©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 13 (1991) 245 - 258

I. Med. Abteilung, A. Ö. Landeskrankenhaus Klagenfurt (Vorstand: Univ. Doz. Dr. D. Geissler) (1)
Infektionsabteilung (Leiter: Univ. Doz. Dr. D. Geissler)
der Medizinischen Universitätsklinik Innsbruck (Vorstand: Univ. Prof. Dr. H. Braunsteiner) (2)

Adhäsionsstrukturen für *Plasmodium falciparum:* Relevanz der ICAM-1-Struktur im Rahmen der infektassoziierten Zytokinfreisetzung (IL-1, TNF-alpha, GM-CSF, IFN-gamma)

D. Geissler[1], Sabine Gaggl[2]

Einleitung

Ein Phänomen, das für die Entwicklung lebensbedrohlicher Komplikationen bei Patienten mit Malaria tropica von entscheidender Bedeutung ist, stellt die Anhaftung mit *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an Endothelzellen und eine dadurch bedingte Okkulsion von Kapillaren dar (1, 24). Die Fähigkeit zur Anhaftung wird einerseits durch die genetische und phänotypische Variabilität von *Plasmodium falciparum* (37) und andererseits durch Wirtsfaktoren bestimmt. Diese sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die genetische Variabilität äußert sich z. B. in der fehlenden (K^-) oder vorhandenen (K^+) Ausbildung knopfartiger Vorwölbungen an der Oberfläche mit *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten, die für die Anhaftung an Endothelzellen verantwortlich sind (19). Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, daß K^- Parasiten mit einer niedrigeren Parasitämie einhergehen und zu einer spontanen Heilung führen, während K^+ Parasiten zu schweren Krankheitsverläufen mit zerebraler Malaria führen (21). Unter den Wirtsfaktoren spielen neben der Immunreaktivität und Zytokinfreisetzung vor allem die Adhäsionsstrukturen für *Plasmodium falciparum* eine entscheidende Rolle. Im Mäuseversuch konnte zuerst gezeigt werden, daß immundefiziente nu/nu Mäuse keine zerebrale Malaria entwickeln, in der Folge wurden CD4+ T-Lymphozyten und die durch sie sezernierten Zytokine (GM-CSF, IL-3, IFN-gamma, Lymphotoxin und TNF-alpha) als die entscheidenden immunologischen Faktoren für die Entwicklung einer zerebralen Malaria identifiziert (6, 11, 15, 17). Als zweiter entscheidender Wirtsfaktor wurden CD36, Thrombospondin und ICAM-1 als Adhäsionsstrukturen für mit *Plasmodium falciparum*-infizierte Erythrozyten charakterisiert (3, 22, 23, 27, 28, 29, 31). Die molekularen und funktionellen Charakteristika dieser Adhäsionsstrukturen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Ein wichtiges Bindeglied zwischen der Zytokinfreisetzung einerseits und Adhäsionsstrukturen andererseits konnte durch die Beobachtung, daß Zytokine wie TNF-alpha, IL-1 und IFN-gamma eine Erhöhung der ICAM-1-Expression an Endothelzellen bewirken, hergestellt werden (8, 30).

Das Ziel unserer derzeitigen Studie bestand in einer Untersuchung des Effektes eines anti-ICAM-1-Antikörpers auf die Zytokinsekretion von T-Lymphozyten mit erythrozytären Vorläuferzellen. Diese Untersuchungen stellen die Basis für eine spätere therapeutische Verwendung von monoklonalen Antikörpern oder von löslichem ICAM-1 in der Therapie der zerebralen Malaria dar.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

TABELLE 1
Bestimmende Faktoren für die Adhäsivität von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten

A. Parasitenassoziierte Variabilität

z. B. knopfartige Vorwölbungen an Oberfläche infzierter Erythrozyten, im ELMI ca. 100 nm Durchmesser, elektronendichtes Material, K^+ oder K^-, die für den Zellkontakt mit Endothelzellen verantwortlich sind. Im Tierexperiment spontane Heilung von K^- infizierten Tieren.

B. Wirtsassozierte Faktoren

1. Adhäsionsstrukturen:

a) Plättchenglykoprotein IV (CD 36)
b) Thrombospondin
c) ICAM-1

2. Immunreaktivität und Zytokinfreisetzung:

a) Immundefiziente "nu/nu mice" entwickeln keine zerebrale Malaria
b) Abhängigkeit vom Vorhandensein von CD 4^+ T-Lymphozyten (6)
c) TNF-alpha, IL-3, GM-CSF (6, 15, 16)

Methoden

Monoklonaler Antikörper:

Der mAK 7F7 (IgG2a) erkennt ein 85 kD Glykoprotein. Wie früher beschrieben, wurde der Antikörper über Protein A-Sepharose gereinigt (32, 33). Als Negativkontrolle verwendeten wir einen monoklonalen Antikörper gegen Komplementfaktor H (MAH-1) und einen Mäuse-mAk gegen FSH.

Zellabtrennung:

Mononukleäre Zellen (MNC) aus peripherem Blut und Knochenmark gesunder, voll informierter Spender wurden über Dichtezentrifugation über Lymphoprep (Nyegaard, Oslo, Norway; density 1,077 g/ml) nach der Methode von BÖYUM (5) gewonnen. Die MNC wurden dreimal in HBSS ohne Calcium und Magnesium gewaschen, in McCOY's 5A modifiziertem Medium mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) resuspendiert.

Abtrennung der Monozyten und T-Zellen:

Nach Abtrennung der Monozyten durch Adhärenz an Plastik (26) wurden nichtadhärente Zellen mit Neuraminidase vorbehandelten Schafserythrozyten in E-Rosettenpositive (E^+) und -negative (E^-) Zellen getrennt. Rosetten formende T-Zellen wurden mit Ammoniumchlorid zur Lyse der Schafserythrozyten inkubiert, dreimal in HBSS gewaschen und in 10% FCS resuspendiert. Bei Überprüfung mit Trypanblau betrug die Vitabilität über 90%. Die T-Zellen wurden im indirekten Immunfluoreszenztest mit dem monoklonalen pan-T Antikörper OKT-3 (Ortho-Diagnostic Systems, Paritan, New Jersey) gezählt. E^+ Zellen enthielten über 95% T-Lymphozyten. Die Monozytenverunreinigung war kleiner als 2% (gemessen durch α-Naphthylesterasefärbung).

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

TABELLE 2

CD 36 (= Plättchen GP IV, GP IIIb) (4, 20, 27, 28)

Molekulare Struktur: einkettiges Membranglykoprotein
MG: 88 kD
Vorkommen: Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten
Funktion:

a) Plättchen- und Monozytenrezeptor für Thrombospondin, eventuell-Plättchen-Kollagen-Adhäsionsrezeptor

b) endotheliale Adhäsionsstruktur für *Plasmodium falciparum*
gereinigtes CD 36 und CD 36-transfizierte COS-Zellen binden
P. f. infizierte Ery
(K^+)-Blockade durch anti-CD 36 Ak
gereinigtes CD 36 hemmt die Bindung von P. f. infizierten Ery an Endothelzellen

Thrombospondin (TSP) (22, 23, 29)

Molekulare Struktur: sekretorisches Protein mit 3 identischen Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind, jede mit einem MG von 180 kD
Vorkommen: Thromozyten (alpha-Granula)
Funktion:

a) Brückenmolekül, das Proteine in Plättchenaggregaten miteinander verbindet, z. B. Laminin, Fibronektin, Typ V Kollagen, Fibrinogen, Plasminogen, Heparin

b) Adhärenz von P. f. infizierten Erythrozyten an TSP, Blockade durch spezifische anti-TSP-Ak und lösliches TSP; Hilfsmolekül für CD 36

ICAM-1 (7, 10, 25, 31, 34, 35, 36)

Molekulare Struktur: Membranglykoprotein mit unterschiedlicher Glykosylisierung, Mitglied der "immunoglobulin supergene family"
MW: 84 - 110 kD
Vorkommen: Endothelzellen, Epithelzellen, Monozyten, Fibroblasten, B- und T-Lymphozyten
Funktion:

a) Bindung an LFA-1, Adhäsion von zirkulierenden Monozyten und T-Zellen an Endothelzellen

b) major rhinovirus receptor

c) Bindung von P. f. infizierten Erythrozyten

Mikroagarkultursystem (14):

Je nach der Versuchsanordnung werden entweder die gewonnenen mononukleären Zellen direkt als Zielzellpopulation in einer Agar-Unterschicht gepflanzt ($0{,}75 \times 10^5$ MNC/well) oder es wird eine Monozyten- und T-Zelldepletion durchgeführt. Als Kulturmedium wird McCOY's 5-A-modifiziertes Medium mit 20% fetalem Kälberserum verwendet. Die Agar-Endkonzentration beträgt 0,3%. 0,25 ml dieser Zellsuspension werden in "Nunclon"-Kulturplatten (Nunc, Roskilde, Denmark) pipettiert. Nach Erhärten bei Zimmertemperatur wird die Agarschicht mit einer flüssigen Oberschicht überlagert, die die entsprechenden spezifischen Wachstumsfaktoren (für die Erythropoese 2 IU/ml EPO, Behringwerke Marburg, und 100 ng/ml rIL-3, Behringwerke Marburg) enthält.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Kokulturuntersuchungen:

Monozyten- und T-zelldepletierte Knochenmarks-MNC ($0,4 \times 10^5$/well) oder periphere MNC ($2,0 \times 10^5$/well) wurden mit steigenden Konzentrationen autologer T-Lymphozyten (50%, 100%, 200%, 400%) kokultiviert. Die T-Lymphozyten (1×10^6/ml) wurden entweder eine Stunde lang mit PHA (25 ng/ml) präaktiviert und anschließend für eine weitere Stunde mit 7F7 mAK (400 µl/ml Überstand oder 1 µg/ml gereinigter Ak) vorinkubiert oder ohne PHA Aktivierung und/oder 7F7 mAk in der Kokultur gepflanzt.

Anschließend wird die Kultur für die BFU-E 14 Tage lang bei 37° C in einem Inkubator bei 5% CO_2 inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wird das Agar-Häutchen durch Zugabe von ungefähr 1 ml 2,5%igem Glutaraldehyd fixiert, anschließend in destilliertem Wasser gewaschen, auf einen Objektträger aufgebracht und auf einer Wärmeplatte getrocknet. Die getrockneten Agar-Häutchen werden anschließend routinemäßig nach der Pappenheim-Methode angefärbt und entsprechend mikroskopisch ausgewertet. Die Mindestzahl für eine BFU-E beträgt 64 Zellen, die Auszählung der sich in der flüssigen Phase befindenden T-lymphozytären Kolonien erfolgt noch vor Fixierung der Präparate im Invertmikroskop (CFU-TL, Mindestzahl 50 Zellen [14]).

Flüssigkulturen:

Die Zellen wurden in "Nunclon"-Kulturplatten in 1 ml McCOY's 5A Medium mit 10% FCS kultiviert. Es wurden PHA (25 ng/ml, optimale getestete Konzentration) stimulierte MNC (1×10^6 MNC/ml) und PHA (25 ng/ml) stimulierte T-Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ T-Ly/ml) gepflanzt. Gereinigter oder Antikörperüberstand wurde in den im Text angegebenen Konzentrationen beigegeben, die Zellen wurden bei 37° C und 5% CO_2 inkubiert. In einem Parallelsatz wurden nichtstimulierte Zellen ausgetestet. Nach 48 Stunden wurden die Kulturüberstände gesammelt und auf ihren Zytokingehalt untersucht.

Zytokinbestimmung:

Die Kulturüberstände wurden mit einem kommerziell erhältlichen RIA auf ihren Gehalt an ZNF-alpha, IFN-gamma und IL-1 untersucht (IRE-Medgenix, Fleurus, Belgium; Pharmacia Diagnostics AB). Der GM-CSF-Gehalt wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt (Insight TM GM, Surry Hills, Australia). Die unteren Bestimmungsgrenzen liegen bei der Verwendung dieser Tests bei $> 0,005$ ng/ml für TNF-alpha, $> 0,2$ U/ml (NIH standard) für IFN-gamma und > 10 pg/ml für GM-CSF. Zur statistischen Analyse wurde der Student's Test verwendet.

Ergebnisse

Effekt des mAk 7F7 auf die Zytokinfreisetzung durch PHA aktivierte MNC:

Wie in Abbildung 1 dargestellt, kann gereinigter 7F7 die Freisetzung von TNF-alpha, IFN-gamma und IL-1 aus PHA stimulierten MNC dosisabhängig hemmen. Die zwei verwendeten Kontrollantikörper (gegen hFSH und MAH-1) zeigten keinen hemmenden Effekt (Abb. 1). Die höchste Hemmung konnte mit 1 µg/ml gereinigten 7F7 mAk (Abb. 1) oder 400 µl/ml 7F7 Hybridomüberstand erreicht werden. Eine signifikante Hemmung von TNF-alpha, IFN-gamma und IL-1 ($p < 0,01$) wurde mit 400 µl/ml 7F7 Ak erzielt. Im Gegensatz dazu zeigten die GM-CSF-Spiegel, die nach mAk-Behandlung erreicht wurden, heterogene Ergebnisse, mit einem Anstieg in drei und einem Abfall in zwei Experimenten. Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen PHA stimulierten MNC-Ansätzen und Kulturansätzen festgestellt, die in Gegenwart von 400 µl/ml 7F7 mAk inkubiert wurden.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

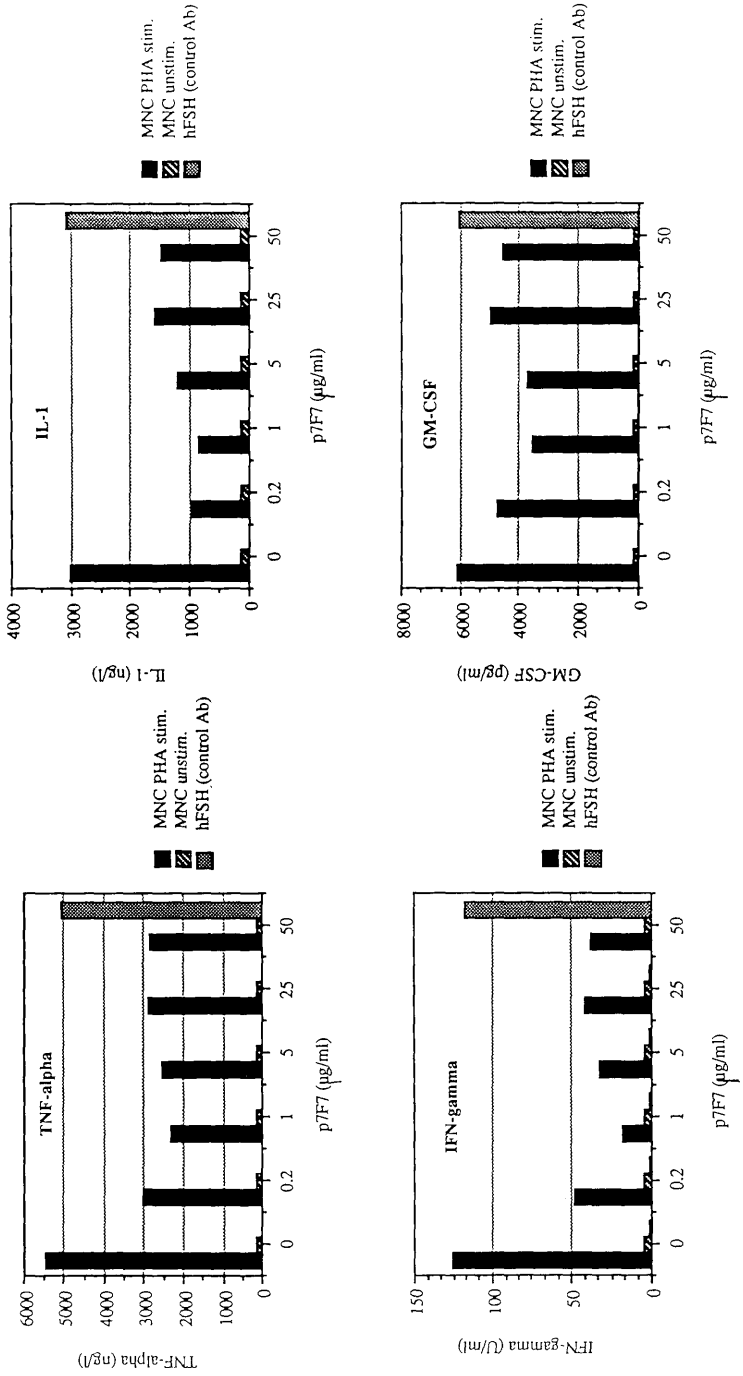

Abb. 1

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

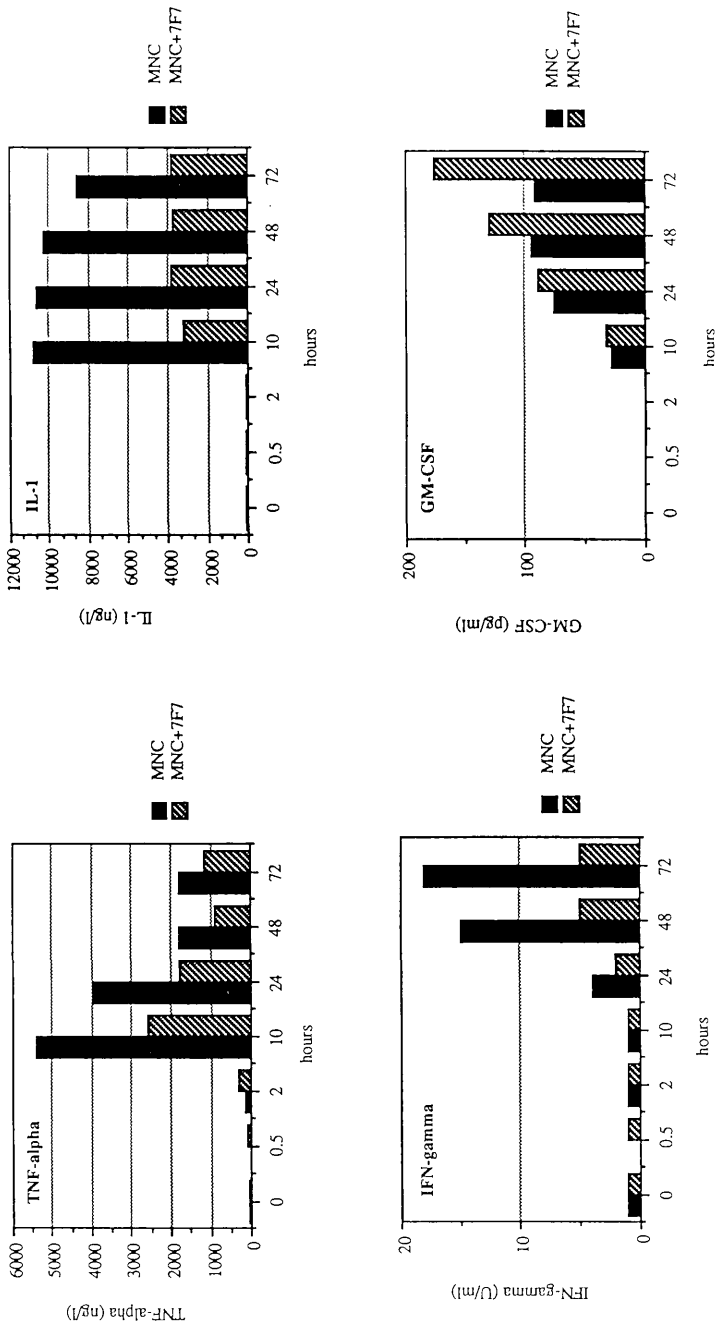

Abb. 2

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

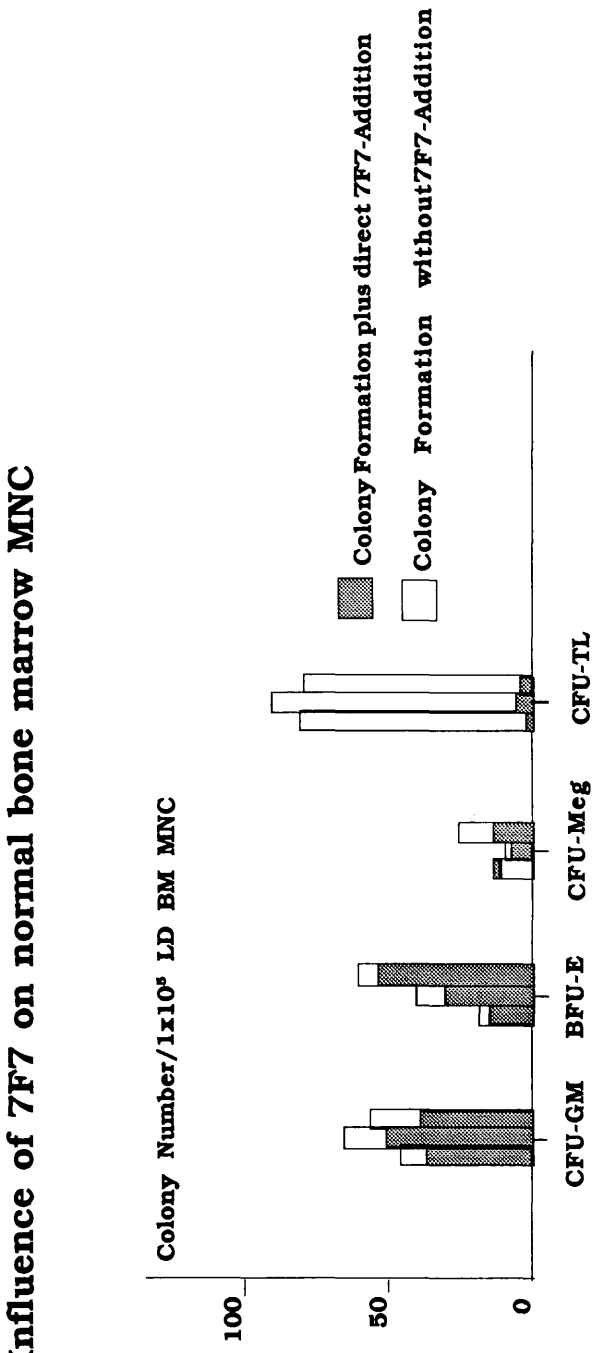

Abb. 3

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

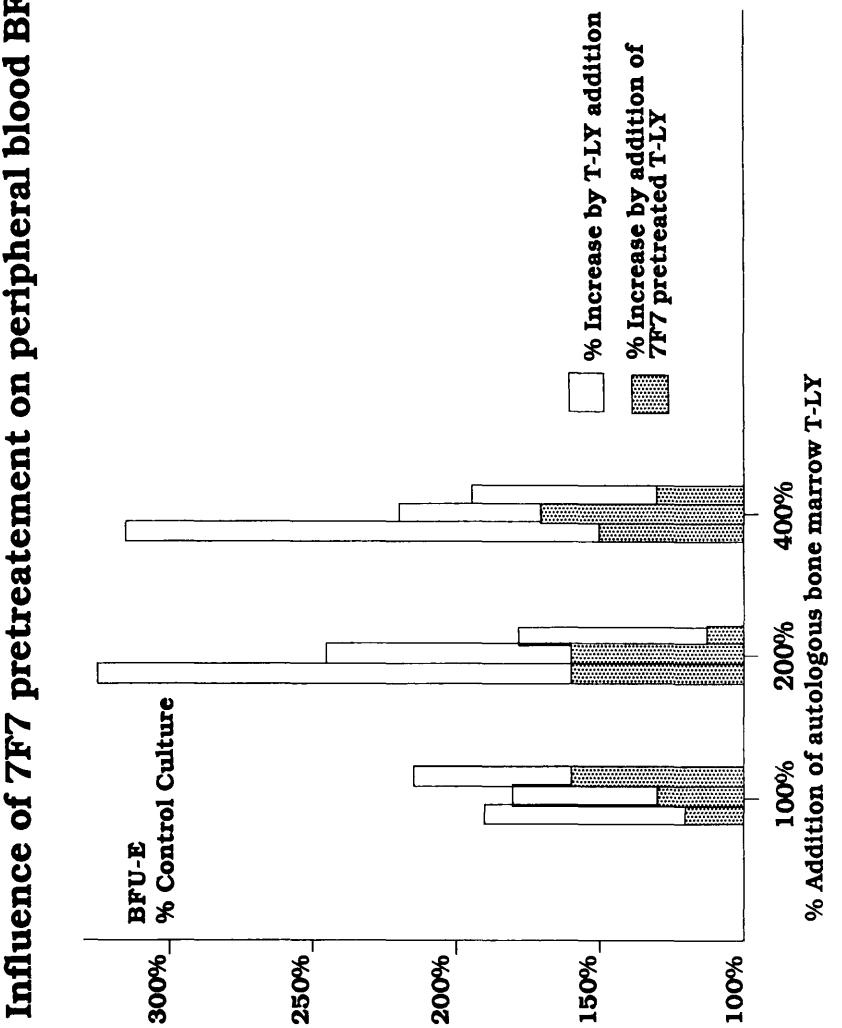

Abb. 4

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Effekt des mAk 7F7 auf die Zytokinfreisetzung durch PHA aktivierte T-Lymphozyten:

Der Effekt von gereinigten 7F7 mAk auf die Zytokinfreisetzung durch aktivierte T-Lymphozyten zeigt sich in einer dosisabhängigen Hemmung von IFN-gamma und TNF-alpha. IL-1, das vorwiegend aus Monozyten stammt, konnte nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, was die Reinheit der E-Rosetten-positiven Zellen unterstreicht. Im Gegensatz zu den MNC Ansätzen, in denen ein maximaler 7F7 Effekt mit einer Konzentration von 1 µg/ml gereinigtem mAk erreicht wurde, zeigt die 7F7 mediierte Zytokininhibition aktivierter T-Lymphozyten klare Dosisabhängigkeit. Die stärkste Hemmung wurde mit 50 µl/ml gereinigtem 7F7 mAk erzielt. Eine signifikante Hemmung ($p < 0,01$) der TNF-alpha- und IFN-gamma-Freisetzung konnte auch mit 400 µl/ml 7F7 Hybridomüberstand erreicht werden, während die Veränderung der GM-CSF-Werte nicht statistisch signifikant waren.

Effekt des mAk 7F7 auf die Zytokinfreisetzung durch unstimulierte MNC- und T-Lymphozyten:

Zugabe steigender Konzentrationen von gereinigtem oder ungereinigtem 7F7 mAk zu unstimulierten MNC- (Abb. 1) oder T-Lymphozytenkulturen führten zu keinen signifikanten Veränderungen der TNF-alpha-, IL-1- oder IFN-gamma-Freisetzung. Die GM-CSF-Werte zeigten einen leichten dosisabhängigen Anstieg. In T-lymphozytären Kulturen kam es zu einem Anstieg von 27 pg/ml in Kulturen ohne 7F7 mAk auf 102 pg/ml in Kulturen mit 50 µg/ml 7F7 mAk. Die Zugabe von 400 µl/ml 7F7 Überstand zu unstimulierten T-Lymphozyten bedingten einen nicht signifikanten Anstieg der GM-CSF-Spiegel. Im Vergleich zu dem GM-CSF-Anstieg, der in PHA aktivierten T-Zellkulturen gemessen werden konnte, war der Anstieg in unstimulierten Kulturen 100mal geringer, was eher für einen unspezifischen Effekt als für eine spezifische antikörpermediierte T-Zellaktivierung spricht.

Zeitverlauf der TNF-alpha, IFN-gamma, IL-1 und GM-CSF-Produktion durch PHA aktivierte MNC: Effekt des mAk 7F7

Abbildung 2 zeigt den Effekt von 400 µl/ml 7F7 mAk Überstand auf die TNF-alpha-, IL-1-, IFN-gamma- und GM-CSF-Produktion PHA aktivierter peripherer MNC. Maximalwerte von TNF-alpha und IL-1 (Abb. 2) wurden nach 10stündiger Inkubation gemessen, wobei der IL-1-Wert bis 72 Stunden hoch blieb und der TNF-alpha-Spiegel konstant abfiel. IFN-gamma und GM-CSF reagierten langsamer und erreichten Höchstwerte nach 48 - 72 Stunden. Die Zugabe des 7F7 mAk bewirkte eine 50 - 80%ige Verminderung der IL-1-, IFN-gamma- und TNF-alpha-Werte. Zu den beobachteten Zeitpunkten zeigten die GM-CSF-Werte heterogene Resultate.

Effekt des mAk 7F7 auf die BFU-E und CFU-TL in Knochenmarksagaransätzen:

Abbildung 3 zeigt, daß durch die Zugabe des mAk 7F7 zu MNC-Ansätzen das normale Wachstum der BFU-E, CFU-GM und CFU-Meg nicht signifikant verändert wurde, doch kam es zu einer signifikanten Unterdrückung der T-lymphzytären Kolonienbildung ($p < 0,01$).

Aufhebung der T-Lymphozyten mediierten Steigerung der BFU-E durch periphere Vorläuferzellen durch 7F7 Vorbehandlung autologer T-Lymphozyten:

Zugabe autologer T-Lymphozyten (100 - 400%) zu Monozyten- und T-Lymphozyten-depletierten Blutzellen in der Gegenwart spezifischer Wachstumsstimulatoren erhöhte

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

die erythrozytäre Kolonienbildung um 20 - 230%. Vorbehandlung der T-Lymphozyten mit dem mAk 7F7 bewirkten eine partielle Aufhebung dieser T-Lymphozyten-mediierten Stimulation (Abb. 4). Eine signifikante Hemmung der erythrozytären Kolonienbildung wurde durch eine 7F7-Vorbehandlung erzielt ($p < 0,01$).

Diskussion

TNFalpha, IL-1 und IFN-gamma sind Zytokine, die eine zentrale Rolle bei der Immunantwort auf Infektion und in der Pathogenese vor Entzündungen spielen. Die Gene für diese Zytokine sind durch die verschiedensten Infektionserreger, darunter auch durch Malariaplasmodien sowie durch unspezifische Stimulatoren mit Lektinen in Monozyten, T-Lymphozyten und Endothelzellen induzierbar (2). Die zentrale Rolle, die TNF-alpha, IL-3, IFN-gamma und GM-CSF in der Pathophysiologie der zerebralen Malaria spielen, konnte durch Experimente mit *Plasmodium berghei* im Mäusemodell gezeigt werden, wo durch Antikörper gegen TNF-alpha, IL-3, GM-CSF und anti IFN-gamma die Entwicklung einer zerebralen Malariamanifestation verhindert werden konnte (16). Auch beim Menschen korrelierte das Auftreten von erhöhten TNF-alpha-Spiegeln mit dem Schweregrad der Malaria (18). Eine Erklärung für die Wichtigkeit von Zytokinen in der Pathophysiologie schwerer Malariamanifestation liegt in der Fähigkeit von TNF-alpha, IFN-gamma und IL-1, die Expressionen von ICAM-1, das als eine der Adhäsionsstrukturen für *Plasmodium falciparum* (3) identifiziert wurde, an T-Lymphozyten, Monozyten und Endothelzellen hinaufzuregulieren (8, 9, 30).

Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Inkubation von PHA-aktivierten MNC- oder T-Lymphozyten mit einem mAk gegen ICAM-1 eine Downregulation der TNF-alpha-, IL-1- und IFN-gamma-Spiegel um 50 - 80% bewirkt. Die prinzipiellen Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen können, wurden ausführlich in einer früheren Arbeit diskutiert (13). Neben einem direkten antikörpermediierten Effekt auf die ICAM-1-Struktur besteht die wahrscheinlichste Erklärung in einer antikörperbedingten Blockade der Adhärenz von T-Lymphozyten und Monozyten. Den blockierenden Effekt des ICAM-1-Antikörpers konnten wir auch in weiteren Versuchen, bei denen wir den Einfluß auf die T-lymphozytäre Kolonienbildung und auf die T-Lymphozyten-mediierte Modulation des Wachstums von im Blut zirkulierenden erythrozytären Vorläuferzellen nachweisen (12). Die Zugabe von anti-ICAM-1 Ak zu PHA-stimulierten peripheren MNC resultierte in einer mehr als 90%igen Reduktion der Zahl von kompakten T-lymphozytären Kolonien. Die durch Zumischung von autologen T-Lymphozyten bedingte Stimulation von zirkulierenden primitiven erythrozytären Vorläuferzellen (BFU-E) konnte durch eine Vorbehandlung der autologen T-Lymphozyten mit dem ICAM-1-Antikörper weitgehend aufgehoben werden.

Diese von uns durchgeführten Untersuchungen stellen die Logistik für neue Strategien in der Malariatherapie dar. Durch einen Antikörper gegen ICAM-1 sollte einerseits die Anhaftung von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten an den ICAM-1-Rezeptor von Endothelzellen blockiert werden, andererseits ist der Antikörper in der Lage, die Zytokinfreisetzung herabzusetzen und damit die Expression neuer Adhäsionsstrukturen zu vermindern. In Analogie zu den von uns durchgeführten Antikörperversuchen wäre auch die Anwendung von löslichen ICAM-1-Molekülen und eine dadurch bedingte Verhinderung der Anhaftung an Endothelzellen als therapeutisches Prinzip denkbar. In vitro-Versuche, in denen die Wirksamkeit unseres ICAM-1-Antikörpers auf die Anhaftung von *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten an Endothelzellen evaluiert wird, sind in Vorbereitung. Die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte wird vor allem durch die steigende Zahl von Chloroquin- und Mefloquin-resistenten Malariaparasiten notwendig.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Zusammenfassung

Die Anhaftung *Plasmodium falciparum*-infizierter Erythrozyten an Endothelzellen und eine dadurch bedingte Okklusion von Kapillaren ist von entscheidender pathophysiologischer Bedeutung bei der Entwicklung lebensbedrohlicher Komplikationen bei Malariainfektionen. CD36, Thrompospondin und ICAM-1 wurden als Adhäsionsstrukturen für mit *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten charakterisiert. Zytokine wie TNF-alpha, IL-1 und IFN-gamma bewirken eine Erhöhung der ICAM-1-Expression an Endothelzellen. Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Inkubation von PHA-aktivierten MNC oder T-Lymphozyten mit einem mAk gegen ICAM-1 eine Downregulation der TNF-alpha-, IL-1- und IFN-gamma-Spiegel um 50 - 80% bewirkt. Den adhäsionsblokkierenden Effekt des ICAM-1-Antikörpers konnten wir weiters durch Versuche, bei denen wir den Einfluß auf die T-lymphozytäre Kolonienbildung und auf die T-Lymphozyten-mediierte Modulation des Wachstums von im Blut zirkulierenden erythrozytären Vorläuferzellen untersuchten, nachweisen. Diese von uns durchgeführten Untersuchungen stellen die Logistik für neue Strategien in der Malariatherapie dar. Durch einen Antikörper gegen ICAM-1 kann einerseits die Anhaftung von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten an den ICAM-1-Rezeptor von Endothelzellen blockiert werden, andererseits ist der Antikörper in der Lage, die Zytokinfreisetzung herabzusetzen und damit die Expression neuer Adhäsionsstrukturen zu vermindern.

Schlüsselwörter

Plasmodium falciparum, Adhäsionsstrukturen, ICAM-1, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-1.

Summary

Adhesion structures of *Plasmodium falciparum:* Importance of the ICAM-1 structure for the cytokine release associated with infection (IL-1, TNF-alpha, GM-CSF, IFN-gamma)

The attachment of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to endothelial cells and the so caused occlusion of capillaries is an important pathophysiological mechanism in the development of life-threatening complications in acute *Plasmodium falciparum* infection in humans. CD36, Thrombospondin and ICAM-1 are the three identified receptors for *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Cytokines like TNF-alpa, IL-1 and IFN-gamma are able to upgrade the ICAM-1 expression on endothelial cells. Our experiments showed that incubation of PHA activated MNC or T-lymphocytes with an anti-ICAM mAb causes a reduction of TNF-alpha, IL-1 and IFN-gamma release of 50 - 80%. The adhesion blocking effect of the anti-ICAM mAb has further been shown in experiments investigating the influence of this mAb on T-lymphocytic colony formation (CFU-TL) and the T-lymphocyte mediated modulation of the early erythrocytic colony formation (BFU-E) by peripheral blood precursor cells. Our experiments represent the basis for new potential treatment modalities. We postulate that the anti-ICAM Ab exerts its effect in two ways: by specifically blocking the adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to the ICAM-1 receptor of endothelial cells and by reducing the cytokine release and thereby the expression of new adhesion structures.

Key words

Plasmodium falciparum, adhesion structures, ICAM-1, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-1.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Legende

Abb. 1:

Hemmung der Zytokinfreisetzung durch PHA-stimulierte und unstimulierte MNC: TNF-alpha, IL-1, IFN-gamma, GM-CSF. Zugabe steigender Konzentrationen (0; 0,2; 1; 5; 25; 50 µg/ml) gereinigten 7F7 mAks zu Flüssigkulturen ($1X10^6$MNC/ml). Die Kulturüberstände wurden nach 48 Stunden zur Zytokinbestimmung gesammelt. Ein mAk gegen hFSH wurde als Kontrollantikörper verwendet.

Abb. 2:

Zeitverlauf der TNF-alpha-, IFN-gamma-, IL-1- und GM-CSF-Produktion durch PHA-aktivierte MNC: Hemmung durch den mAk 7F7 (400 µl/ml mAk 7F7 Hybridomüberstand; $1X10^6$MNC/ml). Die Kulturüberstände wurden nach 0; 0,5; 2; 10; 24; 48 und 72 Stunden gesammelt.

Abb. 3:

Einfluß von mAk 7F7 (400 µl/ml mAk 7F7 Hybridomüberstand) auf das Wachstum granuolzytärer (CFU-GM), primitiver erythrozytärer (BFU-E) und megakaryzytärer (CFU-Meg) Vorläuferzellen und auf die T-lymphozytäre Kolonienbildung (CFU-TL). Signifikante Unterdrückung der CFU-TL ($p > 0,01$).

Abb. 4:

Einfluß einer 7F7 Vorbehandlung autologer T-Lymphozyten auf das Wachstum zirkulierender primitiver erythrozytärer Vorläuferzellen (BFU-E). Signifikante Hemmung der durch autologe T-Lymphozyten induzierten Proliferationssteigerung der BFU-E durch Vorinkubation (400 µl/ml 7F7 mAk Hybridomüberstand).

Literatur

1. AIKAWA, M. (1988):
   Human cerebral malaria.
   Am. J. Trop. Med. Hyg. 39, 3-9.

2. BALKWILL, F. R.:
   Cytokines in cancer therapy. Understanding and exploiting the cytokine network.
   Oxford University Press 1989.

3. BERENDT, A. R., SIMMONS, D., TANSEY, J., NEWBOLD, C. K., MARSH, K. (1989):
   Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is an endothelial cytoadherence receptor for Plasmodium falciparum.
   Nature 341, 57-59.

4. BERNSTEIN, I. D., ANDREWS, R. G., COHEN, S. F., McMASTER, B. E. (1982):
   Normal and malignant human myelocytic and monocytic cells identified by monoclonal antibodies.
   J. Immunol. 128, 876-881.

5. BÖYUM, A. (1974):
   Seperation of blood leukocytes and lymphocytes.
   Tissue Antigens 4, 269-271.

6. DEL GIUDICE, G., GRAU, G. E., LAMBERT, P.-H. (1988):
   Host responsiveness to malaria epitopes and immunopathology.
   Prog. Allergy 41, 288-297.

7. DOUGHERTY, G. J., MURDOCH, S., HOGG, N. (1988):
   The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response.
   Eur. J. Immunol. 18, 35-42.

8. DUSTIN, M. L., ROTHLEIN, R., BHAN, A. K., DINARELLO, C. A., SPRINGER, T. A. (1986):
   Induction by IL-1 and interferon, tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1).
   J. Immunol. 137, 245-254.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

9. DUSTIN, M. L., SINGER, K. H., TUCK, D. T., SPRINGER, T. A. (1988):
Adhesion of T-lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon-gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1).
J. Exp. Med. 167, 1323-1340.

10. DUSTIN, M. L., SPRINGER, T. A. (1988):
Lymphocyte function-associated antigen-1 LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells.
J. Cell. Biol. 107, 321-331.

11. FINLEY, R. W., MACKEY, L. J., LAMBERT, P.-H. (1982):
Virulent P berghei malaria: Prolonged survival and decreased cerebral pathology in cell-deficient nude mice.
J. Immunol. 129, 2213-2219.

12. GEISSLER, D., GAGGL, S., MÖST, J., SCHULZ, T., DIERICH, M. P. (1990):
Involvement of intercellular adhesion molecules (ICAM-1) in the proliferative control of haematopoietic progenitor cells.
Submitted for publication.

13. GEISSLER, D., GAGGL, S., MÖST, J., GREIL, R., HEROLD, M., DIERICH, M. P. (1990):
A monoclonal antibody directed against the human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) modulates the release of TNF-alpha, IFN-gamma and IL-1.
Eur. J. Immunol. in press.

14. GEISSLER, D., LU, L., BRUNO, E., YANG, H., BROXMEYER, H. E., HOFFMAN, R. (1986):
The influence of T lymphocyte subsets and humoral factors on colony formation by human bone marrow and blood megakaryocyte progenitor cells in vitro.
Immunol. 137, 2508-2513.

15. GRAU, G. E., FAJARDO, L. F., PIGUET, P.-F., ALLET, B., LAMBERT, P.-H., VASSALLI, P. (1987):
Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria.
Science 237, 1210-1212.

16. GRAU, G. E., HEREMANS, H., PIGUET, P.-F., POINTAIRE, P., LAMBERT, P.-H., BILLIAUA, A., VASSALLI, P. (1989):
Monoclonal antibody against interferon-gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5572-5581.

17. GRAU, G. E., PIGUET, P.-F., ENGERS, H. D., LOUIS, J. A., VASSALLI, P., LAMBERT, P.-H. (1986):
T-lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria.
J. Immunol. 137, 2348-2353.

18. GRAU, G. E., TAYLOR, T. E., MOLYNEUX, M. F., WIRIMA, J. J., VASSALLI, P., HOMMEL, M., LAMBERT, P.-H. (1989):
Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria.
N. Engl. J. Med. 320, 24, 1586-1591.

19. HOWARD, R. J. (1988):
Malarial proteins at the membrane of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and their involvement in cytoadherence to endothelial cells.
Prog. Allergy 41, 98-106.

20. KNOWLES, D. M., TOLIDJIAN, B., MARBOE, C., D'AGATI, V., GRIMES, M., CHESS, L.:
Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM1 and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium.
J. Immunol. 132, 2170-2176.

21. LANNERS, H. N., TRAGER, W. (1984):
Comparative infectivity of knobless and knobby clones of Plasmodium falciparum in splenectomized and intact Aotus trivirgatus monkeys.
Z. Parasitenkd. 70, 739-748.

22. LAWLWER, J. (1986):
Thrombospondin.
J. Am. Soc. Hematol. 67, 1197-1209.

23. LAWLER, J., HYNES, R. O. (1986):
The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and hologies with several different proteins.
J. Cell Biol. 103, 1635-1644.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

24. MacPHERSON, G. G., WARRELL, M. J., LOOAREESUWAN, S., WARRELL, D. A. (1985): Human cerebral malaria: A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. Am. J. Pathol. 119, 385-392.

25. MAKGOBA, M. W., SANDERS, M. E., GINTHER-LUCCE, G. E., GUGEL, E. A., DUSTIN, M. L., SPRINGER, T. A., SHAW, S. (1988): Functional evidence that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for LFA-1-dependent adhesion in T-cell mediated cytotoxicity. Eur. J. Immunol. 18, 637-640.

26. MESSNER, H. A., TILL, J. E., McCULLOCH, E. A. (1983): Interacting cell populations affecting granulopoietic colony formation by normal and leukemia marrow cells. Blood 42, 710- 714.

27. OCKENHOUSE, C. F., TANDON, N. N., MAGOWAN, C., JAMIESON, G. A., CHULAY, J. D. (1989): Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor. Science 243, 1469-1472.

28. OQUENDO, P., HUNDT, E., LAWLER, J., SEED, B. (1989): CD 36 directly mediates cytoadherence of plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. Cell, 58-62.

29. ROBERTS, D. D., SHERWOOD, J. A., SPITALNIK, S. L., PANTON, L. J., HOWARD, R. J., DIXIT, V. M., FRAZIER, W. A., MILLER, L. H., GINSBURG, V. (1985): Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. Nature 318, 64-66.

30. ROTHLEIN, R., CZALKOWSKI, M., O'NEILL, M. M., MARLIN, S. D., MAINOLFI, E., MERLUZZI, V. J. (1988): Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by proinflammatory cytokines. J. Immunol. 141, 1665-1669.

31. ROTHLEIN, R., DUSTIN, M. L., MARLIN, S. D., SPRINGER, T. A. (1986): A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. J. Immunol. 137, 1270-1274.

32. SCHULZ, T. F., MITTERER, M., NEUMAYR, H. P., VOGETSEDER, W., DIERICH, M. P. (1988): Involvement in the initiation of T-cell responses and structural features of an 85 kD membrane activation antigen. Eur. J. Immunol. 18, 1253-1258.

33. SCHULZ, T. F., VOGETSEDER, W., MITTERER, M., NEUMAYR, H. P., MYONES, B. L., STAUDER, R., GREIL, R., BÖCK, G., FEICHTINGER, H., HUBER, H., DIERICH, M. P. (1988): Importance of an 85 kD membrane glycoprotein for a variety of cell-cell interactions. Mol. Immunol. 25, 1053-1061.

34. SIMMONS, D., MAKGOBA, M. W., SEED, B. (1988): ICAM, an adhesion ligand for LFA-1, is homologous to the neutral cell adhesion molecule NCAM. Nature 331, 624-627.

35. STAUNTON, D. E., MARLIN, S. D., STRATOWA, C., DUSTIN, M. L., SPRINGER, T. A. (1988): Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. Cell 52, 925-933.

36. STAUNTON, D. E., MERLUZZI, V. J., ROTHLEIN, J., BARTON, R., MARLIN, S. D., SPRINGER, T. A. (1989): A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. Cell 56, 849-853.

37. THAITHONG, S., BEALE, G. H., FENTON, B., McBRIDE, J., ROSARIO, V., WALKER, A., WALLIKER, D. (1984): Clonal diversity in a single isolate of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 242-251.

KORRESPONDENZADRESSE:

Prim. Univ. Doz. Dr. Dietmar Geissler
I. Med. Abteilung Landeskrankenhaus Klagenfurt

St. Veiter Straße 47
A-9020 Klagenfurt · Austria

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: 13

Autor(en)/Author(s): Geissler Dietmar, Gaggl Sabine

Artikel/Article: Adhäsionsstrukturen für Plasmodium falciparum. Relevanz der ICAM-1 -Struktur im Rahmen der infektassoziierten Zytokinfreisetzung (IL-1, TNF-alpha, GM-CSF, IFN-gamma). 245-258