Diese Zellen erscheinen selbst im Falle unspezifischer anti-BDCA-1/2-Fluoreszenzantikörper-Bindung nicht in dem DC-Gate, das im FITC<sup>-</sup> Quadranten Q1 liegt. Dementsprechend muss dieser Anteil bei der Isotypkorrektur nicht von den Werten der gefärbten Probe abgezogen werden.

### 2.3.6.2 Absolutkonzentrationen der DC

Die Konzentrationen der mDC und pDC wurden aus den IKZ, der Zahl der Zellen im Lymphozyten-Gate des jeweiligen Probenansatzes (LZG.1 bzw. LZG.2) sowie dem Blutbild (weiße Zellen: WBC; Lymphozyten: Lym) berechnet (Gll. 3 und 4).

<p>[Gl. 3] <math>mDC / ml = WBC \text{ K}/\mu l * Lym \% * 10^4 *</math>  <math>IKZ.1 * \text{Events in Probe1 gesamt} / LZG.1</math></p> <p>[Gl. 4] <math>pDC / ml = WBC \text{ K}/\mu l * Lym \% * 10^4 *</math>  <math>IKZ.2 * \text{Events in Probe2 gesamt} / LZG.2</math></p>
---

Hierdurch wird der Verlust von DC während der Waschvorgänge und der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation als Störfaktor soweit wie möglich eliminiert, da anzunehmen ist, dass die DC während dieser Manipulationen aufgrund der sehr ähnlichen morphologischen Eigenschaften (Größe, Granularität) im gleichen Ausmaß wie die Lymphozyten verloren gehen. Das Verhältnis von DC zu Lymphozyten bleibt also konstant.

### 2.3.6.3 DC-Ratio

Das Verhältnis von mDC zu pDC (DC-Ratio) wurde mit einer durch Herauskürzung der Blutbildwerte (die für beide Probenansätze eines Patienten identisch sind) gebildeten

Formel (Gl. 5) berechnet. Durch diesen Rechenweg können auch solche Proben eingeschlossen werden, für die keine Hämogramm-Werte vorhanden sind.

$$\text{[Gl. 5] DC-Ratio} = \left( \frac{\text{IKZ.1} * \text{Events in Probe1 gesamt}}{\text{LZG.1}} \right) / \left( \frac{\text{IKZ.2} * \text{Events in Probe2 gesamt}}{\text{LZG.2}} \right)$$

#### 2.3.6.4 Anteil und Absolutkonzentration HLA-DR-exprimierender DC

Der prozentuale Anteil HLA-DR-exprimierender mDC und pDC (HLA.p1 bzw. HLA.p2) wurde unmittelbar während der FACS-Auswertung erhoben. Die absoluten Konzentrationen der HLA-DR-positiven Populationen (HLA.abs1 für mDC, HLA.abs2 für pDC) wurden durch Multiplikation mit den Absolutkonzentrationen bestimmt. Es wurde keine gesonderte Isotypkorrektur für die unspezifische anti-HLA-DR-PerCP-Ak-Bindung durchgeführt. Aufgrund der geringen zu erwartenden Zahlen unspezifisch PE-PerCP-doppeltpositiver Events erscheint dies nicht notwendig.

#### 2.3.6.5 Mittlere PerCP-Intensität der HLA-DR-exprimierenden DC

Die in der FACS-Auswertung abgelesenen Rohwerte für die (dimensionslose) mittlere PerCP-Fluoreszenzintensität von BDCA-1- bzw. BDCA-2-positiven Zellen (MPFI.roh1 und MPFI.roh2) als Maß für deren HLA-DR-Oberflächenexpression wurde entsprechend dem bei der letzten vorhergehenden Geräte-Kalibrierung notwendigen PerCP-Gain (Gain.kalib) und dem bei Probeaufnahme eingestellten Gain (Gain.probe1 bzw. Gain.probe2) rechnerisch korrigiert (Gll. 6 und 7).

$$\text{[Gl. 6] MPFI.1} = \text{MPFI.roh1} * \left( \frac{\text{Gain.kalib}}{\text{Gain.probe1}} \right)$$

$$\text{[Gl. 7] MPFI.2} = \text{MPFI.roh2} * \left( \frac{\text{Gain.kalib}}{\text{Gain.probe2}} \right)$$

#### 2.3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit R (R Development Core Team 2005).

Die Verteilungen der Variablen wurden zunächst graphisch explorativ untersucht und auffällige Ausreißer auf ihre Plausibilität hin überprüft. Normalverteiltetheit wurde anschließend mit dem Shapiro-Wilk-Test, der für kleinere Stichprobenumfänge am ehesten geeignet ist (Yu 1998), objektiviert. Falls angebracht, wurden *log*-Transformierungen zum Erreichen von Normalität angewandt (Grafen und Hails 2002). In diesen

Fällen wurden die Konfidenzintervalle der transformierten Daten bestimmt und rücktransformiert (Bland und Altman 1996).

Die Varianzhomogenität wurde bei normalverteilten Variablen mit dem Bartlett-Test geprüft, der sich gegen Unterschiede in den Gruppengrößen robust verhält (Köhler *et al.* 1992). Bei Abweichung von der Normalverteilung wurde der Fligner-Killeen-Test angewendet (R Development Core Team 2005).

Die Beziehungen des Malariastatus mit den verschiedenen erhobenen Variablen wurde mit einfaktoriellen Varianzanalysen (ANOVA) untersucht (Köhler *et al.* 1992). Bei signifikantem Zusammenhang wurde der Dunnett-Test als *a posteriori*-Mittelwertsvergleich angewendet (Pitocchelli 2001). Hierzu musste eine Erweiterung des Statistikprogrammes benutzt werden (Bretz *et al.* 2005). Der Vergleich mehrerer Mittelwerte im Falle eindeutiger Verletzung der Testvoraussetzungen für die vorstehenden Verfahren wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt (Lang und Secic 1997).

Weitere Zusammenhänge wurden unter Berücksichtigung der Schwierigkeiten bei der Auswertung von „*multiple regression problems*“ (Fahrmeir *et al.* 1996; Grafen und Hails 2002) untersucht, wobei zur Qualitätskontrolle der wichtigsten Modelle graphische Darstellungen der Residuen herangezogen wurden. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs wurden keine Interaktionsterme untersucht. Bei den angegebenen  $r^2$  und  $R^2$  handelt es sich um die angepassten Determinationskoeffizienten (Wulder 2005). Da keine vergleichbaren Datensätze existierten und der Umfang des im Rahmen dieser Arbeit erstellten Datensatzes keine Untergruppen-Analysen zuließ, konnten die Modelle nicht validiert werden.

Falls andere Test für besondere Fragestellungen angewandt wurden, so ist dies bei den Ergebnissen beschrieben. Durchgehend wurde mit zweiseitigen Tests und einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0.05$  gearbeitet.

Fälle mit fehlenden Daten wurden nur aus den Analysen der betroffenen Variablen ausgeschlossen. Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die gültigen Fälle, d. h. fehlende Daten sind aus der Prozentberechnung ausgeklammert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakteristika der Studienpopulation

Es wurden insgesamt 45 Mütter in diese Studie eingeschlossen. Davon waren 11 Frauen Teilnehmerinnen der longitudinalen Hauptstudie, 34 wurden speziell für die vorliegende Arbeit rekrutiert. In 41 Fällen konnten auswertbare FACS-Analysen mit Nabelschnurblut durchgeführt werden, während dies bei vier der eigens für diese Studie rekrutierten Mutter-Kind-Paare aus technischen Gründen nicht möglich war. Diese vier Paare wurden aus allen Analysen ausgeschlossen. In 5 (12.2%) der analysierten Fälle konnte aus technischen Gründen kein Blutbild erstellt werden, sodass diese Patienten — je zwei in den beiden malariabelasteten Patientengruppen 2 und 3 — bei den Auswertungen der entsprechenden Messgrößen bzw. davon abgeleiteter Parameter ausgeschlossen werden mussten. In 4 der analysierten Fälle (9.8%) wurde keine Markierung mit anti-HLA-DR-PerCP durchgeführt, sodass diese vier Patienten aus den diesbezüglichen Analysen ausgeschlossen werden mussten.

#### 3.1.1 Deskriptive Statistik

##### 3.1.1.1 Maternale Soziodemographie

Die Rekrutierung erfolgte etwa zu gleichen Teilen im *Hôpital Albert Schweitzer* und dem *Hôpital Général*. Das Alter bei Geburt betrug im Mittel 22 Jahre (14.5–38.7 Jahre). Dabei waren 15 (36.6%) der Mütter Primigravidae, 9 (22.0%) Secundigravidae und 17 (41.5%) Multigravidae mit bis zu 7 vorherigen Schwangerschaften. Die teilnehmenden Frauen gehörten zum überwiegenden Teil den im Ogooué-Becken lebenden Bantu-Ethnien an. Nur 6 (14.6%) hatten Wurzeln in anderen afrikanischen Regionen.

##### 3.1.1.2 Infektionsepidemiologische Daten und Gruppenzuteilung

Während bei 25 Frauen weder Anzeichen einer vorhandenen Plasmodien-Infektion noch verlässliche Hinweise für eine ebensolche während der Schwangerschaft vorhanden waren (Gruppe 1 „clean“), gab es bei 8 Patientinnen keine Anzeichen für eine vorhandene, jedoch verlässliche Hinweise für eine während der Schwangerschaft abgelaufene Infektion (Gruppe 2 „history“). Bei 8 Frauen wurden Anzeichen für eine vorhandene Infektion gefunden (Gruppe 3 „acute“). Tab. 11 zeigt die Details bez. des Malaria-Status der Individuen in Gruppe 2 und Gruppe 3. Berichte über stattgehabte Infektionen bei fehlender Dokumentation im *carnet de santé* wurden durch intensives

Nachfragen auf ihre Glaubwürdigkeit hin geprüft und ggf. verworfen. Patientinnen wurden auch bei negativem Dicken Tropfen (DT) als akut Malaria-positiv in Gruppe 3 eingeteilt, falls innerhalb der vergangenen Woche extern eine Malaria-Behandlung eingeleitet worden war.

**Tab. 11: Details zur Malariavorgeschichte der Patientinnen.\***

<b>Gruppeneinteilung und Art der Malaria-bezogenen Informationen</b>	<b>n</b>	<b>p. H.</b>
Gruppe 3 "acute"		
mDT und/oder pDT positiv	6	14.6
anbehandelt, DTs negativ	2	4.9
gesamt (Gruppe 3)	8	19.5
Gruppe 2 "history"		
dokumentierte Parasitämie während der Schwangerschaft	3	7.3
verlässlicher Bericht über eine Malaria während der Schwangerschaft	5	12.2
gesamt (Gruppe 2)	8	19.5
Gruppe 1 "clean"		
unglaublicher Bericht über eine Malaria während der Schwangerschaft	1	2.4
keinerlei Anzeichen für eine Malaria während der Schwangerschaft	24	58.5
gesamt (Gruppe 1)	25	61.0
Gesamtpopulation	41	100

\*) Verwendete Abkürzungen: DT = Dicker Tropfen bei Geburt; mDT = maternaler DT; pDT = Plazenta-DT

Die Kombinationen von DT aus mütterlichem und plazentalem Blut (mDT bzw. pDT) sind in Tab. 12 kreuztabuliert dargestellt. In einem Fall mit positiven mDT und pDT war auch der DT des Nabelschnurblutes mit einer niedrigen Parasitämie positiv. Die medianen Parasitämien lagen bei 3000 / $\mu$ l für die mDT und 1650 / $\mu$ l für die pDT.

**Tab. 12: Dicke Tropfen der 8 Frauen in Gruppe 3 „acute“.**

		Plazentablut	
		positiv	negativ
Mutterblut	positiv	4	1
	negativ	--	1
	fehlend	1	1

### 3.1.1.3 Neugeborenenparameter

Die Geburtsdaten der 41 eingeschlossenen Neugeborenen sind in Tab. 13 für die Gesamtpopulation sowie nach Geschlecht differenziert wiedergegeben.

Die Geschlechtsverteilung war mit 18 Jungen und 23 Mädchen ausgeglichen. Bei einer mittleren Schwangerschaftsdauer von 272 Tagen *post menstruationem* (38+6 SSW),

kamen 5 von 37 (13.5%) Babys, für die diesbezügliche Angaben vorhanden waren, definitionsgemäß frühgeburtlich zur Welt, eines wurde übertragen. Die geschlechtsspezifische Häufigkeit von Frühgeburten war mit 3 von 16 Jungen und 2 von 21 Mädchen nicht signifikant unterschiedlich (Fisher's exakter Test).

Das mittlere Geburtsgewicht betrug 3055 g, wobei Jungen im Mittel etwas schwerer waren (3248 g vs. 2903 g; Student's *t*-Test:  $p = 0.011$ ). 1 von 18 Jungen und 4 von 23 Mädchen waren untergewichtig (nicht signifikant verschieden in Fisher's exaktem Test).

**Tab. 13: Neugeborenenparameter.**

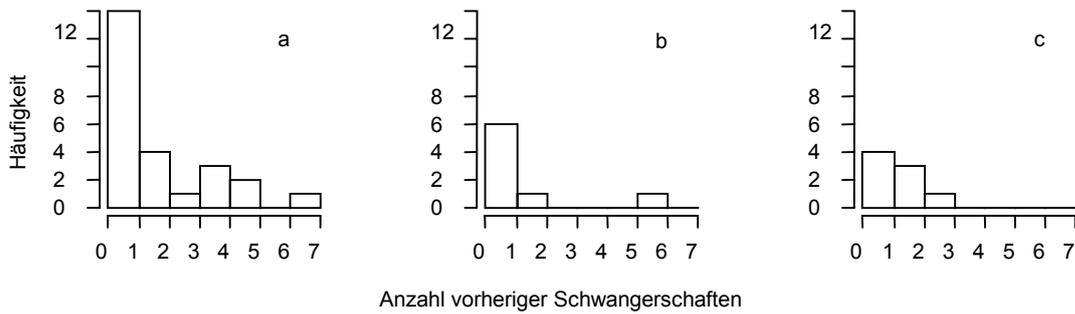
	<b>Gesamtpopulation</b>	<b>männlich</b>	<b>weiblich</b>
Anzahl (Prozent)	41 (100%)	18 (43.9%)	23 (56.1%)
Schwangerschaftsdauer p.m. /d	( <i>n</i> =37)	( <i>n</i> =16)	( <i>n</i> =21)
Mittelwert (min, max; SD)	272.4 (228, 298; 16)	269.4 (228, 298; 20)	274.8 (245, 292; 11)
<37+0 SSW	5/37 (13.5%)	3/16 (18.8%)	2/21 (9.5%)
>=42+0 SSW	1/37 (2.7%)	1/16 (6.3%)	0/21
<b>Körpermaße</b>			
<b>Gewicht /g</b>			
Mittelwert (min, max; SD)	3055 (2190, 3810; 443)	3248 (2320, 3800; 403)	2903 (2190, 3810; 421)
<2500g	5/41 (12.2%)	1/18 (5.6%)	4/23 (17.4%)
<b>Größe /cm</b>			
Mittelwert (min, max; SD)	50 (45, 55; 2.13)	50.6 (47, 55; 2.55)	49.5 (46, 52; 1.65)
<b>Thoraxumfang /cm</b>			
Mittelwert (min, max; SD)	31.6 (27.5, 34; 1.84)	31.8 (29, 34; 1.86)	31.5 (27.5, 34; 1.85)
<b>Oberarmumfang /cm</b>			
Mittelwert (min, max; SD)	10.7 (9, 14; 1.18)	10.83 (9, 14; 1.42)	10.65 (9, 12; 0.98)
<b>Kopfumfang /cm</b>			
Mittelwert (min, max; SD)	33.2 (30, 36; 1.58)	33.6 (30, 36; 1.65)	32.8 (30, 35; 1.46)
<b>APGAR</b>			
Median (min, max)	( <i>n</i> =39) 10 (6, 10)	( <i>n</i> =18) 9 (7, 10)	( <i>n</i> =21) 10 (6, 10)
=10	21 (53.8%)	8 (44.4%)	13 (61.9%)
=9	10 (25.6%)	6 (33.3%)	4 (19.0%)
=8	4 (10.3%)	3 (16.7%)	1 (4.8%)
<=7	4 (10.3%)	1 (5.6%)	3 (14.3%)

### 3.1.2 Korrelationsanalysen mit dem Malariastatus

Größen, bei denen ein Zusammenhang mit dem Malariastatus plausibel erschien, wurden auf Gruppenunterschiede hin untersucht.

Abb. 1 zeigt die Verteilung der Anzahl vorheriger Schwangerschaften in Abhängigkeit vom Malariastatus. Die Anteile der Primigravidae an den Gruppen 1, 2 und 3 betragen 14/25, 6/8 bzw. 4/8 und waren im  $\chi^2$ -Homogenitätstest nicht signifikant unterschiedlich.

Das Geburtsgewicht in Gruppe 2 „history“ war mit einem Mittelwert (Interquartilsbereich) von 2828 g (2613–3060 g) etwas niedriger als in Gruppe 3 mit 2961 g (2713–3185 g) und der unbelasteten Gruppe 1 mit 3157 g (2900–3490 g). Dieser Zusammenhang war in der *one-way ANOVA* nicht signifikant.



**Abb. 1: Graviditätsstatus in den drei Patientengruppen.** a) Gruppe 1; b) Gruppe 2; c) Gruppe 3.

Die Schwangerschaftsdauer war im Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant assoziiert mit der Zugehörigkeit zu den Malariagruppen, mit Mittelwerten (Interquartilsbereichen) von 274.6 Tagen (271.5–284.5 d) in Gruppe 1 „clean“, 269.5 Tagen (263.0–285.5 d) in Gruppe 2 „history“ und 268.0 Tagen (265.0–270.5 d) in Gruppe 3 „acute“.

### 3.2 DC im Nabelschnurblut

Es sei vorab kurz darauf hingewiesen, dass Formulierungen wie „X hatte einen signifikanten Einfluss auf Y“ im statistischen Sinne zu verstehen sind und nicht als Beschreibung eines Kausalzusammenhanges angesehen werden dürfen.

#### 3.2.1 Durchflusszytometrische Identifizierung der DC

Im Rahmen der ersten Versuche wurden Ansätze mit den DC-Markern (FL2) und CD34 (FL1) untersucht. Es zeigte sich keine über Hintergrundrauschen hinausgehende Doppelfärbung. Somit konnten keine zahlenmäßig relevanten BDCA-1<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> bzw. BDCA-2<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> Zellpopulationen gefunden werden.

#### 3.2.2 Verteilung der DC-Subtypen in der Gesamtpopulation

Die Messwerte für die DC-Subtypenverteilung in der gesamten Studienpopulation sind mit wichtigen Lageparametern und Streuungsmaßen in Tab. 14 aufgeführt. Da die Werte für beide DC-Subtypen ausgeprägte Spannweiten aufwiesen und nicht normalverteilt waren, wurden für die zentrale Tendenz geometrische Mittelwerte berechnet.

Es lagen im Mittel signifikant mehr plasmazytoide als myeloide DC vor ( $p = 0.0001$ ;  $t$ -Test für verbundene Stichproben nach  $\log$ -Transformation). Die Mittelwerte (95% Konfidenzintervall) lagen bei 4884 (3548–6723) myeloiden und 7160 (4895–10472) plasmazytoiden Zellen /ml. Die Differenz (mDC /ml - pDC /ml) wies einen Median von

-2829 Zellen /ml auf bei einer Spannweite von -62650 bis +5344 Zellen /ml. Dementsprechend hatte das Verhältnis von mDC zu pDC einen Mittelwert (25., 75. Perzentile) von 0.69 (0.45, 1.05). Dabei gab es mit Werten von 0.16 bis 1.99 eine große Variationsbreite.

**Tab. 14: Dendritische Zellen in der Gesamtpopulation.**

	geometr. Mittel	95% Konfidenzintervall	Spannweite
BDCA-1 <sup>+</sup> DC /ml	4884	3548–6732	514–31470
BDCA-2 <sup>+</sup> DC /ml	7160	4895–10472	585–89600
DC insgesamt /ml	12432	8779–17606	1099–116500
BDCA-1 <sup>+</sup> DC/BDCA-2 <sup>+</sup> DC	0.687	0.578–0.816	0.158–1.988

Die Messergebnisse für die HLA-DR-Oberflächenexpression sind in Tab. 15 dargestellt. Der mittlere Anteil HLA-DR-exprimierender Zellen war mit einem Mittelwert (Median) von 83.1% (85.0%) bei den myeloiden DC signifikant niedriger als bei den pDC mit 89.2% (91.5%). Aufgrund der fehlenden Normalverteilung der pDC-Werte, die nicht durch eine Transformation behoben werden konnte, wurde als statistischer Test der Wilcoxon-*signed-rank*-Test durchgeführt, der einen  $p$ -Wert  $< 5 \cdot 10^{-6}$  ergab. Die Differenz (HLA-DR<sup>+</sup> mDC % - HLA-DR<sup>+</sup> pDC %) wies einen Median von -4.6% auf und eine Spannweite von -24.4% bis +10.3 %.

**Tab. 15: HLA-DR-Oberflächenexpression in der Gesamtstudienpopulation.**

	Mittelwert	95% Konfidenzintervall	Spannweite
HLA-DR+ BDCA-1 <sup>+</sup> DC (%)	83.1 <sup>a</sup>	80.2–86.1	60.4–98.2
HLA-DR+ BDCA-2 <sup>+</sup> DC (%)	89.2 <sup>b</sup>	86.8–91.7	74.6–98.5
HLA-DR+ BDCA-1 <sup>+</sup> DC /ml	4043 <sup>b</sup>	2881–5674	367–27980
HLA-DR+ BDCA-2 <sup>+</sup> DC /ml	6405 <sup>b</sup>	4288–9567	434–84960
PerCP-Intensität (BDCA-1 <sup>+</sup> DC)	18.56 <sup>a</sup>	17.01–20.12	10.79–29.92
PerCP-Intensität (BDCA-2 <sup>+</sup> DC)	5.67 <sup>a</sup>	5.21–6.12	3.10–8.19

a) arithmetisches Mittel; b) geometrisches Mittel

Die in Tab. 15 aufgeführten Absolutkonzentrationen der HLA-DR-exprimierenden DC spiegeln die bereits beschriebenen Verhältnisse der Subtypenverteilung und der prozentualen Anteile HLA-DR<sup>+</sup> Zellen wider.

Die (kalibrierungskorrigierte) mittlere PerCP-Fluoreszenzintensität als Maß für die HLA-DR-Oberflächen-Expression der Zellen lag bei den mDC mit 18.56 Einheiten deutlich höher als bei den pDC, für die ein Mittelwert von 5.67 Einheiten bestimmt wurde ( $p < 1 \cdot 10^{-6}$ ;  $t$ -Test für verbundene Stichproben).

### 3.2.3 DC-Parameter in Abhängigkeit vom maternalen Malariastatus

Die in dieser Arbeit bestimmten DC-Parameter von primärem Interesse sind mit Lokations- und Streuungsmaßen in Tab. 16 dargestellt, wobei für in den Malariagruppen normalverteilte Werte das arithmetische Mittel als Lageparameter gewählt wurde, während in den restlichen Fällen das geometrische Mittel angegeben ist.

Der Einfluss der maternalen Malariaanamnese (Zugehörigkeit zu Gruppe 1 „clean“, Gruppe 2 „history“ oder Gruppe 3 „acute“) auf die im Rahmen dieser Studie bestimmten DC-Parameter wurde zunächst mit Hilfe von einfaktoriellen Varianzanalysen (engl. *one-way ANOVA*) untersucht.

**Tab. 16: Deskriptive Statistik der primären Messgrößen in den drei Studiengruppen**

Messgröße	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
	Mittelwert (Interquartilbereich)		
BDCA-1 <sup>+</sup> DC /ml <sup>a</sup>	3574 (1862–5601)	7383 (4924–9705)	9981 (6998–14560)
BDCA-2 <sup>+</sup> DC /ml <sup>a</sup>	5428 (2438–11720)	10022 (8043–16330)	13979 (7728–15130)
BDCA-1 <sup>+</sup> DC / BDCA-2 <sup>+</sup> DC <sup>b</sup>	0.756 (0.441–0.878)	0.791 (0.542–0.931)	0.880 (0.507–1.144)
Anteil HLA-DR <sup>+</sup> Zellen an BDCA-1 <sup>+</sup> DC /% <sup>b</sup>	81.4 (75.7–87.3)	85.6 (81.8–91.7)	86.5 (81.9–90.8)
Anteil HLA-DR <sup>+</sup> Zellen an BDCA-2 <sup>+</sup> DC /% <sup>b</sup>	88.2 (84.6–93.3)	91.1 (86.4–97.7)	92.2 (91.3–94.3)
HLA-DR <sup>+</sup> BDCA-1 <sup>+</sup> DC /ml <sup>a</sup>	2888 (1660–4580)	6382 (4419–8962)	8616 (6349–13220)
HLA-DR <sup>+</sup> BDCA-2 <sup>+</sup> DC /ml <sup>a</sup>	4771 (1926–10830)	9259 (7524–15720)	12885 (7066–13490)
Mittlere PerCP-Inten- sität auf BDCA-1 <sup>+</sup> DC <sup>b</sup>	18.74 (16.24–21.32)	18.44 (13.88–20.52)	18.04 (15.22–20.93)
Mittlere PerCP-Inten- sität auf BDCA-2 <sup>+</sup> DC <sup>b</sup>	5.65 (4.45–6.90)	5.36 (4.49–6.17)	6.15 (5.33–6.87)

<sup>a</sup> geometrisches Mittel      <sup>b</sup> arithmetisches Mittel

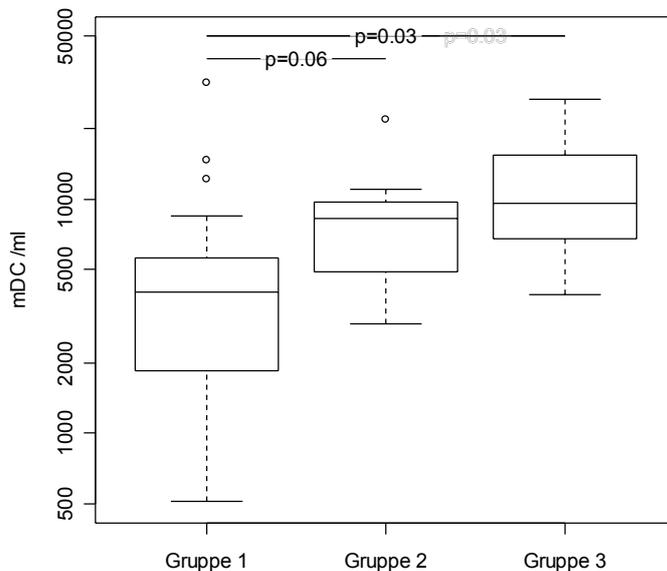
Die einfaktorielle Varianzanalyse für die (logarithmierte) absolute Konzentration von mDC im Nabelschnurblut, die in Tab. 17 beschrieben ist, zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Malariagruppen an ( $F_{2,33} = 4.34$ ;  $p = 0.021$ ). Weiterführende

Auswertung mit *Dunnett's* Test für multiple Mittelwertsvergleiche ergab eine signifikant höhere Zahl von mDC pro Volumen bei Neugeborenen in Gruppe 3 als bei solchen in Gruppe 1 ( $p = 0.028$ ). Die mDC-Absolutkonzentration im Nabelschnurblut in Gruppe 2 war ebenfalls tendenziell erhöht gegenüber Gruppe 1, jedoch erwies sich dieser Unterschied im *Dunnett's* Test als nicht signifikant ( $p = 0.061$ ; Abb. 2).

Die Testvoraussetzungen waren nach Logarithmierung der Werte erfüllt. Die Vorhersagequalität dieses *one-way ANOVA*-Modells (engl. *goodness-of-fit*) wurde mit Hilfe graphischer Darstellungen der Residuen untersucht. Dabei zeigte sich eine akzeptable, wenn auch nicht überragende *goodness-of-fit* für dieses Modell.

**Tab. 17: Einfaktorielle Varianzanalyse der logarithmierten Absolutkonzentration BDCA-1<sup>+</sup> DC.**

Ursache	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	<i>F</i>	<i>p</i>
Malariagruppe	2	6.503	3.252	4.338	0.021
Rest	33	24.732	0.750	—	—
Gesamt	35	31.235	—	—	—



**Abb. 2: Absolutkonzentrationen der BDCA-1<sup>+</sup> DC in den drei Studiengruppen.**

Im Gegensatz zu den Analysen für die mDC-Konzentrationen ergab die *one-way ANOVA* für den Zusammenhang zwischen pDC-Zahlen im Nabelschnurblut und mütterlicher Malariakategorie keine signifikanten Gruppenunterschiede (Tab. 18). Zwar lag die Variabilität zwischen den Malariagruppen mit einer Quadratsumme von

SQ = 5.242 in derselben Größenordnung wie bei den mDC mit SQ = 6.503, doch blieb eine fast doppelt so hohe Restfehlervariabilität. Es gab wiederum tendenziell höhere Werte in den Patientengruppen 2 und 3 (Tab. 16) und die Testvoraussetzungen waren nach Logarithmierung erfüllt, doch lag eine noch größere Streuung der Messwerte vor.

**Tab. 18: Einfaktorielle Varianzanalyse der logarithmierten Absolutkonzentration BDCA-2<sup>+</sup> DC.**

Ursache	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	F	P
Malariagruppe	2	5.242	2.621	2.220	0.125
Rest	33	38.965	1.181	—	—
Gesamt	35	44.207	—	—	—

Wie sich in der *one-way ANOVA* des mDC:pDC-Ratios mit der Malariagruppe als explanatorischer Variable zeigte, wurde das Verhältnis der Konzentrationen BDCA-1<sup>+</sup> und BDCA-2<sup>+</sup> DC im Nabelschnurblut nicht signifikant von der maternalen Malariavorgeschichte beeinflusst (Tab. 19).

Wie Tab. 16 zu entnehmen ist, lagen die geometrischen Mittelwerte (Mediane) mit 0.76 (0.74), 0.79 (0.71) und 0.88 (0.72) für die Gruppen 1, 2 und 3 dicht beieinander, wobei in Gruppe 3 die Variabilität der Werte am ausgeprägtesten war.

**Tab. 19: Einfaktorielle Varianzanalyse des Ratios BDCA-1<sup>+</sup> zu BDCA-2<sup>+</sup> DC.**

Ursache	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	F	p
Malariagruppe	2	0.093	0.046	0.262	0.771
Rest	38	6.725	0.177	—	—
Gesamt	40	6.818	—	—	—

Wie Tab. 20 und Tab. 21 zu entnehmen, war die Malariagruppe keine signifikante Einflussgröße für den prozentualen Anteil HLA-DR auf der Zelloberfläche exprimierender BDCA-1<sup>+</sup> oder BDCA-2<sup>+</sup> DC. Die Werte lagen in allen drei Gruppen für die pDC etwas höher als für die mDC (Tab. 16).

Die Untersuchungen der absoluten Konzentrationen HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-1<sup>+</sup> bzw. HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> DC spiegelten die Verhältnisse bei den Absolutkonzentrationen aller BDCA-1<sup>+</sup> bzw. BDCA-2<sup>+</sup> DC wider sowie die fehlenden Gruppenunterschiede bei den Anteilen HLA-DR<sup>+</sup> Zellen (Tab. 22, Tab. 23). Dementsprechend fand sich nach *log*-Transformation in der einfaktoriellen Varianzanalyse für die Absolutkonzentration

HLA-DR<sup>+</sup> mDC ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Patientengruppen ( $F_{2,33} = 4.48$ ;  $p = 0.019$ ). Die  $p$ -Werte entsprachen denen für die Gruppenunterschiede der Absolutkonzentrationen der gesamten mDC, wobei der Unterschied zwischen Gruppe 3 und Gruppe 1 einen  $p$ -Wert von 0.027 in *Dunnnett's* Testprozedur erhielt, derjenige zwischen Gruppe 2 und Gruppe 1 auf  $p = 0.053$  kam. Die Testvoraussetzungen waren nach *log*-Transformation der Messwerte erfüllt.

**Tab. 20: Einfaktorielle Varianzanalyse des prozentualen Anteils HLA-DR<sup>+</sup> Zellen an den BDCA-1<sup>+</sup> DC.**

Ursache	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	<i>F</i>	<i>p</i>
Malariagruppe	2	188.6	94.3	1.204	0.313
Rest	34	2662.9	78.3	—	—
Gesamt	36	2851.5	—	—	—

**Tab. 21: Einfaktorielle Varianzanalyse des prozentualen Anteils HLA-DR<sup>+</sup> Zellen an den BDCA-2<sup>+</sup> DC.**

Ursache	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	<i>F</i>	<i>P</i>
Malariagruppe	2	103.0	51.5	1.005	0.377
Rest	34	1742.3	51.2	—	—
Gesamt	36	1845.3	—	—	—

**Tab. 22: Einfaktorielle Varianzanalyse der logarithmierten Absolutkonzentration HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-1<sup>+</sup> DC.**

Ursache	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	<i>F</i>	<i>p</i>
Malariagruppe	2	7.495	3.747	4.481	0.019
Rest	33	27.599	0.836	—	—
Gesamt	35	35.094	—	—	—

**Tab. 23: Einfaktorielle Varianzanalyse der logarithmierten Absolutkonzentration HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> DC.\***

Ursache	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	<i>F</i>	<i>p</i>
Malariagruppe	2	5.88	2.94	2.237	0.123
Rest	33	43.36	1.31	—	—
Gesamt	35	49.24	—	—	—

\*) Werte in Gruppe 3 auch nach *log*-Transformation nicht normalverteilt. Kruskal-Wallis-Test:  $p = 0.212$ .

Für die HLA-DR<sup>+</sup> pDC war entsprechend der vorherigen Analysen kein solcher Zusammenhang mit der Studiengruppeneinteilung erkennbar. Da die Bedingung der Normal-

verteilung in Gruppe 3 auch noch nach Logarithmierung verletzt war, wurde hierbei der Kruskal-Wallis-Test angewendet ( $p = 0.212$ ).

Die Auswertung des Zusammenhangs von HLA-DR-Expression, gemessen als mittlere PerCP-Fluoreszenzintensität auf der Gesamtheit der als HLA-DR<sup>+</sup> klassifizierten BDCA-1<sup>+</sup> bzw. BDCA-2<sup>+</sup> DC einer Probe, mit dem Malariastatus der Mutter, ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede (Tab. 24, Tab. 25).

**Tab. 24: Einfaktorielle Varianzanalyse der mittleren PerCP-Intensität auf BDCA-1<sup>+</sup> DC.**

Ursache	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	<i>F</i>	<i>p</i>
Malariagruppe	2	2.54	1.27	0.055	0.946
Rest	34	779.58	22.93	—	—
Gesamt	36	782.12	—	—	—

**Tab. 25: Einfaktorielle Varianzanalyse der mittlere PerCP-Intensität auf BDCA-2<sup>+</sup> DC.**

Ursache	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	<i>F</i>	<i>p</i>
Malariagruppe	2	2.17	1.08	0.571	0.571
Rest	34	64.51	1.90	—	—
Gesamt	36	66.68	—	—	—

### 3.2.4 Auswertung unter Berücksichtigung anderer Variablen

Mehrere Parameter, von denen angenommen wurde, dass sie möglicherweise einen Einfluss auf die verschiedenen DC-Parameter haben könnten, wurden registriert und in ihrer Rolle als mögliche Störfaktoren untersucht. Die entsprechenden Messwerte sind in Tab. 26 zusammengefasst.

Das Fehlen signifikanter Gruppenunterschiede macht es unwahrscheinlich, dass diese Messgrößen verfälschende Einflüsse auf Zusammenhänge zwischen Malariagruppen und DC-Parametern ausüben, insbesondere, dass sie für den signifikanten Zusammenhang der Absolutkonzentrationen der mDC und HLA<sup>+</sup> mDC mit der Gruppenzugehörigkeit verantwortlich wären.

**Tab. 26: Deskriptiva möglicherweise die DC-Parameter beeinflussender Faktoren in den drei malariologischen Patientenkategorien.\***

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Geschlecht (♀:♂)	14:11	4:4	5:3
Geburtsgewicht <sup>a</sup> /g	3157 (2900–3490)	2828 (2613–3060)	2961 (2713–3185)
Schwangerschaftsdauer <sup>a</sup> /d	274.6 (271.5–284.5)	269.5 (263.0–285.5)	268.0 (265.0–270.5)
Maternales Alter <sup>a</sup> /a	23.0 (18.5–25.3)	19.8 (17.6–20.9)	21.5 (19.1–24.0)
Anzahl vorheriger Schwangerschaften <sup>b</sup>	1 (0–7)	0 (0–6)	1 (0–3)

<sup>a</sup> arithmetisches Mittel (Interquartilsbereich)

<sup>b</sup> Median (Spannweite)

\*) Tests zeigten keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede an ( $\chi^2$ , ANOVA, Kruskal-Wallis).

Um jedoch möglicherweise zusätzlich existierende Zusammenhänge zwischen diesen Größen und den im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmten DC-Parameter aufzudecken, wurden diese durch *one-way ANOVA* für die (entsprechend der vorherigen Analysen ggf. logarithmierten) DC-Größen mit den Faktoren aus Tab. 26 als unabhängigen Variablen untersucht sowie im Falle der signifikant mit der Malaria-gruppe zusammenhängenden mDC-Größen zusätzlich in Kombination mit der Malariagruppe als weiterer explanatorischer Variablen (*two-way ANOVA*).

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs wurde von einer Bonferroni-Korrektur Abstand genommen. Die Bedeutsamkeiten der gefundenen Zusammenhänge muss dementsprechend vorsichtig unter Beachtung der statistischen Kenngrößen, Berücksichtigung von Überlegungen zur Plausibilität der Assoziationen und insgesamt zurückhaltend bewertet werden.

### 3.2.4.1 One-way ANOVA

Die Ergebnisse von *one-way ANOVA*, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen zwei Größen anzeigten, sind in Tab. 27 zusammengefasst.

Die Steigung der Regressionsgeraden für die (logarithmierte) Konzentration der mDC in Abhängigkeit vom maternalen Alter war signifikant kleiner als Null. Dies zeigt an, dass die Konzentration dieser DC-Subpopulation im Nabelschnurblut des Neugeborenen mit steigendem Alter der Mutter eher abnimmt ( $\Delta y/\Delta x = -0.072$ ; 95% KI = -0.134 bis -0.009;  $t = -2.34$ ;  $p = 0.025$ ;  $Y = 10.06 - 0.072X$ ;  $r^2 = 0.11$ ).

Ein analoger Trend zeigte sich für die (logarithmierte) pDC-Konzentration ( $\Delta y/\Delta x = -0.082$ ; 95% KI -0.157 bis -0.007;  $t = -2.227$ ;  $p = 0.033$ ;  $Y = 10.657 - 0.082X$ ;  $r^2 = 0.10$ ).

Qualitativ die gleichen Beziehungen bestanden für die (logarithmierten) Konzentrationen HLA-DR<sup>+</sup> mDC ( $\Delta y/\Delta x = -0.075$ ; 95% KI -0.141 bis -0.008;  $t = -2.282$ ;  $p = 0.029$ ;  $Y = 9.925 - 0.075X$ ;  $r^2 = 0.11$ ) und HLA-DR<sup>+</sup> pDC ( $\Delta y/\Delta x = -0.087$ ; 95% KI -0.166 bis -0.008;  $t = -2.241$ ;  $p = 0.032$ ;  $Y = 10.654 - 0.087X$ ;  $r^2 = 0.10$ ).

Im Falle der pDC zeigte (nach Logarithmierung) sowohl die Gesamtkonzentration ( $\Delta y/\Delta x = -0.228$ ; 95% KI: -0.438 bis -0.019;  $t = -2.215$ ;  $p = 0.034$ ;  $Y = 9.219 - 0.228X$ ;  $r^2 = 0.10$ ) als auch die Konzentration der HLA-DR<sup>+</sup> Subpopulation ( $\Delta y/\Delta x = -0.248$ ; 95% KI: -0.468 bis -0.028;  $t = -2.289$ ;  $p = 0.028$ ;  $Y = 9.137 - 0.248X$ ;  $r^2 = 0.11$ ) einen negativen Zusammenhang mit der Anzahl vorheriger Schwangerschaften (AVS). Die Absolutkonzentrationen der pDC im CB nimmt also mit steigender AVS eher ab.

Die Steigung der Regressionsgeraden für den prozentualen Anteil HLA-DR<sup>+</sup> Zellen an den mDC in Abhängigkeit von der Schwangerschaftsdauer (SSD) in Tagen war signifikant kleiner als Null, womit diese Messgröße mit steigender SSD eher abnimmt ( $\Delta y/\Delta x = -0.186$ ; 95% KI -0.351 bis -0.020;  $t = -2.290$ ;  $p = 0.029$ ;  $Y = 133.70 - 0.186X$ ;  $r^2 = 0.12$ ).

Des Weiteren gab es eine Tendenz zu einem geringeren Anteil HLA-DR<sup>+</sup> Zellen an den pDC mit steigender Anzahl vorheriger Schwangerschaften ( $\Delta y/\Delta x = -1.530$ ; 95% KI -2.839 bis -0.220;  $t = -2.372$ ;  $p = 0.023$ ;  $Y = 91.72 - 1.530X$ ;  $r^2 = 0.11$ ).

### 3.2.4.2 Two-way ANOVA

Die *two-way ANOVA* für den Zusammenhang der Absolutkonzentration mit maternalem Alter und Malariagruppe zeigte weiterhin einen signifikanten Einfluss beider unabhängiger Variablen (Tab. 28). Wie den in dieser sowie der *one-way ANOVA*-Tab. 27 aufgeführten Quadratsummen der Residuen zu entnehmen ist, überschneiden sich dabei die Effekte der zwei explanatorischen Größen kaum.

Die Regressionsmodelle für diese Analysen sind in Tab. 29 zusammengefasst. Die dabei eingeschlossenen explanatorischen Variablen konnten  $R^2 = 25.5\%$  der Variabilität der (logarithmierten) Konzentration der mDC bzw.  $R^2 = 25.4\%$  der Variabilität der (logarithmierten) Konzentration HLA-DR<sup>+</sup> mDC im Nabelschnurblut erklären. Die

graphische Untersuchung der Residuen zeigte eine gegenüber den Modellen ohne Berücksichtigung des maternalen Alters verbesserte *goodness-of-fit*.

**Tab. 27: Statistische Kenngrößen aller signifikante Zusammenhänge anzeigenden *one-way ANOVA* von DC-Messwerten und möglichen Störfaktoren.** Es wurden alle Paarungen der neun bestimmten DC-Parameter (Tab. 16) mit den fünf Faktoren aus Tab. 26 untersucht. SSD = Schwangerschaftsdauer; AVS = Anzahl vorheriger Schwangerschaften.

<u>Abhängige Variable</u>	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	F	p
<u>log(BDCA-1<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Maternales Alter	1	4.329	4.329	5.470	0.025
Rest	34	26.907	0.791	—	—
Gesamt	35	31.236	—	—	—
<u>log(BDCA-2<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Maternales Alter	1	5.628	5.628	4.960	0.033
Rest	34	38.579	1.135	—	—
Gesamt	35	44.207	—	—	—
<u>log(BDCA-2<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
AVS	1	5.576	5.576	4.907	0.034
Rest	34	38.631	1.136	—	—
Gesamt	35	44.207	—	—	—
<u>HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-1<sup>+</sup> DC / BDCA-1<sup>+</sup> DC /%</u>					
SSD	1	301.21	301.21	5.245	0.029
Rest	31	1780.26	57.43	—	—
Gesamt	32	2081.47	—	—	—
<u>HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> DC / BDCA-2<sup>+</sup> DC /%</u>					
AVS	1	255.49	255.49	5.625	0.023
Rest	35	1589.76	45.42	—	—
Gesamt	36	1845.25	—	—	—
<u>log(HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-1<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Maternales Alter	1	4.660	4.660	5.206	0.029
Rest	34	30.433	0.895	—	—
Gesamt	35	35.093	—	—	—
<u>log(HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Maternales Alter	1	6.337	6.337	5.023	0.032
Rest	34	42.896	1.262	—	—
Gesamt	35	49.233	—	—	—
<u>log(HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
AVS	1	6.573	6.573	5.239	0.028
Rest	34	42.660	1.255	—	—
Gesamt	35	49.233	—	—	—

**Tab. 28: Two-way ANOVA der Beziehungen zwischen den Konzentrationen (HLA-DR<sup>+</sup>) BDCA-1<sup>+</sup> DC im Nabelschnurblut und der Malariavorgeschichte sowie dem maternalen Alter.**

<u>Abhängige Variable</u>					
Explanatorische Variable	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	F	p
<u>log(BDCA-1<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Malariagruppe	2	6.503	3.252	4.890	0.014
Maternales Alter /a	1	3.455	3.455	5.196	0.029
Rest	32	21.277	0.665	—	—
Gesamt	35	31.235	—	—	—
<u>log(HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-1<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Malariagruppe	2	7.495	3.747	5.009	0.013
Maternales Alter /a	1	3.659	3.659	4.891	0.034
Rest	32	23.939	0.748	—	—
Gesamt	35	35.093	—	—	—

**Tab. 29: Parameter der linearen Regressionsmodelle für die Zusammenhänge der Konzentrationen BDCA-1<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-1<sup>+</sup> DC im Nabelschnurblut mit maternaler Malariavorgeschichte und maternalem Alter.**

<u>Abhängige Variable</u>					
Explanatorische Variable	Koeffizient (β)	Standardfehler	95% KI	t	p
<u>log(BDCA-1<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Y <sub>0</sub>	9.630	0.658	—	—	—
Malariagruppe 2	0.581	0.358	-0.148 bis +1.309	1.62	0.114
Malariagruppe 3	1.014	0.374	0.252 bis 1.775	2.71	0.011
Maternales Alter /y	-0.065	0.029	-0.124 bis -0.007	-2.28	0.029
<u>log(HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-1<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Y <sub>0</sub>	9.460	0.698	—	—	—
Malariagruppe 2	0.644	0.379	-0.129 bis +1.416	1.70	0.100
Malariagruppe 3	1.079	0.397	0.272 bis 1.887	2.72	0.010
Maternales Alter /y	-0.067	0.030	-0.129 bis -0.005	-2.21	0.034

In der *two-way ANOVA* mit Einschluss der Schwangerschaftsdauer (SSD) verloren die Zusammenhänge zwischen Malariagruppen und mDC- bzw. HLA-DR<sup>+</sup> mDC-Absolutkonzentrationen ihre statistische Signifikanz (Tab. 30). Die SSD wies jedoch in der *one-way ANOVA* keine signifikante Beziehung zu diesen DC-Größen auf. Des Weiteren wurde durch zwei fehlende Absolutkonzentrationen und zwei fehlende SSD-Werte bei

anderen Mitgliedern der Gruppe 3 der Umfang dieser Patientengruppe in dieser Analyse auf  $n = 4$  reduziert, was ebenfalls für den Verlust des signifikanten Einflusses der Zugehörigkeit zu dieser Gruppe auf die DC-Größen verantwortlich gemacht werden kann.

Daher wurden die in Tab. 29 dargestellten Modelle mit der Malariagruppe und dem maternalen Alter als einzigen explanatorischen Variablen als zutreffendste Beschreibungen der realen Zusammenhänge zwischen (HLA-DR<sup>+</sup>) mDC-Konzentrationen und den diversen in Betracht genommenen Einflussgrößen gewertet.

Ebenfalls nicht-signifikant wurden die Einflüsse der AVS auf die (logarithmierten) Absolutkonzentrationen (HLA-DR<sup>+</sup>) BDCA-2<sup>+</sup> DC in der *two-way ANOVA* mit dem maternalen Alter als weiterer explanatorischen Variablen (Tab. 31). Wurden die AVS in diesen Analysen als erste unabhängige Variable eingeschlossen, verlor dagegen das maternale Alter den signifikanten Zusammenhang, was darauf hindeutet, dass sich die Einflüsse dieser beiden Größen auf die DC-Messwerte stark überschneiden.

**Tab. 30: *Two-way ANOVA* mit Verlust des signifikanten Zusammenhangs zwischen Patientenkategorien und den Messwerten für die Frequenzen (HLA-DR<sup>+</sup>) BDCA-1<sup>+</sup> DC. SSD = Schwangerschaftsdauer.**

<u>Abhängige Variable</u>					
Explanatorische Variable	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	F	p
<u><i>log</i>(BDCA-1<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Malariagruppe	2	4.359	2.179	3.012	0.065
SSD /d	1	0.661	0.661	0.914	0.347
Rest	28	20.261	0.724	—	—
Gesamt	31	25.281	—	—	—
<u><i>log</i>(HLA<sup>+</sup> BDCA-1<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Malariagruppe	2	5.091	2.545	3.202	0.056
SSD /d	1	0.977	0.977	1.229	0.277
Rest	28	22.259	0.795	—	—
Gesamt	31	28.327	—	—	—

**Tab. 31: Two-way ANOVA für den Zusammenhang von maternalem Alter und Anzahl vorheriger Schwangerschaften (AVS) mit den pDC-Konzentrationen.**

<u>Abhängige Variable</u>					
Explanatorische Variable	FG	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	F	p
<u>log(BDCA-2<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Maternales Alter /a	1	5.628	5.628	4.889	0.034
AVS	1	0.595	0.595	0.517	0.477
Rest	33	37.984	1.151	—	—
Gesamt	35	44.207	—	—	—
<u>log(HLA<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> DC /ml)</u>					
Maternales Alter /a	1	6.337	6.337	4.973	0.033
AVS	1	0.838	0.838	0.658	0.423
Rest	33	42.058	1.274	—	—
Gesamt	35	49.233	—	—	—

## 4 Diskussion

### 4.1 Allgemeine statistische Vorbemerkungen

Der geringe Studienumfang begrenzt die Aussagekraft der Ergebnisse. Es ist gut möglich, dass mehrere interessante und biologisch relevante Einflussgrößen aufgrund der geringen Größe der Patientengruppen und der bei einem Großteil der Analysen vorhandenen unbalancierten Gruppengrößen nicht zu statistisch signifikanten Unterschieden führen (Lüpsen 2005). Dagegen werden die beschriebenen signifikanten Assoziationen durch die  $p$ -Werte quantitativ bewertet und man sollte annehmen, dass sie damit möglicherweise sinnvoller beurteilt werden können als fehlende Zusammenhänge.

### 4.2 Beurteilung der Methoden

#### 4.2.1 Verlässlichkeit der Malariadiagnostik

Die Malariadiagnostik wurde mit Hilfe einer Variante des Dicken Tropfens (DT) durchgeführt (Borrmann *et al.* 2002). Eine PCR-Untersuchung der Plazentapräparate konnte aufgrund begrenzter Ressourcen bisher nicht durchgeführt werden. Da der DT jedoch eine sehr hohe Spezifität besitzt (Ndao *et al.* 2004), kann zunächst davon ausgegangen werden, dass in erster Linie falsch negative Befunde ein Hintergrundrauschen in den untersuchten DC-Größen verursachen, die signifikante Zusammenhänge kaschieren, jedoch keine Signifikanzen generieren.

#### 4.2.2 Bewertung des FACS-Protokolls

Es kam die im Vergleich zu Vollblutprotokollen zwar aufwändigere, aber auch verlässlichere DC-Bestimmung aus mononukleären Zellen zum Einsatz. Da keine für die DC-Marker BDCA-1 oder BDCA-2 und den Stammzellmarker CD34 doppelt-positiven Zellpopulationen gefunden werden konnten, wurde auf die weitere Verwendung von anti-CD34-Fluoreszenzantikörpern verzichtet.

Sorg *et al.* (1999) sahen die Verwendung von CD34 in ihrem Protokoll aufgrund des hohen Vorkommens HLA-DR<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> Zellen im CB als notwendig an und Drohan *et al.* (2004) wiesen auf eine im CB vermehrte CD123<sup>low</sup> CD34<sup>+</sup> Population hin, wohingegen eine andere Gruppe mit und ohne Berücksichtigung von CD34 keinen Unter-

schied in ihren mDC/pDC-Enumerationen fand (Ueda *et al.* 2003). Im Rahmen der CBDC-Studien, die BDCA-Antigene zur Charakterisierung der Subpopulationen verwendeten, scheint CD34 nicht untersucht worden zu sein (Schibler *et al.* 2002; Darmochwal-Kolarz *et al.* 2004). Möglicherweise werden die in der vorliegenden Disserationsarbeit zur Anwendung gekommenen DC-Marker erst ab einem späteren Differenzierungsstadium auf der Zelloberfläche exprimiert, sodass CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen bei diesem Protokoll nicht mit der Enumeration der CBDC-Subpopulationen interferieren, während dies bei der Verwendung von CD11c/CD123 aufgrund einer frühen CD123<sup>low</sup>-Expression der Fall zu sein scheint. Unsere Befunde zeigen vielleicht einen Vorteil der BDCA-Antigene gegenüber der CD11c/CD123-Kombination im Spezialfall des Nabelschnurbluts auf.

### 4.3 Charakteristika der Studienpopulation

#### 4.3.1 Neugeborenenparameter

Die in Tab. 13 zusammengefassten Daten der Neugeborenen zeigten keine überraschenden Befunde. Es war eine tendenzielle Verringerung von Schwangerschaftsdauer und Geburtsgewicht in den belasteten Patientengruppen zu beobachten, etablierte kindliche Sequelae der PAM (Okoko *et al.* 2003; Brabin *et al.* 2004). Das Fehlen signifikanter Gruppenunterschiede kann mit dem geringen Studienumfang erklärt werden.

### 4.4 DC im Nabelschnurblut

#### 4.4.1 Werte in der Gesamtpopulation

BDCA-2<sup>+</sup> plasmazytoide DC dominieren im Nabelschnurblut afrikanischer Neugeborener über BDCA-1<sup>+</sup> myeloide DC und mit steigendem maternalen Alter nimmt die CBDC-Konzentration ab.

Mit einem mittleren mDC:pDC-Ratio von 0.69 (95% KI: 0.58–0.82) zeigten die BDCA-2<sup>+</sup> pDC ein höheres Vorkommen im Nabelschnurblut als die BDCA-1<sup>+</sup> mDC (Tab. 14). Dabei lagen die mittleren Absolutkonzentrationen in unserer Studie am unteren Rand der Literaturangaben (Tab. 3). Des Weiteren nahm die Konzentration der CBDC insgesamt mit steigendem Alter der Mutter ab.

Die große Spannweite sowohl der Absolutkonzentrationen als auch des mDC:pDC-Ratios mahnt zur Zurückhaltung bei der Beurteilung der Ergebnisse.

Schwierigkeiten einer Einordnung unserer Ergebnisse in den Kontext früherer Publikationen sind durch fehlende Standardisierung begründet (Tab. 3). Es werden unterschiedliche DC-Marker und *lineage*-Cocktails, Vollblut- oder PBMC-Protokolle und diverse Anreicherungs-/Aufreinigungsverfahren angewandt.

Nach wie vor ist man sich bezüglich der Verteilung der DC-Subtypen im CB uneins. Teilweise können die widersprüchlichen Befunde durch Unterschiede in den Versuchsprotokollen verstanden werden. So wurde der durch die Studie von Sorg *et al.* (1999) begründete anfängliche Irrtum, CBDC wären ganz vom plasmazytoiden Typ, mittlerweile mit dem selektiven Ausscheiden des Hauptteils der mDC im Rahmen der angewandten Anreicherungsprozedur erklärt (Ueda *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden die von der Firma Miltenyi Biotec propagierten BDCA-1 und BDCA-2-Antigene (Miltenyi Biotec 2005; Dzionek *et al.* 2000) zur Identifizierung der mDC und pDC eingesetzt. In zwei der neueren Enumerationsstudien zu CBDC kamen die gleichen DC-Marker wie in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung (Schibler *et al.* 2002; Darmochwal-Kolarz *et al.* 2004). In beiden Studien wurde eine ausgeprägte mDC-Dominanz gefunden.

Es gibt zwei prinzipielle Möglichkeiten, die in unserer Studie festgestellte plasmazytoide Auslenkung der CBDC im Vergleich insbesondere zu den Ergebnissen von Schibler *et al.* (2002) und Darmochwal-Kolarz *et al.* (2004) zu erklären, 1.) Eigenheiten des Protokolls, 2.) Eigenheiten der Studienpopulation.

Es zeichnet sich mittlerweile ab, dass die DC im peripheren Blut aus mehr als zwei wichtigen Populationen bestehen. So charakterisierten MacDonald *et al.* (2002) fünf *lineage*<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> Zellpopulationen, von denen sich drei (CD16<sup>+</sup>, CD1b/c<sup>+</sup>, BDCA-3<sup>+</sup>) durch Expression des Markers CD11c als myeloischen Ursprungs klassifizieren ließen. Die CD11c<sup>-</sup> DC waren wiederum in CD34<sup>+</sup> Zellen und CD123<sup>++</sup> pDC unterteilbar. Nach Angaben dieser Forscher ist ein bedeutender Teil der CD11c<sup>+</sup> mDC negativ für den Marker BDCA-1 und positiv für CD16. Diese in CB offenbar vermindert auftretende Population (Crespo *et al.* 2004; Drohan *et al.* 2004) wurde in der vorliegenden Studie mit dem anti-CD16-haltigen *lineage*-Cocktail ausgeschlossen.

Mit anti-CD11c/BDCA-1-Antikörpern isolierte CBDC-Populationen, die eigentlich als mDC angesehen werden müssen, zeigten bei Schibler *et al.* (2002) nur zu  $35\pm 14\%$  CD11c-Positivität, während die entsprechend mit anti-BDCA-2-Antikörpern gewonnenen Zellen zu immerhin  $73\pm 9\%$  CD123-positiv waren. Es ist gut möglich, dass diese Befunde auf die Schwierigkeiten der immuno-magnetischen Zellaufreinigung zurückzuführen sind. Insbesondere sollen nach Dzionek *et al.* (2000) BDCA-1<sup>+</sup> DC generell CD11c<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> sein, BDCA-2<sup>+</sup> DC allgemein CD123<sup>++</sup>. Allerdings könnten die Beobachtungen auch Besonderheiten des Nabelschnurblutes reflektieren.

Versucht man, die CD11c/CD123- und BDCA-1/BDCA-2-Protokolle hinsichtlich der mDC in Übereinstimmung zu bringen, so stellt man fest, dass mit BDCA-1 die Zahl CD11c<sup>+</sup> DC zunächst unterschätzt wird, da von diesen „klassischen“ myeloiden DC offenbar nur 20–50% CD11c/BDCA-1 exprimieren (MacDonald *et al.* 2002). Der überwiegende Teil der BDCA-1<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> DC exprimiert jedoch CD16 und wurde daher in den meisten Studien (gewollt oder ungewollt) mit dem *lineage*-Cocktail ausgeschlossen. Dies sollte die Werte in den zugehörigen Veröffentlichungen wieder mit dem BDCA-1-Protokoll der vorliegenden Arbeit vergleichbar machen.

Die Situation bei den lymphoplasmazytoiden Zellen ist etwas unklar, da verschiedentlich CD11c<sup>-</sup>/CD123<sup>low/dim</sup> Zellpopulationen als unreife DC gedeutet worden sind (Hagendorens *et al.* 2003; Drohan *et al.* 2004). Gerade im Nabelschnurblut machen diese Zellen scheinbar einen Großteil der DC aus (~40%) und offensichtlich exprimieren sie schwach den pDC-Marker BDCA-4 (Hagendorens *et al.* 2003). Hagendorens *et al.* (2003) betrachteten von vornherein nur die HLA-DR<sup>+</sup> *lineage*<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> Fraktion, doch in der Studie von Drohan *et al.* (2004) exprimierte die Mehrheit dieser im Nabelschnurblut prominenten Zellpopulation den Stammzell-Marker CD34. Dagegen konnten wir in unserer Arbeit wie auch Ueda *et al.* (2003) keine bedeutende CD34<sup>+</sup> Zellpopulation mit DC-ähnlichem Phänotyp identifizieren. Da bislang offenbar keine die erwähnten Zellen betreffenden Daten für eine eventuelle BDCA-2-Coexpression veröffentlicht worden sind, kann man noch nicht mit abschließender Sicherheit sagen, ob die Anwendung dieses Markers die Zahl der CD123<sup>+</sup> pDC in Übereinstimmung mit CD11c/CD123-Protokollen feststellt oder aber möglicherweise aufgrund des Einschusses unreifer Zellpopulationen überschätzt, die in den konventionellen CD11c/CD123-Protokollen als CD11<sup>-</sup>/CD123<sup>low/-</sup> abgegrenzt werden können.

Es bleibt bezüglich der unterschiedlichen FACS-Protokolle somit die Feststellung, dass unseren Ergebnissen einer moderaten pDC-Dominanz ähnliche Daten für CBDC mehrfach veröffentlicht wurden, jedoch die zwei CBDC-Studien, die mit den gleichen DC-Markern arbeiteten, ein deutliches mDC-Übergewicht zeigten. Die Wertigkeit der präsentierten Ergebnisse sollte, auch aufgrund der großen Spannweite der Messwerte, durch weitere Studien bestätigt werden, die zusätzlich eine detaillierte Charakterisierung der CBDC-Phänotypen hinsichtlich BDCA-1, BDCA-2, CD11c, CD123 und CD34 beinhalten sollten.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden unseres Wissens erstmals die DC-Subpopulationen im Nabelschnurblut in einer afrikanischen Population bestimmt. Eine plasmazytoide Auslenkung könnte auf immunologische Besonderheiten der Studienteilnehmer in der Region zurückzuführen sein. Die epidemiologische Situation im Studiengebiet unterscheidet sich von denen in bisherigen Veröffentlichungen insbesondere durch einen hohen Prävalenz parasitärer Infektionen, neben Pf vor allem gastrointestinaler Helminthiasen (Adegnika *et al.*, in Vorbereitung). Es ist mittlerweile allgemein etabliert, dass chronische Helmintheninfektionen im Rahmen einer ausgeprägten Immunmodulation zu einem Th2-Bias des Wirtsimmunsystems führen (Maizels *et al.* 2004). Dabei spielt nicht nur auf T-Zell-Ebene ein Übergewicht von Th2-Zellen eine Rolle, sondern auch auf DC-Ebene die Th2-induzierenden DC2.

Eine verstärkte plasmazytoide Auslenkung der maternalen DC-Subtypenverteilung stünde aufgrund der prominenten Rolle der pDC in der Th2-Initiierung mit diesen Phänomenen in Einklang. Die Übertragung derartiger Veränderungen auf die neonatalen DC wäre aufgrund von Studien, die eine pränatale Sensibilisierung durch Helminthenantigene zeigten (Malhotra *et al.* 1999), denkbar.

Man kann weiter spekulieren, dass die in unserer Studienpopulation beobachtete Abnahme der CBDC-Zahlen mit steigendem Alter der Mutter auf eine länger dauernde Immunregulation des maternalen Kompartiments im Rahmen wiederholter und/oder chronischer Helmintheninfektionen zurückzuführen ist.

Ein Schlüsselvorgang bei der Immunoregulation durch chronische Helminthiasen scheint die Erhöhung von IL-10 zu sein, die mit ausgeprägten Veränderungen des Wirtsorganismus in Verbindung gebracht wird (Yazdanbakhsh *et al.* 2002). Interes-

santerweise wurde vor kurzem beschrieben, dass IL-10 die Entstehung von BDCA-3<sup>+</sup> DC induziert, die in ihrer stimulatorischen Kapazität eingeschränkt sind (Velten *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden diese BDCA-3<sup>+</sup> Zellen aufgrund der von Velten *et al.* (2004) beschriebenen CD14-Expression mit dem *lineage*-Cocktail ausgeschlossen. Es konnten in der Literatur keine Angaben hinsichtlich der Populationsdynamik der verschiedenen DC-Subtypen in diesem Zusammenhang gefunden werden. Es wäre jedoch durchaus denkbar, dass eine im Rahmen der Helmintheninfektion mit der IL-10-Erhöhung einhergehende Expansion von BDCA-3<sup>+</sup> DC zuungunsten der BDCA-1<sup>+</sup> mDC und BDCA-2<sup>+</sup> pDC abläuft.

Die Verbindung zu den Zellpopulationen im Nabelschnurblut wäre über eine parasitäre Beeinflussung des materno-fetalen Interface oder Plazentapassage von Zytokinen und anderen, evtl. parasitären Faktoren denkbar, da eine pränatale Sensibilisierung und nachhaltige Beeinflussung des kindlichen Immunsystems bei maternaler Helmintheninfektion, wie bereits angesprochen, möglich ist.

Detailliertere DC-Studien im Bereich der Helminthologie wären also zweifelsohne wünschenswert, da die Rolle dieser Zellen in der Regulation peripherer Immuntoleranz erst nach und nach erkannt wird (Steinman 2003). Das ursprüngliche Konzept, nach dem iDC bei Antigenaufnahme im Gegensatz zu reiferen DC Immuntoleranz induzieren, wurde mittlerweile zu einem das *danger*-Konzept inkorporierenden Modell abgeändert (Shortman und Liu 2002). Fehlen von Signalen wie bestimmten Zytokinen oder Mustererkennung über PRR führt zur Ausdifferenzierung einer regulatorischen DC (rDC) aus einer Zelle, die sich ansonsten in eine DC1 oder DC2 entwickelt hätte. Schwache Antigenpräsentation auf nicht voll aktivierten DC kann des Weiteren nicht nur den Zelltod Antigen-spezifischer T-Zellen herbeiführen, sondern auch T-Zell-Anergie bewirken (Lipscomb und Masten 2002). Anergische T-Zellen können in der Folge durch Wechselwirkung mit DC Immunantworten supprimieren. Es gibt auch Hinweise, dass teilaktivierte DC zur Expansion regulatorischer T-Zellen (T<sub>reg</sub>) beitragen, wobei die Relevanz *in vivo* beim Menschen noch unklar ist (Steinman 2003). T<sub>reg</sub> können die Funktion anderer CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Effektorzellen supprimieren.

Hinsichtlich der HLA-DR<sup>+</sup> und gesamten pDC war der Effekt des maternalen Alters in den ANOVA nicht von dem durch die Anzahl vorheriger Schwangerschaften zu

trennen. Der Einfluss des Alters auf DC-Größen erschien konsistenter, da er auch in den mDC signifikant war. Auch wurde offenbar in europäischen Populationen eine Abnahme der CBDC mit steigendem maternalen Alter gefunden (Luty AJ, persönliche Mitteilung). Eine differenzierte Beeinflussung der DC-Subpopulationen durch wiederholte Schwangerschaften, Alter und/oder chronische Parasitosen erscheint aufgrund der gegenwärtigen Kenntnisse durchaus möglich.

Die differenzierte Beeinflussung des Immunsystems an der materno-fetalen Schnittstelle sowohl im Laufe einer PAM als auch bei Helminthenbelastung, die aufgrund ähnlicher geographischer Verbreitungen häufig miteinander einhergehen, könnte die Koexistenz dieser Krankheiten in einem Individuum zu einer Modellentität bei der Untersuchung der komplexen und nur unvollständig verstandenen Funktionen und Beeinträchtigungen verschiedener Typen von DC machen. Dies gilt über die Th1:Th2-Regulation hinaus für die Biologie von rDC und T<sub>reg</sub>. Da in den betroffenen Populationen zusätzlich generell eine hohe Reproduktionsrate besteht, muss hierbei auch ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss von (wiederholten) Schwangerschaften auf die immunologischen Parameter inkl. DC-Zahlen gerichtet werden. Zur verlässlichen Untersuchung sind logistisch sehr viel aufwändigere Studien nötig als im Rahmen dieser Dissertation realisierbar war, mit ausführlicheren parasitologischen und immunologischen Protokollen und höheren Patientenzahlen. Die parallele Analyse maternaler DC (mit nahezu Verdopplung des Ressourcenaufwandes) wäre eine hochinteressante Protokollerweiterung.

#### 4.4.2 Veränderungen der DC-Subtypenzahlen mit dem Malariastatus

BDCA-1<sup>+</sup> mDC sind im Nabelschnurblut von Neugeborenen, deren Mutter eine Malaria-Belastung hat, vermehrt.

Im Nabelschnurblut von Neugeborenen, deren Mutter zum Zeitpunkt der Geburt gegen Malaria behandelt wurde oder parasitologische Zeichen einer *Plasmodium falciparum*-Infektion zeigte, waren die BDCA-1<sup>+</sup> myeloiden dendritischen Zellen (mDC) signifikant vermehrt. Dieser Zusammenhang war noch deutlicher, wenn nur die funktionell vermutlich bedeutenderen HLA-DR<sup>+</sup> DC ausgewertet wurden. Der Einschluss des maternalen Alters als explanatorische Variable führte zu weiter erniedrigten *p*-Werten.

Ein extremer Ausreißer bei den Werten der BDCA-2<sup>+</sup> pDC lag in der „akuten“ Gruppe 3 vor (>80.000 pDC /ml). Die Mutter war in diesem Fall am Tag der abendlichen Niederkunft morgens aufgrund eines positiven DT hospitalisiert und eine Quinine-Therapie begonnen worden. Die bei Studienaufnahme durchgeführten DT aller drei Kompartimente waren negativ. Kontrolle der FACS-Daten zeigte keine Auffälligkeiten, sodass der pDC-Wert als wahr angesehen werden muss. Dennoch wurden, um den Einfluss dieser Probe zu untersuchen, Analysen der mDC- und pDC-Werte unter Ausschluss dieses Mutter-Kind-Paares durchgeführt. Dabei verlor die *one-way ANOVA* von mDC und Malariagruppe gerade ihre statistische Signifikanz ( $p = 0.054$ ), der Kruskal-Wallis-Test zeigte aber weiterhin einen signifikanten Gruppenunterschied an, wobei das geometrische Mittel, nicht aber der Median in Gruppe 3 knapp über den entsprechenden Werten in Gruppe 2 lag. Der mDC-Wert stellte allerdings keinen extremen Ausreißer dar, sodass die Gültigkeit der Tests unter Einschluss dieser Daten gegeben erscheint. Da die pDC-Zahlen in Gruppe 3 ohnehin nicht signifikant erhöht waren, besteht auch hier kein Anlass, das diskutierte Mutter-Kind-Paar auszuschließen oder das Testergebnis in Frage zu stellen.

Beeinträchtigungen der DC bzw. zahlenmäßige Veränderungen der Gesamtpopulation oder der Verteilung von Subtypen sind von einer Reihe pathologischer Zustände bekannt, unter anderem viraler Hepatitis (Tsubouchi *et al.* 2004) und verschiedenen Krebsarten (Almand *et al.* 2000; Wojas *et al.* 2004). Beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) sollen verminderte pDC-Zahlen im peripheren Blut eine vermehrte Rekrutierung in die SLE-Läsionen widerspiegeln (Blomberg *et al.* 2003; Pascual *et al.* 2003). Mehrere Studien haben sich mit DC und den Th2-dominierten allergischen Erkrankungen befasst. Ähnlich wie bei SLE wurde eine reduzierte Zahl von pDC im peripheren Blut allergischer Kinder als Konsequenz aus einer Anreicherung aktivierter pDC im peripheren Gewebe gedeutet (Hagendorens *et al.* 2003). Außerdem scheint bei solchen Kindern der Anteil der den Th1-Induktor IL-12 produzierenden mDC im peripheren Blut vermindert zu sein (Hagendorens *et al.* 2004).

Auch im Falle der Malaria sind die pDC im peripherem Blut des Patienten erniedrigt bei gleichzeitiger INF- $\alpha$ -Erhöhung. Dies wurde ebenfalls als Hinweis auf aktivierungsbedingte Migration ins Gewebe interpretiert (Pichyangkul *et al.* 2004). Die Ergebnisse

von Urban *et al.* (2001a; 2005) wiesen allerdings auf funktionelle Beeinträchtigungen der DC im Rahmen akuter bzw. fataler Malariaerkrankung hin (s. u.).

Die mit der Schwangerschaft assoziierte Malaria scheint aufgrund der pathophysiologisch charakteristischen Zytokinveränderungen mit dem schwangerschaftsförderlichen Th2-Milieu zu interferieren (Brabin *et al.* 2004). Hinweise auf eine Verschiebung der Zytokine in Pf-infizierten Plazenten in Richtung Th1-Muster wurden mehrfach beschrieben. So fanden beispielsweise Fievet *et al.* (2001) bei einer in Kamerun durchgeführten Studie in den Plazenten malariainfizierter Frauen ein signifikant erhöhtes TNF- $\alpha$  (im Serum) und INF- $\gamma$  (im Blut). Auch in anderen Populationen wurden signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Plazenten Malaria-infizierter Frauen gefunden (Fried *et al.* 1998), während im Nabelschnurblut keine entsprechenden Beziehungen vorzuliegen schienen (Rogerson *et al.* 2003).

Die untersuchten Th2-Zytokine waren in der Studie von Fievet *et al.* (2001) nicht mit dem Infektionsstatus korreliert, während IL-10 in einer anderen Arbeit als in infizierten Plazenten vermehrt auftretend beschrieben wurde (Suguitan *et al.* 2003b). Auch Jakobsen *et al.* (1998) beschrieben eine, allerdings nicht statistisch bedeutsame, Erhöhung von plazentalem IL-10 in parasitierten Organen. Während Fievet *et al.* (2001) dem bei Stimulation mit Plasmodien produzierten IL-10 im Rahmen der PAM eine protektive Rolle zuschreiben, revidierte bzw. relativierte die Forschungsgruppe um Suguitan ihre diesbezügliche Ansicht, nachdem sie Indizien für eine Rolle dieses Th2-Zytokins bei der Pathogenese Malaria-assoziiierter Frühgeburtlichkeit gefunden zu haben meinten (Suguitan *et al.* 2003a; 2003b).

Dem insgesamt recht klaren Bild einer plazentalen Th1-Auslenkung durch Plazenta-infektion stehen etwas kompliziertere Daten bezüglich des neonatalen Kompartiments gegenüber. Zwar beschrieben Suguitan *et al.* (2003b) eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion durch kindliche Zellen bei infizierter Plazenta, und Kirch *et al.* (2004) aus unserem Institut fanden zumindest keine veränderte Reaktivität neonataler Zellen in Abhängigkeit von der maternalen Pf-Seropositivität, doch konnte von Ismaili *et al.* (2003) bei Neugeborenen von Frauen mit Plazentainfektion ein recht eindeutiger Th2-Drift der neonatalen Immunantwort nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur einschlägig bekannten Th1-Auslenkung des materno-fetalen Interface fanden sie eine

Beeinträchtigung der Th1-Differenzierung neonataler Lymphozyten bei Pf-Plazenta-infektion. Diese Forscher halten eine exazerbierte Beeinträchtigung der IL-12-Produktion für eine reduzierte Funktionsfähigkeit neonataler APC und ein vermehrtes Th2-Priming von T-Zellen bei Stimulation mit Pf-Antigenen für verantwortlich. Malhotra *et al.* (2005) fanden in ihrer Studienpopulation verschiedene Th1/Th2-Muster, die sie mit unterschiedlichen Expositionsintensitäten in Verbindung brachten (s. u.).

In Zusammenarbeit mit Forschern aus unserem Institut wurden von Bouyou-Akotet *et al.* (2004) auch in Gabun verschiedene Zytokine im maternalen, plazentalen und neonatalen Kompartiment gemessen. Dabei wurde bei Malaria-infizierten Studienteilnehmerinnen plazental eine signifikante Verminderung des Zytokins IL-15 gefunden, das als NK- und  $\gamma\delta$ -T-Zell-Aktivator gilt, aber auch die Funktion von DC stimulieren soll. DC-produziertes IL-15 scheint essentiell für die Initiierung der CD8<sup>+</sup>-abhängigen Th1-Abwehr zu sein (Ruckert *et al.* 2003). Ebenfalls zum Th2-Shift passend, wurde in unserem Labor vor kurzem von Brustoski *et al.* (2005b) eine Expansion neonataler IL-10-produzierender Zellen mit Spezifität für Pf bei Plazenta-infektion gezeigt. Diese IL-10-Erhöhung trug offenbar zu der in dieser Studie festgestellten Einschränkung der APC-Funktion (verminderte MHC-Expression) und der parasitenspezifischen Th1-Antworten (verminderte INF- $\gamma$ -Produktion) bei. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte eine Expansion parasitenspezifischer regulatorischer T-Zellen im Nabelschnurblut von Neugeborenen, deren Mutter plazental infiziert war (Brustoski *et al.*, in Vorbereitung). Die Entfernung dieser Zellen normalisierte die IL-10-Reaktion auf Parasiten-Antigene, was auf eine entscheidende Rolle dieses Zelltyps in der Pf-Immunregulation hinweist. Die CBDC wurden in diesen Arbeiten nicht untersucht. Wie bereits erwähnt wurde, können DC aber die Ausdifferenzierung von T<sub>reg</sub>-Zellen induzieren.

Die mDC wurden traditionell mit dem Priming einer Th1-Antwort in Verbindung gebracht, auch wenn diese Sicht mittlerweile relativiert wurde (Maldonado-Lopez und Moser 2001). Allerdings wurden wiederholt Beeinträchtigungen der funktionellen Eigenschaften von CBDC *per se* beschrieben (Sorg *et al.* 1999; Upham *et al.* 2002; Crespo *et al.* 2004). Aus Nabelschnurblut-Monozyten gewonnene DC scheinen in der Produktionskapazität für IL-12, welches als Signal 3 im Modell nach Lipscomb und Masten (2002) die Differenzierung von Th1-Zellen induziert, eingeschränkt zu sein und weisen daher eine verminderte Th1-Polarisierungskapazität auf (Langrish *et al.* 2002;

Goriely *et al.* 2001). Die Produktionskapazität für TNF- $\alpha$  und bemerkenswerterweise IL-10 scheint dagegen nicht beeinträchtigt zu sein (Langrish *et al.* 2002).

Insgesamt scheint daher die funktionelle Bedeutung erhöhter Frequenzen von BDCA-1<sup>+</sup> mDC bei Neugeborenen von Frauen mit Malaria-Belastung hinsichtlich einer Beeinflussung des Th1/Th2-Äquilibrium nicht sicher beurteilbar zu sein. Die erhöhte Zellzahl kann möglicherweise die eingeschränkte Funktion nicht einmal kompensieren und die neonatale Immunantwort durch eine Plazentainfektion ist offenbar nicht in Th1-, sondern in Th2-Richtung ausgelenkt, was mit der klassischen Annahme einer verstärkten Th1-Auslenkung durch vermehrte mDC nicht in Einklang steht.

Eine nachhaltige und klinisch bedeutsame Th2-Auslenkung des kindlichen Immunsystems, das aufgrund verschiedener Besonderheiten schon im physiologischen Normalfall Th2-betont reagiert (Delespesse *et al.* 1998; Marodi 2002), ist auch von maternalen Helmintheninfektionen bekannt. Beim Nachwuchs *Wuchereria*-infizierter Frauen zeigte sich eine deutliche Th2-Auslenkung und die klinische Relevanz dieses Befundes wird durch die erhöhte Suszeptibilität dieser Kinder gegenüber dem Parasiten unterstrichen (Malhotra *et al.* 2003). Dieselben Forscher konnten zeigen, dass eine *Wuchereria*-Infektion der Mutter die Th1-vermittelte Reaktion gegen den Tuberkulose-Impfstoff BCG, also ein nicht-*Wuchereria*-Antigen, beim Kind über mehrere Jahre hin beeinträchtigt (Malhotra *et al.* 1999).

Im Rahmen der Auseinandersetzung des Wirtes mit den Malariaparasiten ist dagegen zunächst eine Th1-Antwort von Bedeutung, die erst im weiteren Verlauf zugunsten einer Th2-Betonung gedämpft zu werden scheint (Omer *et al.* 2000). Ein dem Th1-Muster im Pf-infizierten Plazentakompartiment gegenläufiges Th1-Defizit im Neugeborenenblut könnte möglicherweise durch selektive Plazentadurchgängigkeit entsprechender Th2-Zytokine bedingt sein. Eine vielleicht wahrscheinlichere Erklärung könnte in der Plazentapassage von iRBC oder Parasitenkomponenten liegen, die auf aktivierbare, aber entwicklungsbedingt Th1-defiziente DC treffen. Während frühkindliche Malaria sehr selten ist, sind pränatale Sensibilisierungen gegen Pf-Antigene häufig nachzuweisen (s. u.). Die Aktivierung der neonatalen DC würde dann vorzugsweise zu einem Th2-Muster führen (Langrish *et al.* 2002).

Auch eine Rolle für am materno-fetalen Interface nachweisbares Hämozoïn (HZ) wäre hierbei denkbar (Brabin *et al.* 2004). Seit einiger Zeit ist bekannt, dass dieses Malariapigment, ein Stoffwechselprodukt der intraerythrozytären Parasiten, humane DC stimulieren kann (Coban *et al.* 2002). Vor kurzem wurde die Aktivierung von murinen mDC und pDC durch HZ als TLR-9-abhängig erkannt (Coban *et al.* 2005). Komplizierend sind die Befunde von Skorokohd *et al.* (2004). Diese Gruppe beschrieb eine reifungsinhibierende Wirkung von HZ auf DC und kam zu dem Schluss, dass in den anderen Studien vermutlich durch die Hochreinigung des HZ mit diesem assoziierte Protein- oder Lipidkomponenten verloren gegangen waren, die maßgeblich für die beobachtete DC-Hemmung verantwortlich sein könnten. Perry *et al.* (2005) stellten die Hypothese auf, dass eine wiederholte TLR-9-Stimulation durch HZ dafür verantwortlich sei, dass im späteren Verlauf muriner Malaria IL-10-produzierende DC ein vorzugsweise anti-inflammatorisches (IL-10-betontes) Zytokinmuster hervorrufen, während anfänglich IL-12-produzierende DC eine INF- $\gamma$ -Antwort (Th1) induzieren.

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang sind auch Berichte von Pichyangkul *et al.* (2004), die eine TLR-9-abhängige pDC-Aktivierung durch Schizontenextrakt zeigen. Die exakte Identität der hierbei entscheidenden Moleküle scheint noch bestimmt werden zu müssen, aber es scheint keinen offensichtlichen Grund für die Annahme zu geben, dass er nicht plazentagängig sein sollte.

Ein weiterer Kandidat für die pränatale Aktivierung von und Interaktion mit kindlichen DC ist das Malariatoxin. GPI verschiedener Protozoa waren bereits seit einiger Zeit als TLR-2-Agonisten bekannt (Gazzinelli *et al.* 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch Pf-GPI über TLR-2 und TLR-4 Immunzellen aktivieren kann (Krishnegowda *et al.* 2005). Malhotra *et al.* (2005) schlugen vor, dass ein bei etwa einem Drittel der Neugeborenen in ihrer Studie beobachtetes Th1-Zytokinmuster mit stärkerer maternaler Parasitenlast, damit verbundener, erhöhter Wahrscheinlichkeit von iRBC-Plazentapassage und letztlich pränataler GPI-Exposition zusammenhängt.

Interessanterweise konnte für verschiedene TLR-Kombinationen (inkl. TLR-2:TLR-4 und TLR-9:TLR-4) die Induktion einer gewissen Kreuztoleranz gezeigt werden (Reff. in Perry *et al.* 2005). Eine solche könnte eine Verbindung herstellen zwischen längerfristiger Exposition der Leibesfrucht gegenüber niedrigen Dosen von HZ

und/oder GPI und allgemein herunterregulierter TLR-abhängiger Aktivierung der CBDC auf unterschiedlichste Antigenreize hin, die wiederum die Befunde von durch IL-10 und T<sub>reg</sub> charakterisierten, Th2-betonen Immunreaktionen in Experimenten mit betroffenen Neugeborenen erklären würde.

Es gibt also verschiedenste parasitäre Antigene, die ein gewisses Potential für den Kontakt mit neonatalen Immunzellen haben und in einigen Fällen für besondere Interaktionen mit DC bekannt sind. Eine Aktivierung der CBDC durch solche Ag könnte aufgrund der bereits diskutierten Th1-Defizite dieser Zellen zur unausgewogenen Sekretion des Th2-Induktors IL-10 führen, die durch autokrine Wirkung (Corinti *et al.* 2001) mit für die verstärkte Th2-Auslenkung der später von ihnen stimulierten Immunreaktionen verantwortlich sein könnte. Die Th2-Betonung könnte sich so nach der Initiierung durch die PAM selbst erhalten. Als klinisches Korrelat würde die erhöhte Pf-Suszeptibilität betroffener Kinder während der ersten Lebensjahre ins Bild passen (Le Hesran *et al.* 1997). Dieses Modell stünde auch im Einklang mit der zunächst paradoxen Beobachtung, dass sowohl maternale Th1- als auch Th2-Phänomene (plazentale Malariainfektion bzw. mütterliche Helmintheninfektion während der Schwangerschaft) gleichermaßen zu einem Th2-Bias beim Neugeborenen führen.

Einen Widerspruch scheinen die beschriebenen Ergebnisse (signifikant erhöhte mDC, tendenziell erhöhte pDC bei Pf-Exposition) zu Berichten von Pichyangkul *et al.* (2004) darzustellen. Diese Forscher fanden deutlich erniedrigte pDC-Zahlen im peripheren Blut akut malariakrankter Erwachsener. Dies ging mit erhöhtem INF- $\alpha$  einher, und die Produktion dieses Zytokins durch pDC konnte durch Schizonten, Schizontenlysat und die lösliche Fraktion desselben ausgelöst werden. Gleichzeitig wurde durch Schizonten das Chemokinrezeptorprofil der pDC verändert, was in Einklang mit der Theorie steht, dass die pDC aufgrund einer Pf-bedingten Aktivierung ins lymphatische Gewebe abwandern und daher peripher vermindert sind. Unsere Ergebnisse sprechen gegen ausgeprägte derartige Vorgänge im neonatalen Kompartiment im Rahmen der PAM. Dies könnte an einem andersartigen, selektiveren Expositionsmuster liegen (aufgrund des „Filters“ Plazenta) oder an Eigenheiten der CBDC. Die Chemokinrezeptorregulation auf CBDC an sich zeigt offenbar gewisse Auffälligkeiten (Langrish *et al.* 2002). Möglicherweise spielen hier mehrere Faktoren, sowohl intrinsischer (DC-Unreife) als auch extrinsischer Natur (Pf-Antigene), zusammen.

Diese Diskrepanzen unterstreichen nochmals den Bedarf an weiteren Untersuchungen zu Pf und CBDC. Während die noch ausstehenden Ergebnisse der im Rahmen der Mutterstudie durchgeführten Stimulationsexperimente möglicherweise einigen Aufschluss hinsichtlich der funktionellen Bedeutung der präsentierten Daten geben werden, sollten weiterführende Experimente die Zytokinproduktion auf Einzelzellniveau bestimmen, um der zunehmend offenkundig werdenden funktionellen Komplexität und auch Plastizität der DC gerecht zu werden. Neben dem Einschluss der BDCA-3<sup>+</sup> DC-Subpopulation ins Studienprotokoll, wären aufgrund der Daten von Pichyangkul *et al.* (2004) Bestimmungen des INF- $\alpha$ -Phänotyps der CBDC in unserer Population von besonderem Interesse sowie möglicherweise Untersuchungen zu den erwähnten Chemokinrezeptoren. So beschreibt die Gruppe um Pichyangkul in oben zitierter Publikation die Induktion der Chemokinrezeptorexpression durch Schizonten, erwähnt in diesem Zusammenhang aber offenbar keine Lysatpräparationen. Dies eröffnet die Möglichkeit einer DC-Teilaktivierung durch plazentagängige lösliche Antigene bei fehlender Migration, falls zur Chemokinrezeptorinduktion diese löslichen Antigene nicht ausreichen und intakte Schizonten notwendig sind.

Unsere Studie kann somit nur einen allerersten Schritt zu einer deutlich differenzierteren Untersuchung der phänotypischen Veränderungen und funktionellen Rolle der CBDC im Zusammenhang mit maternaler Malaria darstellen. Auch muss den in unserem Labor gefundenen Auswirkungen maternaler Pf-Infektion auf andere Zellpopulationen (Engelmann *et al.* 2005; Brustoski *et al.*, in Vorbereitung) Rechnung getragen werden, indem die betreffenden Zelltypen gemeinsam mit den DC untersucht werden, um ihre Interaktionen im Zusammenhang mit der kindlichen Immunmodulation durch Pf zu klären. Möglicherweise sind es die durch niedriggradigen Antigenkontakt teilaktivierten DC, die für die Induktion von T<sub>reg</sub> und die Th2-Auslenkung im neonatalen Kompartiment verantwortlich sind und damit gegebenenfalls einen Großteil der immunologischen Konsequenzen schwangerschaftsassoziierter Malaria auf Kindesebene bedingen.

#### 4.4.3 Veränderungen der HLA-DR-Expression auf CBDC in Relation zum maternalen Malariastatus

Die HLA-DR-Expression auf CBDC bleibt von maternalen Pf-Infektionen unbeeinflusst.

In der vorliegenden Studie wurde keine statistisch signifikante Beeinträchtigung der HLA-DR-Oberflächenexpression der CBDC von Kindern *Plasmodium falciparum*-infizierter Mütter gefunden. Eine solche hätte auf eine reduzierte funktionelle Kapazität im Sinne verminderter Antigen-Präsentation hingedeutet.

Die Beobachtung einer deutlich höheren HLA-DR-Expression auf mDC als auf pDC stimmt mit der phänotypischen Charakterisierung in der Literatur überein (Robinson *et al.* 1999; Dzionek *et al.* 2000).

Eine Erniedrigung des HLA-DR auf dendritischen Zellen wurde in den Milzen von an Malaria verstorbenen Patienten gefunden (Urban *et al.* 2005). Des Weiteren wurde im Rahmen akuter Malariainfektionen bei Kindern eine Abnahme des prozentualen Anteils auf der Zelloberfläche HLA-DR exprimierender DC nachgewiesen (Urban *et al.* 2001a). Diese Studie wurde durchgeführt, um *in vitro*-Ergebnisse zu bestätigen, nach denen Pf-iRBC die Reifung von DC durch direkten Zell-Zell-Kontakt stören (Urban *et al.* 1999). Die funktionelle Relevanz dieser Wirkungen auf die aus monozytären Vorstufen gewonnenen DC spiegelte sich hierbei in ihrer verminderten phänotypischen Reifung auf nachfolgende Antigenreize wider (verminderte Expression von costimulatorischen Molekülen) sowie in reduzierter Potenz in Lymphozytenproliferationsexperimenten.

Die Interaktionen der iRBC mit den DC scheinen CD36-vermittelten Vorgängen zu entsprechen, die zur Toleranzinduktion durch apoptotische Zellen führen (Urban *et al.* 2001b). Von iRBC-Modulation betroffene DC sezernierten nach Stimulation vermehrt das Th2-Zytokin IL-10 und vermindert den Th1-Promotor IL-12. IL-10 soll seinerseits mit dem regelrechten HLA-DR-Umsatz interferieren können und scheint die Oberflächenexpression dieses für die normale Antigenpräsentation essentiellen Moleküls herunterzuregulieren (Koppelman *et al.* 1997). Zu einer funktionellen Bedeutung dieses Zusammenhanges würden auch Ergebnisse aus unserem Labor passen, die zeigen, dass IL-10 bei Kindern mit schwerer Malaria in erhöhter Konzentration im Serum vorliegt (Luty *et al.* 2000).

Während aber unklar ist, ob eventuell aufgrund einer Plasmodien-Infektion und mglw. damit einhergehender DC-Modulation durch iRBC vermehrt von der Schwangeren produziertes IL-10 überhaupt fetale DC erreicht und somit eine Beeinträchtigung ihrer HLA-DR-Expression wie in den oben erwähnten Studien herbeiführen könnte, kommt ein gewisser Teil der Neugeborenen wegen des Auftretens von iRBC im CB nachweislich unmittelbar mit Parasiten in Kontakt. Zwar sind Nabelschnurblutproben selten mikroskopisch *Plasmodium*-positiv, doch wiesen Kassberger *et al.* (2002) in Lambaréné bei 46% der Neugeborenen plazental infizierter Mütter Pf mit der sensitiveren PCR-Methode nach. Ähnliche Befunde veröffentlichten beispielsweise Tobian *et al.* (2000) für eine Studienpopulation in Kenia. Diese Ergebnisse könnten auf sehr niedrige Parasitendichten unterhalb der mikroskopischen Nachweisgrenze zurückzuführen sein oder aber auf der Plazentapassage von parasitären Makromolekülen beruhen (Kassberger *et al.* 2002).

Parasitäre Proteine können relativ häufig in Nabelschnurblut nachgewiesen werden, wie das Beispiel des Glutamin-reichen Proteins (GLURP) aus einer in Gambia durchgeführten Studie (Jakobsen *et al.* 1998) zeigt. Mehrfach wurde Pf-spezifische Antikörperbildung durch das Neugeborene gefunden (Achidi *et al.* 1995; Xi *et al.* 2003). Eine aktuelle Studie von Malhotra *et al.* (2005) untersuchte Antikörper im Nabelschnurblut gegen diverse Pf-Antigene und fand solche in bis zu 17% der Fälle. In 66% der Fälle war in derselben Arbeit eine pränatale Sensibilisierung gegen wenigstens eines der Pf-Antigene nachweisbar, gemessen an der Zytokinantwort von Zellkulturen bei Pf-Antigen-Stimulation. Hinsichtlich unserer Studienregion berichteten Brustoski *et al.* (2005a) eine Prävalenz von 20% für IgM-Antikörper gegen eine bestimmte PfEMP1-Domäne bei Neugeborenen von PAM-Patientinnen.

In den Studien von Urban *et al.* (1999) waren lediglich intakte iRBC in der Lage, eine Beeinträchtigung der DC zu verursachen, nicht jedoch Parasitenlysat oder Pigment. Die in der vorliegenden Inauguraldissertation berichteten Ergebnisse scheinen hiermit kongruent zu sein. Vermutlich ist nur ein geringer Anteil der *in utero* Pf-exponierten Neugeborenen bedeutenden Zahlen von iRBC ausgesetzt. Wenn solche für eine veränderte HLA-DR-Expression notwendig sind, ist ein Nachweis dieses Zusammenhangs nur bei sehr grossen StudENUMfängen zu erwarten, da nur eine Untergruppe der Patientenkategorien 2 und 3 (maternale Malaria während der Schwangerschaft bzw. Pf-

Infektion bei Niederkunft) vom Auftreten intakter iRBC im neonatalen Kompartiment betroffen wäre.

Die für die beobachteten Veränderungen der DC-Zahlen verantwortlichen Faktoren, möglicherweise lösliche Pf-Antigene, Hämозoin oder GPI (s. o.), scheinen also im Gegensatz zu iRBC nicht zu einer reduzierten HLA-DR-Expression auf DC zu führen, die als Indikator für die APC-Kapazität dieser Zellen angesehen wird. Dies stellt einen bedeutenden Unterschied zur Situation bei malariakranken Patienten (Urban *et al.* 1999; Pichyangkul *et al.* 2004; Urban *et al.* 2005) dar, der zweifelsohne weiterer Untersuchungen bedarf. Diese sollten die funktionelle Charakterisierung der CBDC hinsichtlich ihrer Interaktion mit verschiedenen Pf-Antigenen und iRBC beinhalten, wobei aufgrund der niedrigen Absolutkonzentration dieser Zellen mit einigen methodologischen Schwierigkeiten gerechnet werden muss.

Erwähnenswert ist, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in einem gewissen Gegensatz zu früheren Untersuchungen unseres Labors stehen, in denen Mitarbeiter bei Neugeborenen plazentainfizierter Mütter eine Beeinträchtigung der MHC-I/II-Expression auf Monozyten festgestellt haben (Brustoski *et al.* 2005b). Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die ausschließliche Untersuchung der BDCA-1- bzw. BDCA-2-positiven DC in der hier vorliegenden Dissertationsarbeit zurückzuführen. Folgestudien mit dem direkten Vergleich der HLA-Expression auf Monozyten und DC im selben Individuum wären dennoch von Interesse.

#### **4.4.4 Weitere gefundene Assoziationen**

Der prozentuale Anteil HLA-DR<sup>+</sup> Zellen war im Falle der mDC invers mit der Schwangerschaftsdauer, im Falle der pDC invers mit der Anzahl vorheriger Schwangerschaften korreliert.

Die zwei erwähnten Assoziationen waren nicht primärer Untersuchungsgegenstand und traten eher unerwartet auf, obwohl die immunologischen Veränderungen während der Schwangerschaft durchaus auch gewisse Auswirkungen auf die maternalen DC haben sollen (Darmochwal-Kolarz *et al.* 2003a; 2003b; Ueda *et al.* 2003). Die seltenere HLA-DR-Expression auf den CBDC könnte auf transplazentale Fortleitung von Immunomodulationsphänomene zurückzuführen sein und auf dadurch verminderte CBDC-Aktivität hinweisen.

Da es sich bei diesem Teil der Arbeit um eine eher explorative Studie mit einem *multiple regression*-Problem handelt, sind falsch-positive Zufallsbefunde durchaus zu erwarten (Ioannidis 2005). Die in *post hoc*-Tests gefundenen Beziehungen sollten daher nicht überbewertet werden. Dennoch wäre es aufgrund der zentralen Rolle der DC in der Immunreaktion sicherlich sinnvoll, in reproduktionsimmunologischen Studien die HLA-DR-Expression auf DC detaillierter zu untersuchen, um die hier präsentierten Ergebnisse zu validieren oder sicher verwerfen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die dendritischen Zellen (DC) werden aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Initiierung und Steuerung der angeborenen und erworbenen Immunreaktionen als wichtigste Antigen-präsentierende Zellen angesehen. Obwohl gewisse Beeinträchtigungen der DC durch *Plasmodium falciparum* (Pf) bekannt sind und die von diesem Erreger verursachte Malaria die wohl wichtigste Parasitose des Menschen ist, wurden erst wenige Untersuchungen hierzu veröffentlicht. Da vor allem kleine Kinder ein hohes Risiko für schwer verlaufende Malariaepisoden haben, besitzt das Verständnis des neonatalen Immunsystems und seine Beeinflussung durch Pf eine hohe Priorität. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher Basisdaten zu den Konzentrationen von DC-Subtypen im Nabelschnurblut (CB) in einer stark Pf-exponierten Population in Lambaréné, Gabun, gewonnen.

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS) wurden Enumerationen von myeloiden DC (mDC) und plasmazytoiden DC (pDC) durchgeführt. Zur Identifizierung wurden die Marker BDCA-1 und BDCA-2 herangezogen.

Die Ergebnisse von 41 CB-Proben konnten in die Analyse einbezogen werden. Bei einem mittleren mDC:pDC-Ratio von 2:3 lagen durchschnittlich 5000 mDC und 7000 pDC pro Milliliter vor. Bei pränatal Pf-exponierten Kindern waren die mDC signifikant vermehrt und mit steigendem maternalen Alter fielen die Konzentrationen der CBDC.

Die bei maternaler Pf-Belastung erhöhten DC-Zahlen passen zu Untersuchungen, die einen Th2-Shift von Immunreaktionen solcher Kinder zeigen. Zwar werden mDC vor allem mit der Initiierung von Th1-Antworten in Verbindung gebracht, doch sind im Falle von CBDC funktionelle Beeinträchtigungen beschrieben worden, deren Resultat die Kompromittierung von Th1- und eine Bevorzugung von Th2-Reaktionen ist. Es wurde keine Beeinträchtigung der für die DC-Funktion wichtigen HLA-DR-Expression wie im Falle von Malariapatienten gefunden. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die für die beobachteten Veränderungen beim Neugeborenen verantwortlichen Faktoren im Gegensatz zu iRBC die DC-Funktion nicht in dieser Art und Weise kompromittieren. Die Abnahme der Absolutkonzentrationen beider DC-Subpopulationen mit dem maternalen Alter könnte mit der chronischen Immunmodulation durch kontinuierliche Helmintheninfektionen zusammenhängen, bedarf jedoch näherer Untersuchungen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achidi, E. A., H. Perlmann, et al. (1995). "Antibodies to Pf155/RESA and circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in paired maternal-cord sera from Nigeria." *Parasite Immunol* **17**(10): 535-40.
- Adegnika, A. A., S. T. Agnandji, et al. (in Vorbereitung). "Increased susceptibility to intestinal helminth infestation during pregnancy in a Sub-Saharan African community."
- Almand, B., J. R. Resser, et al. (2000). "Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer." *Clin Cancer Res* **6**(5): 1755-66.
- Artavanis-Tsakonas, K., J. E. Tongren, et al. (2003). "The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology." *Clin Exp Immunol* **133**(2): 145-52.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Bland, J. M. und D. G. Altman (1996). "The use of transformation when comparing two means." *BMJ* **312**(7039): 1153.
- Blomberg, S., M. L. Eloranta, et al. (2003). "Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* **48**(9): 2524-32.
- Borras, F. E., N. C. Matthews, et al. (2001). "Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood." *Br J Haematol* **113**(4): 925-31.
- Borrmann, S., N. Szlezak, et al. (2002). "Evidence for the efficacy of artesunate in asymptomatic *Plasmodium malariae* infections." *J Antimicrob Chemother* **50**(5): 751-4.
- Bouyou-Akotet, M. K., M. Kombila, et al. (2004). "Cytokine profiles in peripheral, placental and cord blood in pregnant women from an area endemic for *Plasmodium falciparum*." *Eur Cytokine Netw* **15**(2): 120-5.
- Brabin, B. J., C. Romagosa, et al. (2004). "The sick placenta-the role of malaria." *Placenta* **25**(5): 359-78.
- Bretz, F., T. Hothorn, et al. "Multiple Comparison Procedures in R." Zugriff am 10.1.2005 unter <http://www.imbe.med.uni-erlangen.de/~hothorn/Rmc.pdf>.
- Brustoski, K., M. Kramer, et al. (2005a). "Neonatal and Maternal Immunological Responses to Conserved Epitopes within the DBL- $\gamma$ 3 Chondroitin Sulfate A-Binding Domain of *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1." *Infect Immun* **73**(12): 7988-7995.
- Brustoski, K., U. Moller, et al. (In Vorbereitung). "Reduced cord blood immune effector cell responsiveness mediated by CD4+ T cells induced in utero as a consequence of placental *Plasmodium falciparum* infection."
- Brustoski, K., U. Moller, et al. (2005b). "IFN-gamma and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria." *J Immunol* **174**(3): 1738-45.
- Coban, C., K. J. Ishii, et al. (2005). "Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin." *J Exp Med* **201**(1): 19-25.
- Coban, C., K. J. Ishii, et al. (2002). "Purified malaria pigment (hemozoin) enhances dendritic cell maturation and modulates the isotype of antibodies induced by a DNA vaccine." *Infect Immun* **70**(7): 3939-43.

- Constant, S. L. und K. Bottomly (1997). "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches." Annu Rev Immunol **15**: 297-322.
- Corinti, S., C. Albanesi, et al. (2001). "Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions." J Immunol **166**(7): 4312-8.
- Crespo, I., A. Paiva, et al. (2004). "Immunophenotypic and functional characterization of cord blood dendritic cells." Stem Cells Dev **13**(1): 63-70.
- Darmochwal-Kolarz, D., J. Rolinski, et al. (2004). "CD1c(+) immature myeloid dendritic cells are predominant in cord blood of healthy neonates." Immunol Lett **91**(1): 71-4.
- Darmochwal-Kolarz, D., J. Rolinski, et al. (2003a). "Blood myeloid and lymphoid dendritic cells are stable during the menstrual cycle but deficient during mid-gestation." J Reprod Immunol **59**(2): 193-203.
- Darmochwal-Kolarz, D., J. Rolinski, et al. (2003b). "Myeloid and lymphoid dendritic cells in normal pregnancy and pre-eclampsia." Clin Exp Immunol **132**(2): 339-44.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, et al. (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-20.
- Delespesse, G., L. P. Yang, et al. (1998). "Maturation of human neonatal CD4+ and CD8+ T lymphocytes into Th1/Th2 effectors." Vaccine **16**(14-15): 1415-9.
- Drohan, L., J. J. Harding, et al. (2004). "Selective developmental defects of cord blood antigen-presenting cell subsets." Hum Immunol **65**(11): 1356-69.
- Dzionek, A., A. Fuchs, et al. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol **165**(11): 6037-46.
- Engelmann, I., A. Santamaria, et al. (2005). "Activation status of cord blood gamma delta T cells reflects in utero exposure to Plasmodium falciparum antigen." J Infect Dis **191**(10): 1612-22.
- Fahrmeir, L., H. Kaufmann, et al. (1996). Regressionsanalyse. Multivariate statistische Verfahren. L. Fahrmeir, A. Hamerle and G. Tutz. Berlin, New York, de Gruyter: 93-168.
- Fievet, N., M. Moussa, et al. (2001). "Plasmodium falciparum induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta." J Infect Dis **183**(10): 1530-4.
- Fried, M., R. O. Muga, et al. (1998). "Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes." J Immunol **160**(5): 2523-30.
- Gazzinelli, R. T., C. Ropert, et al. (2004). "Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites." Immunol Rev **201**: 9-25.
- Gor, D. O., N. R. Rose, et al. (2003). "TH1-TH2: a procrustean paradigm." Nat Immunol **4**(6): 503-5.
- Goriely, S., B. Vincart, et al. (2001). "Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes." J Immunol **166**(3): 2141-6.
- Grafen, A. und R. Hails (2002). Modern Statistics for the Life Sciences. Oxford, Oxford University Press.

- Hagendorens, M. M., D. G. Ebo, et al. (2004). "Flow cytometrical determination of regulatory cytokines (IL-10, IL-12) and circulating dendritic cell cytokines in allergic asthmatic children." Cytokine **26**(2): 82-8.
- Hagendorens, M. M., D. G. Ebo, et al. (2003). "Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children." Clin Exp Allergy **33**(5): 633-9.
- Hoffmann-La Roche AG (1999). Roche-Lexikon Medizin. München, Urban & Schwarzenberg.
- Hunt, N. H. und G. E. Grau (2003). "Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria." Trends Immunol **24**(9): 491-9.
- Ioannidis, J. P. (2005). "Why most published research findings are false." PLoS Med **2**(8): e124.
- Ismaili, J., M. van der Sande, et al. (2003). "Plasmodium falciparum infection of the placenta affects newborn immune responses." Clin Exp Immunol **133**(3): 414-21.
- Jakobsen, P. H., F. N. Rasheed, et al. (1998). "Inflammatory reactions in placental blood of Plasmodium falciparum-infected women and high concentrations of soluble E-selectin and a circulating P. falciparum protein in the cord sera." Immunology **93**(2): 264-9.
- Janeway, C. A., Jr. und P. Travers (1997). Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Jaroszeski, M. J. und R. Heller (1998). Flow Cytometry Protocols. Totowa, Humana Press.
- Jung, S., D. Unutmaz, et al. (2002). "In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens." Immunity **17**(2): 211-20.
- Kanellopoulos-Langevin, C., S. M. Caucheteux, et al. (2003). "Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface." Reprod Biol Endocrinol **1**: 121.
- Kassberger, F., A. Birkenmaier, et al. (2002). "PCR typing of Plasmodium falciparum in matched peripheral, placental and umbilical cord blood." Parasitol Res **88**(12): 1073-9.
- Kelsall, B. L., C. A. Biron, et al. (2002). "Dendritic cells at the host-pathogen interface." Nat Immunol **3**(8): 699-702.
- Kirch, A. K., A. Agossou, et al. (2004). "Parasite-specific antibody and cytokine profiles in newborns from Plasmodium falciparum and Entamoeba histolytica/dispar-infected mothers." Pediatr Allergy Immunol **15**(2): 133-41.
- Köhler, W., G. Schachtel, et al. (1992). Biostatistik. Heidelberg, Springer.
- Koppelman, B., J. J. Neefjes, et al. (1997). "Interleukin-10 down-regulates MHC class II alpha beta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling." Immunity **7**(6): 861-71.
- Kremsner, P. G. und S. Krishna (2004). "Antimalarial combinations." Lancet **364**(9430): 285-94.
- Krishnegowda, G., A. M. Hajjar, et al. (2005). "Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity." J Biol Chem **280**(9): 8606-16.

- Lang, T. A. und M. Secic (1997). How To Report Statistics in Medicine. Philadelphia, American College of Physicians.
- Langrish, C. L., J. C. Buddle, et al. (2002). "Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses." Clin Exp Immunol **128**(1): 118-23.
- Le Hesran, J. Y., M. Cot, et al. (1997). "Maternal placental infection with Plasmodium falciparum and malaria morbidity during the first 2 years of life." Am J Epidemiol **146**(10): 826-31.
- Leisewitz, A. L., K. A. Rockett, et al. (2004). "Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection." Infect Immun **72**(7): 4233-9.
- Lipscomb, M. F. und B. J. Masten (2002). "Dendritic cells: immune regulators in health and disease." Physiol Rev **82**(1): 97-130.
- Lüpsen, H. "Hinweise zu Varianzanalysen." Zugriff am 22.11.2005 unter [www.uni-koeln.de/rrzk/kurse/unterlagen/spsskurs/HinweiseVarianzanalysen.pdf](http://www.uni-koeln.de/rrzk/kurse/unterlagen/spsskurs/HinweiseVarianzanalysen.pdf).
- Luty, A. J., D. J. Perkins, et al. (2000). "Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria." Infect Immun **68**(7): 3909-15.
- MacDonald, K. P., D. J. Munster, et al. (2002). "Characterization of human blood dendritic cell subsets." Blood **100**(13): 4512-20.
- Maizels, R. M., A. Balic, et al. (2004). "Helminth parasites--masters of regulation." Immunol Rev **201**: 89-116.
- Maldonado-Lopez, R. und M. Moser (2001). "Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses." Semin Immunol **13**(5): 275-82.
- Malhotra, I., P. Mungai, et al. (2005). "Distinct Th1- and Th2-Type prenatal cytokine responses to Plasmodium falciparum erythrocyte invasion ligands." Infect Immun **73**(6): 3462-70.
- Malhotra, I., P. Mungai, et al. (1999). "Helminth- and Bacillus Calmette-Guerin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis." J Immunol **162**(11): 6843-8.
- Malhotra, I., J. H. Ouma, et al. (2003). "Influence of maternal filariasis on childhood infection and immunity to Wuchereria bancrofti in Kenya." Infect Immun **71**(9): 5231-7.
- Marchant, A. und M. Goldman (2005). "T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn?" Clin Exp Immunol **141**(1): 10-8.
- Marodi, L. (2002). "Down-regulation of Th1 responses in human neonates." Clin Exp Immunol **128**(1): 1-2.
- Marshall-Clarke, S., D. Reen, et al. (2000). "Neonatal immunity: how well has it grown up?" Immunol Today **21**(1): 35-41.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-5.
- Mehlhorn, H. und G. Piekarski (1995). Grundriß der Parasitenkunde. Parasiten des Menschen und der Nutztiere. Stuttgart, Uni-TB.
- Miltenyi Biotec. "Blood Dendritic Cell Enumeration Kit." Zugriff am 19.11.2005 unter <http://www.miltenyibiotec.com/datasheets/files2/DS130-091-086-03.pdf>.
- Ndao, M., E. Bandyayera, et al. (2004). "Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada." J Clin Microbiol **42**(6): 2694-700.
- Ndungu, F. M., B. C. Urban, et al. (2005). "Regulation of immune response by Plasmodium-infected red blood cells." Parasite Immunol **27**(10-11): 373-84.

- Ngo, V. N., H. L. Tang, et al. (1998). "Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells." *J Exp Med* **188**(1): 181-91.
- O'Garra, A. (1998). "Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets." *Immunity* **8**(3): 275-83.
- Ocana-Morgner, C., M. M. Mota, et al. (2003). "Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells." *J Exp Med* **197**(2): 143-51.
- Ofori, M. F., D. Doodoo, et al. (2002). "Malaria-induced acquisition of antibodies to Plasmodium falciparum variant surface antigens." *Infect Immun* **70**(6): 2982-8.
- Okoko, B. J., G. Enwere, et al. (2003). "The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis." *Acta Trop* **87**(2): 193-205.
- Omer, F. M., J. A. Kurtzhals, et al. (2000). "Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta?" *Parasitol Today* **16**(1): 18-23.
- Omer, F. M. und E. M. Riley (1998). "Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection." *J Exp Med* **188**(1): 39-48.
- Pascual, V., J. Banchereau, et al. (2003). "The central role of dendritic cells and interferon-alpha in SLE." *Curr Opin Rheumatol* **15**(5): 548-56.
- Perry, J. A., C. S. Olver, et al. (2005). "Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation." *J Immunol* **174**(10): 5921-5.
- Pichyangkul, S., K. Yongvanitchit, et al. (2004). "Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway." *J Immunol* **172**(8): 4926-33.
- Pitocchelli, J. (2001). "ANOVA and Multiple Comparisons." Zugriff am 11.1.2005 unter <http://www.anselm.edu/homepage/jpitocch/anova/anovapage2.html>.
- R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. Wien, R Foundation for Statistical Computing.
- Reis e Sousa, C. (2004). "Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls." *Semin Immunol* **16**(1): 27-34.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, et al. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." *Science* **283**(5405): 1183-6.
- Robinson, S. P., S. Patterson, et al. (1999). "Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells." *Eur J Immunol* **29**(9): 2769-78.
- Rogerson, S. J., H. C. Brown, et al. (2003). "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): 267-70.
- Ruckert, R., K. Brandt, et al. (2003). "Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses." *Eur J Immunol* **33**(12): 3493-503.
- Sallusto, F., M. Cella, et al. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* **182**(2): 389-400.
- Sanni, L. A., S. R. Thomas, et al. (1998). "Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and noncerebral malaria." *Am J Pathol* **152**(2): 611-9.
- Schibler, K. R., A. Georgelas, et al. (2002). "Developmental biology of the dendritic cell system." *Acta Paediatr Suppl* **91**(438): 9-16.

- Schofield, L., L. Vivas, et al. (1993). "Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF-alpha-inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospects for the immunotherapy of severe malaria." Ann Trop Med Parasitol **87**(6): 617-26.
- Sher, A., E. Pearce, et al. (2003). "Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells." Curr Opin Immunol **15**(4): 421-9.
- Shortman, K. und Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Skorokhod, O. A., M. Alessio, et al. (2004). "Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect." J Immunol **173**(6): 4066-74.
- Snow, R. W., C. A. Guerra, et al. (2005). "The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria." Nature **434**(7030): 214-7.
- Sorg, R. V., G. Kogler, et al. (1999). "Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population." Blood **93**(7): 2302-7.
- Steinman, R. M. (2003). "The control of immunity and tolerance by dendritic cell." Pathol Biol (Paris) **51**(2): 59-60.
- Suguitan, A. L., Jr., T. J. Cadigan, et al. (2003a). "Malaria-associated cytokine changes in the placenta of women with pre-term deliveries in Yaounde, Cameroon." Am J Trop Med Hyg **69**(6): 574-81.
- Suguitan, A. L., Jr., R. G. Leke, et al. (2003b). "Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria." J Infect Dis **188**(7): 1074-82.
- Szabolcs, P., K. D. Park, et al. (2003). "Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method." Stem Cells **21**(3): 296-303.
- Tobian, A. A., R. K. Mehlotra, et al. (2000). "Frequent umbilical cord-blood and maternal-blood infections with *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, and *P. ovale* in Kenya." J Infect Dis **182**(2): 558-63.
- Tseng, S. Y., M. Otsuji, et al. (2001). "B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells." J Exp Med **193**(7): 839-46.
- Tsubouchi, E., S. M. Akbar, et al. (2004). "Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection." J Gastroenterol **39**(8): 754-62.
- Ueda, Y., M. Hagihara, et al. (2003). "Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults." Hum Immunol **64**(12): 1144-51.
- Upham, J. W., P. T. Lee, et al. (2002). "Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood." Infect Immun **70**(12): 6583-8.
- Urban, B. C., D. J. Ferguson, et al. (1999). "*Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells." Nature **400**(6739): 73-7.
- Urban, B. C., T. T. Hien, et al. (2005). "Fatal *Plasmodium falciparum* malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization." Infect Immun **73**(4): 1986-94.

- Urban, B. C., T. Mwangi, et al. (2001a). "Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria." Blood **98**(9): 2859-61.
- Urban, B. C. und D. J. Roberts (2002). "Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells." Curr Opin Immunol **14**(4): 458-65.
- Urban, B. C., N. Willcox, et al. (2001b). "A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8750-5.
- Velten, F. W., K. Duperrier, et al. (2004). "A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity in vitro." Eur J Immunol **34**(10): 2800-11.
- Weatherall, D. J., L. H. Miller, et al. (2002). "Malaria and the red cell." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 35-57.
- White, N. J. (1996). Malaria. Manson's Tropical Diseases. G. C. Cook. London, W B Saunders: 1087-1164.
- Wildling, E., S. Winkler, et al. (1995). "Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon." Trop Med Parasitol **46**(2): 77-82.
- Wojas, K., J. Tabarkiewicz, et al. (2004). "Dendritic cells in peripheral blood of patients with breast and lung cancer--a pilot study [Abstract]." Folia Histochem Cytobiol **42**(1): 45-8.
- Wulder, M. (1.10.2005). "A Practical Guide to the Use of Selected Multivariate Statistics." Zugriff am 24.11.2005 unter [www.pfc.forestry.ca/profiles/wulder/mvstats](http://www.pfc.forestry.ca/profiles/wulder/mvstats).
- Xi, G., R. G. Leke, et al. (2003). "Congenital exposure to *Plasmodium falciparum* antigens: prevalence and antigenic specificity of in utero-produced antimalarial immunoglobulin M antibodies." Infect Immun **71**(3): 1242-6.
- Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner, et al. (2002). "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis." Science **296**(5567): 490-4.
- Yu, C. H. (1998). "Checking assumptions in regression." Zugriff am 6.3.2005 unter [seamonkey.ed.asu.edu/~alex/computer/sas/regression\\_assumption.html](http://seamonkey.ed.asu.edu/~alex/computer/sas/regression_assumption.html).

## **Danksagungen / Remerciements**

*Mes gratitudeles les plus sincères sont envers toutes les participantes de mon étude et surtout leurs enfants. J'ai l'espoir qu'un jour les résultats présentés auparavant pourront améliorer la situation des personnes exposées au paludisme.*

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter G. Kremsner, der mit fachlicher wie auch persönlicher Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht hat, ebenso wie Dr. Adrian J. Luty für die vorzügliche Betreuung dieser Promotion.

*Je remercie les directions et surtout les sage-femmes des deux hôpitaux pour leur support généreux.*

Meiner Familie danke ich und meinen Freunden, die mich während meiner Ausbildung und Forschungsarbeit fortwährend unterstützten.

Besonderer Dank gilt Dipl.-Biol. Rolf Fendel und Dr. Ilka Engelmann für die Anleitung und Hilfe bei der Ausarbeitung des FACS-Protokolls, Dr. Ayola A. Adegnika und Dr. Salidji M. Agnandji für die Einarbeitung in die wissenschaftliche Arbeit vor Ort, Dr. Sanders K. Chai und Dipl.-Biol. Andrea Kreidenweiss für fruchtbare Diskussionen. Dipl.-Biol. Daniela Schütte und *cand. med.* Martin Kramer waren eine unentbehrliche Hilfe bei der praktischen Umsetzung des Forschungsprojekts.

*On ne survit pas toute une année au forêt vierge sans le support des bons amis, parmi lesquels je compte tous mes collègues à Lambaréné, soit dans les hôpitaux, soit au labo, mais particulièrement Dr. Dr. Saadou Issifou, 'grand frère' Dr. Pierre-Blaise Matsiegui, Dr. Annika Rudat et 'grand frère' Dipl.-Inf. Jean-Clément Haakou. Eugénie, Brigitte, Arianne, Cynthia, vous resteriez toujours dans mon coeur. Anselm, Marcel, mon coeur est réservé pour mes femmes, mais je vous garde dans mes pensées.*

*Enfin, je remercie profondément l'étoile d'Afrique, Mlle. Dolinda Moutsinga, dont le support constant était une aide essentielle pour le succès de mes travaux.*

## **Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Name:Lutz Philipp Breitling  
Geburtsdatum: 5. Juli 1978  
Geburtsort: Hannover, Deutschland

### **Akademischer Werdegang**

- seit 2005 "Marie Curie Early Stage Training"-Stipendiat in Leeds/U.K.
- 2001-2005 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 2003-2004 Forschungsaufenthalt am Hôpital Albert Schweitzer Lambaréné/Gabun
- Herbst 2002 Praktikum im Department of Infectious Disease Epidemiology am Imperial College London/U.K.
- 1999-2002 Praktika und Famulaturen am Medical Center Al-Mamoon Port Said/Ägypten, am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Hamburg, an der Infektiologischen Abteilung der Charité Berlin und im Institut für Tropenmedizin Tübingen
- 1998-2001 Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

### **Schulische Ausbildung**

- 1991-1998 Besuch des St. Ursula Gymnasiums Hannover. Abitur-Abschluss
- 1989-1991 Besuch der Orientierungsstufe der Ludwig Windthorst Schule Hannover
- 1985-1989 Besuch der Grundschule Im Langen Feld, Laatzen

## Appendix

### I. Written Informed Consent

Seite 1 von 3 (WIC)

#### **Fiche d'information des patients**

Etude longitudinale des mères et des enfants pour déterminer leurs états d'infection et d'immunité et le traitement intermittent par le sulfadoxine-pyriméthamine pour la prévention du paludisme chez les enfants et son impact sur la santé

Le paludisme reste l'une des premières causes de mortalité en Afrique, en l'occurrence chez les enfants de moins de 5 ans chez qui la mortalité due au paludisme est de 90%. Dans les régions de hautes endémicité les adultes acquièrent une semi-immunité qui les protège contre les formes sévères de la maladie alors que les enfants, sans cette protection, continuent de payer un lourd tribut. Il y a donc un besoin urgent de mettre au point de simples et abordables stratégies de lutte antipaludique chez les enfants.

La prévention du paludisme par la prise de médicament pourrait agir sur l'impact de la maladie dans la population, réduction des cas de paludisme et par conséquent des cas d'absentéisme scolaire, réduction des cas d'anémie sévère et de la mortalité.

Le sulfadoxine-pyriméthamine (FANSIDAR®) est largement utilisé en Afrique pour traiter le paludisme non compliqué à *P. falciparum* chez l'enfant et chez l'adulte. Il présente une bonne efficacité et est bien toléré. Des études récentes ont montré que le traitement intermittent par le sulfadoxine-pyriméthamine a permis de réduire les infections palustres durant la première année de vie.

Vous, votre enfant et vous-même, êtes invités à participer à cette étude qui a pour objectif d'évaluer l'efficacité et la tolérance du traitement intermittent par le sulfadoxine-pyriméthamine comme prévention du paludisme chez les enfants à partir de trois mois, et la susceptibilité des mères au paludisme après l'accouchement. Cette étude permettra aussi d'évaluer la résistance du *P. falciparum* au sulfadoxine-pyriméthamine, d'étudier les réponses immunitaires et l'impact des mutations des gènes humains au cours du paludisme. Deux groupes de 500 enfants chacun et deux de 300 mères seront constitués.

Au cours de l'étude votre enfant sera traité de manière intermittente avec un demi-comprimé de sulfadoxine-pyriméthamine ou du placebo (produit sans substance active) à l'âge de 3, 9 et 15 mois. Un contrôle se fera une fois par mois jusqu'à l'âge de 5 ans pour détecter une éventuelle infection palustre ou d'autres maladies. Les mères qui ont accepté de participer depuis leur 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse seront suivies une fois par mois jusqu'à 18 mois après l'accouchement. A chaque visite un examen clinique et des examens de laboratoires se feront. Une goutte épaisse sera effectuée une fois par mois. Du sang sera prélevé à diverses occasions, en moyenne 2 fois par an (maximum de 4 ml à chaque fois), pour l'hémogramme, la vérification du fonctionnement du foie et des reins, et pour des tests immunologiques. Chez les mères un prélèvement veineux, des prélèvements de sangs placentaires et de sang du cordon ombilical se feront au moment de l'accouchement. Ces prélèvements ne causeront aucun dommage à vous ni à votre enfant, sauf rarement un petit hématome sous cutané au point de piqûre. En cas de paludisme malgré la prévention, votre enfant sera traité oralement avec de l'artésunate.

Seite 2 von 3 (WIC)

Votre participation et/ou celle de votre enfant à cette étude est volontaire, vous êtes libre d'accepter ou de retirer votre consentement à tout moment sans conséquences néfastes pour vous ou pour votre enfant et sans perte de vos avantages. Aussi le médecin responsable pourra-t-il exclure votre enfant de l'étude si les situations suivantes se présentent: paludisme, détérioration de l'état général, apparition d'effets secondaires graves pouvant être attribués au médicament, deux épisodes de vomissement en l'espace d'une heure après deux dosages du médicament, violation du protocole et participant perdu de vue au cours du suivi.

La participation de votre enfant à l'étude peut être également interrompue si vous ne respectez pas les instructions qui vous sont données. L'étude pourra être interrompue à tout moment par le médecin responsable s'il advient de sérieux problèmes. Les dommages liés à l'études ou à ses procédures seront couverts par une assurance.

En cas de maladie due au médicament ou aux procédures de l'étude, votre enfant sera pris en charge gratuitement pour cette maladie. Le Laboratoire de Recherches sera ouvert tous les jours et les médecins du Laboratoire seront à votre disposition. Toutes les informations complémentaires vous seront données à la demande. Vous, votre enfant et vous, bénéficierez de cette étude car vous serez bien suivi gratuitement. Le sulfadoxine-pyriméthamine a été déjà utilisé chez bien de patients, il est très bien toléré. Nous ne pouvons pas cependant exclure la possibilité de très rares effets secondaires. Il n'y a pas d'autres risques associés à l'étude.

Votre dossier médical et/ou celui de votre enfant sera à la disposition des moniteurs, des audits, du comité d'éthique ou des autorités gouvernementales pour des vérifications si nécessaires. Néanmoins, la confidentialité des informations sera maintenue. Par la signature du formulaires de consentement vous autorisez l'accès de votre dossier médical et/ou de celui de votre enfant aux autorités sus citées.

**En cas d'urgence ou pour des informations complémentaires contactez :**

Dr Saadou Issifou, Laboratoire de Recherches, Hôpital Albert Schweitzer, B.P. 118 Lambaréné, Gabon. Téléphone 581099.

---

La participation de votre enfant à cette étude est demandée pour 5 ans. La votre, si vous participez vous-même, est demandée pour 2 ans. Vous serez tenu de respecter les rendez-vous pour les contrôles et de tenir informé le staff médical de tous vos problèmes et ceux de votre enfant tout au long de l'étude. Cette étude est approuvée par les autorités locales.

Seite 3 von 3 (WIC)

11.1.2 Consentment form in French - written

**Consentement écrit**

**Etude longitudinale des mères et des enfants pour déterminer leurs états d'infection d'immunité et le traitement intermittent par le sulfadoxine-pyriméthamine pour la prévention du paludisme chez les enfants et son impact sur la santé**

J'ai lu les informations concernant la présente étude et j'ai compris tous les points. Toutes mes questions ont été bien répondues et j'ai compris toutes les informations relatives à ma participation et/ou à celle de mon enfant. Je donne ici mon consentement pour ma participation et/ou pour celle de mon enfant à cette étude. J'ai compris que je peux retirer mon consentement à tout moment sans avoir à me justifier et sans préjudices pour moi ou pour mon enfant.

Nom de l'enfant: \_\_\_\_\_ Numéro: \_\_\_\_\_

Nom du parent: \_\_\_\_\_  
ou du gardien

Nom de la Participante: \_\_\_\_\_ Numéro: \_\_\_\_\_

Signature de la Participante: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Signature de l'Investigateur: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**En cas d'urgence ou pour des informations complémentaires contactez :**

Dr Saadou Issifou, Laboratoire de Recherches, Hôpital Albert Schweitzer, B.P. 118, Lambaréné, Gabon. Téléphone 581099

## II. Datenerhebungsbogen

Seite 1 von 2 (Datenerhebungsbogen)

<b>X-sectional Database</b> (DC subjects, format as in WOTRO crosssectional database)					
<b>General information</b>					
Wotro ID <input type="text"/>	X <input type="text"/>	Field Id <input type="text"/>	Site <input type="text"/>	Time <input type="text"/>	Date <input type="text"/>
Name <input type="text"/>			Initial <input type="text"/>	Consent inform <input type="text"/>	
DOB <input type="text"/>	Age <input type="text"/>	years	Marital status <input type="text"/>	Ethnic group <input type="text"/>	
Occupation <input type="text"/>	Room nber <input type="text"/>	People number <input type="text"/>	CHD NBERS <input type="text"/>		
<2years <input type="text"/>	<5years <input type="text"/>	<10years <input type="text"/>	<15years <input type="text"/>	>15years <input type="text"/>	
Female <input type="text"/>	Male <input type="text"/>	Address <input type="text"/>			
Investigator's <input type="text"/>		<input type="text"/>			
<b>Past Gynecology and obstetric</b>					
Menarche <input type="text"/>	years	Menes duration <input type="text"/>	days	pregnant <input type="text"/>	parity <input type="text"/>
children alive <input type="text"/>	abortion <input type="text"/>	miscarr <input type="text"/>	Stillbirth <input type="text"/>		
children death <input type="text"/>	Cause of death <input type="text"/>				
contrcpt <input type="text"/>	Last menes date <input type="text"/>	pregnant weeks <input type="text"/>	weeks		
EDC <input type="text"/>	Pregnant status <input type="text"/>				
<b>Past medical and surgery</b>					
Blood group <input type="text"/>	Tb vaccine <input type="text"/>	yes/no	Hemopathies <input type="text"/>		
Diabet <input type="text"/>	HTA <input type="text"/>	link family <input type="text"/>			
Past Surgery <input type="text"/>			others <input type="text"/>		
antimal <input type="text"/>	bednet <input type="text"/>	alcohol <input type="text"/>	tobacco <input type="text"/>	yes/no	CPN visit <input type="text"/>
<b>other medication</b>					
Med1 <input type="text"/>	Med2 <input type="text"/>	Med3 <input type="text"/>			
Med4 <input type="text"/>	Med5 <input type="text"/>	Med6 <input type="text"/>			
rupt_mbr <input type="text"/>	Fever during preg <input type="text"/>	Last fever date <input type="text"/>			
Last confirm malaria <input type="text"/>	Allergy <input type="text"/>	medication allergy <input type="text"/>			
Previous hosp <input type="text"/>	Other signs <input type="text"/>				
<b>Clinical exams</b>					
Temperature <input type="text"/>	°C	Blood pressure <input type="text"/>	mmhg	Puls <input type="text"/>	/min
conjunct <input type="text"/>					

Seite 2 von 2 (Datenerhebungsbogen)

Weight	<input type="text"/>	Kg	Height	<input type="text"/>	CM	Fundal	<input type="text"/>	CM	Edema	<input type="text"/>	Pitting	<input type="text"/>
EDTA Blood	<input type="text"/>	Heparin Blood	<input type="text"/>	Urine taken	<input type="text"/>	Stool taken	<input type="text"/>					
<b>New born data</b>												
New born ID	<input type="text"/>	CS NB	<input type="text"/>	Thorax diameter	<input type="text"/>	Cm						
NB weight	<input type="text"/>	g	Arm diameter	<input type="text"/>	Cm							
Placenta weight	<input type="text"/>	g	head diameter	<input type="text"/>	Cm							
Apgar	<input type="text"/>	Sex	<input type="text"/>	Nb height	<input type="text"/>	Cm						
<b>Intervention</b>												
<b>Laboratory data</b>												
<b>Mother's hemmogramme</b>						<b>Mother's Thick smear</b>						
RBC:	<input type="text"/>	M/ $\mu$ l				Parasitemia	<input type="text"/>	/ $\mu$ l				
Hemoglobin	<input type="text"/>	g/dl				species	<input type="text"/>					
Hematocrit:	<input type="text"/>	%				Filaremia	<input type="text"/>	/ $\mu$ l				
WBC:	<input type="text"/>	10/ $\mu$ l				Species	<input type="text"/>					
Neutrophiles	<input type="text"/>	%				Pigment	<input type="text"/>					
Lymphocytes	<input type="text"/>	%				<b>Placental Thick smear</b>						
Monocytes	<input type="text"/>	%				Parasitemia	<input type="text"/>	/ $\mu$ l				
Eosinophiles:	<input type="text"/>	%				Species	<input type="text"/>					
Basophiles	<input type="text"/>	%				Pigment	<input type="text"/>					
Platelets:	<input type="text"/>	10/ $\mu$ l				<b>Cord blood Thick smear</b>						
						Parasitemia	<input type="text"/>	/ $\mu$ l				
						Species	<input type="text"/>					
						Pigment	<input type="text"/>					
<b>Urin exam</b>												
Schistos	<input type="text"/>	/10ml	species	<input type="text"/>								
<b>Stool Species</b>												
Stool exam	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>					
<b>Immunology samples</b>												
Heparin blood volume	<input type="text"/>	ml	PBMC	<input type="text"/>	Millions of cells	Serum	<input type="text"/>	ml				

**III. Zusammensetzung von IMDM**

(Herstellerangaben)

<b>COMPONENT</b>	<b>g/L</b>		
<b>INORGANIC SALTS</b>		<b>VITAMINS</b>	
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.219	D-Biotin	0.000013
MgSO <sub>4</sub> (anhyd)	0.09767	Choline Chloride	0.004
KCl	0.33	Folic Acid	0.004
KNO <sub>3</sub>	0.000076	myo-Inositol	0.0072
NaHCO <sub>3</sub>	3.024	Niacinamide	0.004
KCl	4.505	D-Pantothenic Acid•½Ca	0.004
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhyd)	0.109	Pyridoxal•HCl	0.004
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.000017	Riboflavin	0.0004
<b>AMINO ACIDS</b>		Thiamine•HCl	0.004
Alanine	0.025	Vitamin B-12	0.000013
L-Arginine•HCl	0.084	<b>OTHER</b>	
L-Asparagine•H <sub>2</sub> O	0.0284	D-Glucose	4.5
L-Aspartic Acid	0.03	HEPES	5.958
L-Cystine•2HCl	0.09124	Phenol Red•Na	0.016
L-Glutamic Acid	0.075	Pyruvic Acid•Na	0.11
L-Glutamine	—	<b>ADD</b>	
Glycine	0.03	NaHCO <sub>3</sub>	—
L-Histidine•HCl•H <sub>2</sub> O	0.042	L-Glutamine	0.584
L-Isoleucine	0.105		
L-Leucine	0.105		
L-Lysine•HCl	0.146		
L-Methionine	0.03		
L-Phenylalanine	0.066		
L-Proline	0.04		
L-Serine	0.042		
L-Threonine	0.095		
L-Tryptophan	0.016		
L-Tyrosine•2Na•2H <sub>2</sub> O	0.10379		
L-Valine	0.094		