

# **Bedeutung der Myeloperoxidase für die Parasiteneliminierung und Endothelfunktion bei der Malaria**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im  
Fachbereich Chemie, Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Wiebke Katharine Theeß**

Hamburg 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig
2. Gutachter: PD Dr. Jakob Cramer

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	mikromolar
$\pi$	mathematische Konstante ( $\pi = 3,14159\dots$ )
$\vartheta_B$	Blutfluss
$\bar{v}$	mittlere RBZ-Geschwindigkeit
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ACT	Artemisinin-basierte Kombinationstherapie
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
$\text{Br}^-$	Bromid
BZR	B-Zellrezeptor
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre ( <i>copy</i> ) DNA
cGMP	cyclisches-Guanosinmonophosphat
$\text{Cl}^-$	Chlorid
cm	Zentimeter
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
Ct	<i>cycle treshold</i>
d	Gefäßdurchmesser
DAMPs	<i>damage-associated molecular pattern</i>
$\text{dH}_2\text{O}$	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat

DPBS	Dulbecco's PBS
dT	Desoxythymidin
DTG	Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und internationale Gesundheit
DZ	dendritische Zelle
ELISA	<i>enzyme-linked absorbant assay</i>
eNOS	endotheliale NOS
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alli</i> )
EZM	experimentelle zerebrale Malaria
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
Fc	Antikörperfragment ( <i>crystallisable fragment</i> )
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Schwerkraft (in Zusammenhang mit der Messung der isometrischen Spannung) bzw. Gramm (in Zusammenhang mit der Einwaage der chemischen Substanzen)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GHS	Global harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien ( <i>Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals</i> )
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GR-1	<i>granulocyte-differentiation antigen-1</i>
H-Sätze	<i>Hazard Statements</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HOBr	hypobromige Säure
HOCl	hypochlorige Säure
HOI	hypoiodige Säure
HOI	hypoiodige Säure
HOSCN	Hypothiocyansäure
I <sup>-</sup>	Iodid
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NOS
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	<i>low density</i> Lipoprotein
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6-C	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus C</i>
Ly6-G	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>
M	molar
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
ml	Milliliter
mm	Milliliter
mM	millimolar
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl der Proben
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindiunkleotidphosphat
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX4	Gen für die NADPH-Oxidase 4

Nr.	Nummer
NTG	Glyceroltrinitritat
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidradikal-Anion
<i>P</i>	<i>Plasmodium</i>
P-Sätze	<i>Precautionary Statements</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
<i>PbA</i>	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank in Europe</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PerCP	<i>peridinin-chlorophyll-protein</i>
PfEMP-1	<i>P. falciparum erythrocyte membrane protein-1</i>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
pH	negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pmol	Pikomol
pRBZ	parasitierte rote Blutzellen
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
<i>PyNL</i>	<i>Plasmodium yoelii</i> , nicht letal
R	Radikalintermediate
RAG	<i>recombination activation gene</i>
RBZ	rote Blutzellen
RH	biologische Substrate
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SEM	Standardfehler

SSC	<i>side scatter</i>
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion protein-1</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp
ZM	zerebrale Malaria

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Malaria .....	1
1.1.1 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i> .....	2
1.1.2 Die Pathogenese der Malaria .....	3
1.2 Die Immunantwort bei der Malaria .....	6
1.2.1 Das Immunsystem.....	6
1.2.2 Die Reaktion des Immunsystems bei <i>Plasmodium</i> -Infektionen .....	8
1.3 Der neutrophile Granulozyt.....	10
1.4 Die Myeloperoxidase (MPO) .....	12
<b>2. Material</b> .....	<b>18</b>
2.1 Laborgeräte .....	18
2.2 Glas- und Plastikware .....	19
2.3 Chemikalien .....	19
2.4 Mäusestämme .....	20
2.5 <i>Plasmodium</i> -Stämme.....	20
2.6 Material für tierversuchsbezogene Arbeiten .....	20
2.7 Material für zellbiologische Arbeiten .....	21
2.8 Material für biochemische Arbeiten.....	22
2.9 Material für molekularbiologische Arbeiten.....	23
2.10 Antikörper und fluoreszierende Reagenzien .....	23
2.11 Software.....	24
<b>3. Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1 Tierversuche .....	25
3.1.1 Mäuse .....	25
3.1.2 Infektion mit PyNL .....	25
3.1.3 Infektion mit PbA .....	25
3.1.4 Bestimmung des Milz/Tibia-Quotienten.....	26
3.1.5 Bestimmung der Parasitämie in der Milz.....	26
3.1.6 Bestimmung der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Vasodilatationsfähigkeit im Organbad .....	26
3.1.7 Intravitalmikroskopische Analyse der pRBZ-Adhäsion und des Blutflusses in den Blutgefäßen des Ohres.....	28

3.1.8 Depletion von Neutrophilen durch Antikörper .....	30
3.2 Zellbiologische Methoden .....	30
3.2.1 Aufreinigung von Milzzellen .....	30
3.2.2 Durchflusszytometrie .....	30
3.3 Biochemische Methoden .....	32
3.3.1 MPO-Konzentrationsbestimmung von humanen und murinen Plasmaproben mittels <i>enzyme-linked absorbant assay</i> (ELISA).....	32
3.3.2 Nitrat/Nitrit-Bestimmung aus dem Plasma.....	33
3.3.3 Messung von Zytokinkonzentrationen durch <i>Cytrometric Bead Array</i> (CBA) .	33
3.4 Molekularbiologische Methoden.....	34
3.4.1 Isolation von <i>messenger RNA</i> (mRNA) aus Herz und Lunge.....	34
3.4.2 Komplementäre DNA (cDNA)-Synthese .....	34
3.4.3. Quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	35
3.5 Statistische Analysen.....	35
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
4.1 Bedeutung der MPO für die Malariainfektion .....	36
4.1.1 Bestimmung der MPO-Plasmaspiegel bei der <i>P. falciparum</i> -Infektion .....	36
4.1.2 Bestimmung der MPO-Plasmaspiegel bei <i>PyNL</i> -infizierten WT-Mäusen.....	37
4.1.3 Auswirkungen der MPO-Defizienz auf den Infektionsverlauf von <i>PyNL</i> .....	37
4.2 Einfluss der MPO auf die Endothelfunktion und Mikrozirkulation .....	39
4.2.1 Auswirkung der MPO-Defizienz auf die Inzidenz von EZM.....	39
4.2.2 Einfluss der MPO-Defizienz auf die NO abhängige Relaxation der Aorta .....	40
4.2.3 Einfluss der MPO-Defizienz auf die Mikrozirkulation und Adhäsion von pRBZ an die Gefäßwand .....	42
4.3 Einfluss der MPO auf die Immunantwort gegen <i>PyNL</i> .....	45
4.3.1 Einfluss eines neutrophilendepletierenden Antikörpers auf den Infektionsverlauf von <i>PyNL</i> .....	45
4.3.2 Die Rolle von NO und der NADPH-Oxidase während der Infektion mit <i>PyNL</i> . 46	
4.3.3 Bedeutung der MPO-Defizienz in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems auf den Infektionsverlaufes von <i>PyNL</i> .....	48
4.3.4 Bestimmung der inflammatorischen T-Zellantwort gegen <i>PyNL</i> .....	49
4.3.5 Einfluss eines neutrophilendepletierenden Antikörpers auf die inflammatorische T-Zellantwort.....	51

<b>5. Diskussion</b> .....	<b>54</b>
5.1 Bedeutung der MPO für die Malariainfektion .....	54
5.2 Einfluss der MPO auf die Endothelfunktion und Mikrozirkulation .....	57
5.3 Einfluss der MPO auf die Immunantwort gegen PyNL .....	61
5.4 Ausblick .....	68
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>70</b>
<b>7. Abstract</b> .....	<b>72</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
<b>9. Anhang</b> .....	<b>81</b>
<i>Gefahrenstoffverzeichnis</i> .....	81
<i>Curriculum Vitae</i> .....	85
<i>Publikationen</i> .....	87
<i>Eidesstattliche Versicherung</i> .....	88
<i>Danksagung</i> .....	89

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Malaria

Weltweit ist die Malaria eine der am weitesten verbreiteten tropischen Infektionskrankheiten. Pro Jahr erkranken über 200 Millionen Menschen, wobei bis zu 3,4 Milliarden Menschen in Endemiegebieten gefährdet sind (Abb. 1.1). Die Malariaerkrankungen beim Menschen können durch Infektion mit fünf verschiedenen *Plasmodium*-Parasitenstämmen ausgelöst werden: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi*, davon sind *P. falciparum* und *P. vivax* die Bedeutendsten. In den letzten Jahren wurden das Finanzierungsvolumen und die Bemühungen, die Infektionsrate und Transmission zu verringern, stark ausgeweitet, indem Maßnahmen im Rahmen eines Präventionsprogrammes durchgeführt wurden. Diese Maßnahmen sind unter anderen: Vektorkontrolle durch mit Insektizid imprägnierte Bettnetze und Besprühung von Innenräumen mit Insektenspray, intermittierende präventive Behandlung (*intermittent preventive treatment = IPT*) von Schwangeren und Kleinkindern, Verbesserung der Malariadiagnostik sowie zügige Behandlung mit antiparasitären Arzneimitteln. Trotz dieser Bemühungen veröffentlichte die *World Health Organisation (WHO)* für das Jahr 2012 noch eine gemittelte Anzahl von 627.000 gemeldeten Todesfällen. 90% davon ereigneten sich in Afrika und betrafen überwiegend Kinder unter 5 Jahren [1].

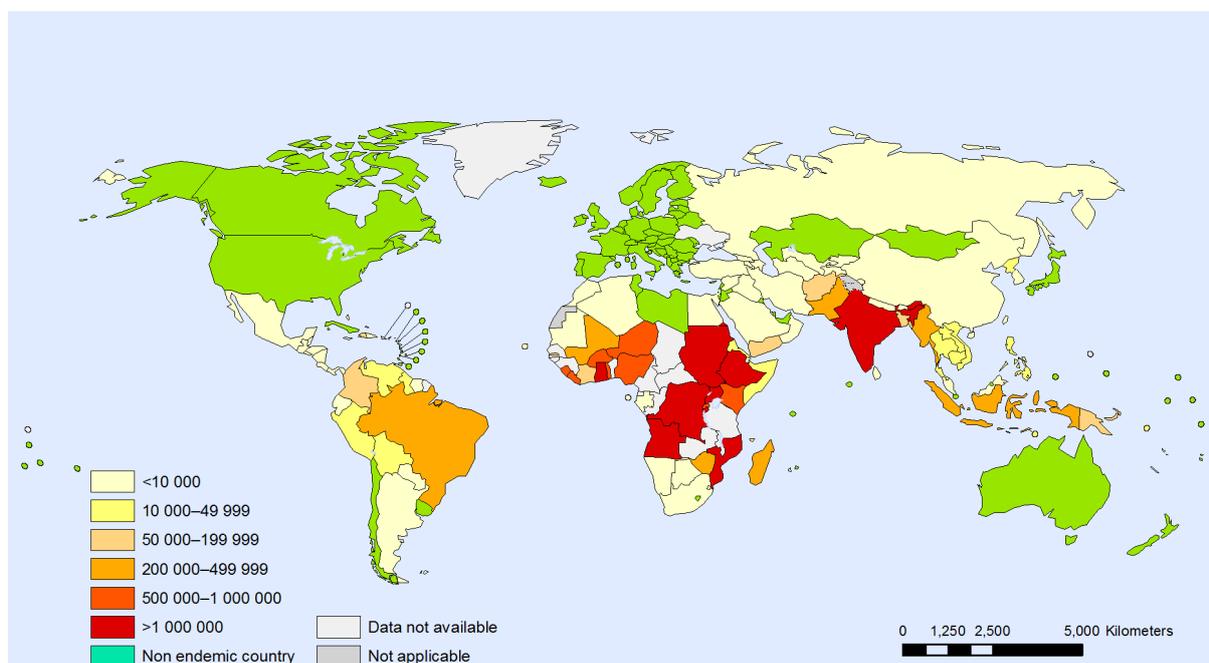


Abb. 1.1: Verteilung der bestätigten Malariafälle im Jahr 2010 (WHO 2010)

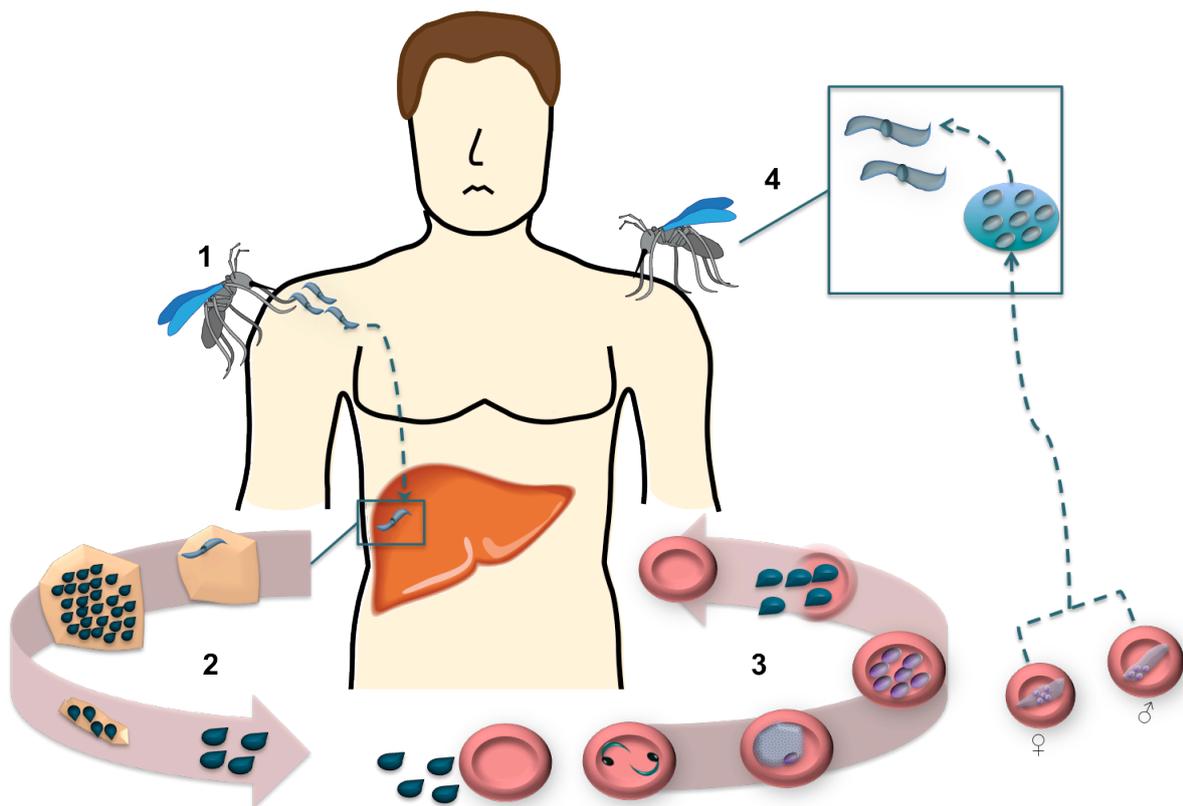
Der Großteil dieser Mortalität ist dabei durch *P. falciparum* bedingt. Lozano *et al.* berechneten mit einer mathematischen Modellierung hingegen sogar eine weitaus höhere Anzahl von Todesfällen, die für 2010 bei 1,17 Millionen Todesfällen lag [2]. Als Goldstandard in der Behandlung der Malaria gilt die Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT). Jedoch traten im Einzugsgebiet des Mekong (Kambodscha, Myanmar, Thailand und Vietnam) bereits erste Anzeichen für eine reduzierte Wirksamkeit der ACT-Behandlung auf. Seit einigen Jahren wird außerdem intensiv an der Entwicklung einer Malariavakzine gearbeitet. Zurzeit befinden sich mehrere Vakzinkandidaten in klinischen Studien der Phase-1 oder -2. Nur ein Vakzinkandidat, die RTS,S/AS01-Vakzine, ist in einer klinischen Studie der Phase-3 zu finden. Allerdings liegt dort die Effektivität überwiegend unter 50 Prozent. Neue chemotherapeutische Alternativen werden daher dringend benötigt [1].

### **1.1.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium***

Der Malariaerreger wird durch die weibliche *Anopheles*-Mücke auf den Wirt übertragen und durchläuft im Menschen verschiedene Entwicklungsstadien. Bei einer Blutmahlzeit gelangen Sporozoiten, die infektiösen Stadien der Plasmodien, durch den Stich der Mücke direkt in die Blutbahn. Über den Blutkreislauf erreichen die Sporozoiten die Leber, wo sie zunächst mehrere Hepatozyten durchwandern bevor sie in der Zielzelle eine parasitäre Vakuole bilden. Je nach *Plasmodium*-Spezies entwickelt sich innerhalb von 2-16 Tagen der Sporozoit in dem Hepatozyten zu Tausenden von Merozoiten. Dieses Entwicklungsstadium wird als Leberphase bezeichnet. Im Anschluss werden die Merozoiten über die Bildung von Vesikeln (Merosomen) in das Lumen der Lebersinusoiden entlassen [3]. Der Merozoit kann daraufhin im Blut zirkulierende rote Blutzellen (RBZ) befallen und sich in diesen alle zwei Tage in bis zu 20 neuen Merozoiten vermehren. Nach Ruptur der parasitierten RBZ (pRBZ) gelangen diese Merozoiten in den Blutstrom und es kann ein neuer Replikationszyklus beginnen (Blutphase).

Ein kleiner Prozentsatz der asexuellen Blutphaseparasiten entwickelt sich in dem Zyklus zur sexuellen Form, den Gametozyten, welche eine Mücke bei der nächsten Blutmahlzeit infizieren können. Im Mitteldarm der Mücke vereinigen sich die beiden Geschlechtsformen der Gametozyten und entwickeln sich zum Ookineten, der das Epithel des Mitteldarms durchdringt und in die Hämolymphe übergeht. Dort wird eine

Oozyste, bestehend aus Tausenden von Sporozoiten, gebildet. Diese wandern daraufhin in die Speicheldrüsen, aus denen sie bei einer weiteren Blutmahlzeit wieder in den Zwischenwirt gelangen können [4]. In der Blutphase unterscheidet sich *P. vivax* bei der Gametozytenentwicklung von *P. falciparum* dadurch, dass die Entwicklung schon beginnt, wenn noch keine klinischen Symptome auftreten, was eine erhöhte Übertragung zur Folge hat [5].



**Abb. 1.2: Lebenszyklus des Malariaerregers**

Durch den Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke gelangen die infektiösen Sporozoiten in die Blutbahn, über die sie zur Leber transportiert werden (1). Nach Durchwanderung mehrerer Leberzellen infiziert der Sporozoit einen Hepatozyten und vermehrt sich asexuell zu Tausenden von Merozoiten, die anschließend ins Blut übergehen (2). Dort infizieren die Merozoiten RBZ und replizieren sich zu neuen Merozoiten (3). Ein Teil der Merozoiten differenziert sich weiter zu Gametozyten, die bei einem weiteren Stich von der *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden können. In Mückenmitteldarm findet daraufhin der sexuelle Vermehrungszyklus statt, wobei am Ende wieder infektiöse Sporozoiten entstehen (4).

### 1.1.2 Die Pathogenese der Malaria

Während der Leberphase der Malariainfektion treten noch keine Symptome auf. Diese entstehen erst nach Ruptur der pRBZ und der Freilassung von Merozoiten, da die freigesetzten Parasitenproteine zu einer inflammatorischen Immunantwort führen, die sich in Fieberschüben äußert. Solche Fieberschübe treten in einer synchronisierten Infektion immer nach Vollendung eines Blutphasezyklus auf. Dieser hat bei *P. falciparum*

und *P. vivax* eine Dauer von ungefähr 48 Stunden und bei *P. malariae* von 72 Stunden. Es können aber auch gemischte Infektionen zweier Plasmodium-Stämme auftreten, so dass kein charakteristischer Fieberzyklus zu beobachten ist und die Unterscheidung zu anderen Infektionskrankheiten ohne weiterführende Diagnostik schwierig macht [6].

Ein Großteil der durch Malaria bedingten Todesfälle ist durch die *P. falciparum*-Infektion verursacht, welche zu lebensbedrohlicher komplizierter Malaria führen kann. Eine komplizierte Malaria wird als komplexes Syndrom beschrieben, das viele Organsysteme beeinträchtigen kann, und mit vielen Merkmalen einer Sepsis übereinstimmt [7]. Symptome einer komplizierten Malaria sind unter anderem Koma und Krämpfe (zerebrale Malaria), Schock und durch Anämie bedingte Atemnot [7,8]. Ein für die Pathophysiologie der Malaria bedeutendes charakteristisches Merkmal ist die Fähigkeit von pRBZ, an das Endothel sowie an nicht infizierte RBZ zu binden. Hierdurch unterscheidet sich *P. falciparum* von den anderen humanen Malariastämmen. Während der Blutphase durchläuft der in die RBZ eingedrungene Merozoit verschiedene Stadien: Ringform, Trophozoit und Schizont. In der Blutzirkulation von mit *P. falciparum* infizierten Patienten sind allerdings oft nur die Ringformen zu finden. Die pRBZ, bei denen der Parasit im Trophozoiten- oder Schizontenstadium ist, vermögen über die Bindungen zum Endothel in der Peripherie zu verbleiben und entgehen dadurch einer Eliminierung in der Milz. Diesen Vorgang fasst man mit der Bezeichnung der Sequestration zusammen. Die Oberfläche der pRBZ ist von noppenartigen Auswölbungen bedeckt, welche an Endothel- und Immunzellen binden können. Auf der Oberfläche dieser pRBZ exprimiertes *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP-1) gilt als Schlüsselligand für diese Interaktion mit dem Endothel [9]. PfEMP-1 wird von den *var*-Genen kodiert, hat eine hohe Antigenvariabilität und kann an Wirtszellrezeptoren wie CD36, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)-1 binden. Die für PfEMP-1 kodierende *var*-Gene sind eine Familie an variablen Genen im Parasitengenom von *P. falciparum* [10]. Außer der Bindung ans Endothel können pRBZ auch an nicht infizierte RBZ binden. Die gebildete Zellanhäufung sieht im Mikroskop aus wie eine Blume und wird daher auch Rosettenbildung genannt. In die Rosettenbildung involvierte RBZ-Rezeptoren sind Heparansulfat-ähnliche Glykosaminoglykane, ABO-Blutgruppenantigene und Komplementrezeptor-1. Des Weiteren sind auch verschiedene Serumproteine an der Rosettenbildung beteiligt [11]. Diese unter den humanpathogenen Plasmodium-

Stämmen einzigartige Fähigkeit von *P. falciparum*-pRBZ an RBZ und das Endothel zu binden wird als ursächlicher Mechanismus dafür postuliert, dass durch eine *P. falciparum*-Infektion der Großteil der durch Malaria verursachten Todesfälle bedingt ist.

Die Interaktion zwischen pRBZ, RBZ und Endothel kann zu Mikrozirkulationsstörungen und nachfolgend klinischen Komplikationen führen. Eine starke Sequestration ist dabei im subkutanen Fett, im Darm, der Niere und im Gehirn zu finden. Letzteres trägt zur Entstehung der lebensbedrohenden zerebralen Malaria bei [12]. Eine Verschlechterung der Mikrozirkulation wird zudem durch die verminderte Deformierbarkeit von *P. falciparum*-pRBZ hervorgerufen. Diese ist bedingt durch die Veränderung der pRBZ-Membran, eine erhöhte intrazelluläre Viskosität und einen wenig verformbaren Parasiten. Geht die Fähigkeit zur Deformierung verloren, können sich die pRBZ nicht mehr wie naive RBZ strecken, um kleine Kapillaren zu durchqueren, deren Durchmesser geringer ist. Dadurch kann es zur Obstruktion kleiner Blutgefäße kommen [13]. Eine verschlechterte Deformierbarkeit ist aber nicht nur bei pRBZ zu beobachten, sondern auch bei nicht parasitierten RBZ im Vergleich zu naiven RBZ [14]. Als Ursache wird eine erhöhte Oxidation der Membran von nicht parasitierten RBZ vermutet, da aufgrund einer inadäquaten antiparasitären Immunantwort des Wirtes ein verstärktes oxidatives Milieu entsteht [15]. Eine schlechte Deformierbarkeit der pRBZ führt aber nicht nur zur Verschlechterung der Pathogenese sondern erleichtert auf der anderen Seite die Eliminierung der pRBZ in der Milz. Sie bleiben wie abnormale und alte RBZ, welche ebenfalls eine schlechte Deformierbarkeit aufweisen, in den Sinusoiden der roten Pulpa hängen und werden von Makrophagen phagozytiert. Aufgrund dieser hohen Belastung der Milz durch den Abbau vieler pRBZ und RBZ wird bei der Malaria oft eine Vergrößerung der Milz beobachtet, die zur Milzruptur führen kann. Zudem kann der Abbau sehr vieler pRBZ und RBZ zur Anämie führen [16]. Ein weiterer Mechanismus zur Eliminierung der Parasiten, der in der Milz beobachtet wurde, ist ein Prozess der *Pitting* genannt wird. Dabei werden Parasiten aus den RBZ entfernt, ohne diese zu zerstören [17].

Im Gegensatz zu *P. falciparum* sequestrieren pRBZ in einer *P. vivax*-Infektion nicht und es sind alle Stadien an pRBZ im zirkulierenden Blut zu finden. Jedoch besitzen diese eine erhöhte Deformierbarkeit, obwohl die Oberfläche der pRBZ sich deutlich vergrößert. Es

wird angenommen, dass die Oberflächenvergrößerung der pRBZ zu einer reduzierten intrazellulären Viskosität und hierdurch zur erhöhten Deformierbarkeit führt. Dieses ermöglicht den pRBZ in der *P.vivax*-Infektion der Eliminierung in der Milz zu entgehen und länger im Blut zu zirkulieren [18].

## 1.2 Die Immunantwort bei der Malaria

### 1.2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem spielt in einem Individuum eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der Malariaparasiten. Es besteht aus einer Organisation von Zellen und Molekülen, welche auf die Abwehr von Infektionen spezialisiert sind. Es bekämpft dabei Mikroorganismen die Infektionskrankheiten auslösen können. Die primäre Abwehr gegen Pathogene wie Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren erfolgt dabei durch dichte Oberflächenepithelien sowie durch die Schleimhaut und Enzyme, die das Eindringen der Krankheitserreger erschweren. Nach Durchdringen dieser Barriere werden konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns* = PAMPs) der Pathogene durch *pattern recognition receptors* (PRR) wie z.B. *Toll-like* Rezeptoren (TLR), erkannt [19]. Die Erkennung der PAMPs durch TLR führt über einen Signalweg zur Aktivierung der Zelle. TLR-Aktivierung in Makrophagen, welche dem Immunsystem zur Beseitigung von Mikroben durch Phagozytose dienen, hat eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL)-1 $\beta$ , und IL-6 zur Folge. TNF und IL-1 $\beta$  aktivieren daraufhin lokal das Endothel und induzieren eine Relaxation und Permeabilität der Blutgefäße, wodurch Serumproteine und Leukozyten zum Infektionsherd rekrutiert werden. Zusätzlich aktiviert IL-1 $\beta$ , zusammen mit IL-6, eine Akutphaseprotein-Produktion der Hepatozyten. Diese Proteine aktivieren daraufhin das Komplementsystem, wodurch es zur Opsonierung und nachfolgend Phagozytose der Pathogene durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen kommt. TLR-Engagement löst außerdem in Makrophagen die Freisetzung von antimikrobiellen Proteinen und Peptiden aus [20].

Außer der direkten Aktivierung des angeborenen Immunsystems können PRRs auch indirekt die adaptive Immunantwort auslösen. Von dendritischen Zellen (DZ) phagozytierte Pathogene werden in Proteinbausteine zerlegt und auf der Zelloberfläche

auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-II präsentiert. Daher werden die DZ auch als Antigen-präsentierende Zelle (APZ) bezeichnet. Die DZ können im Anschluss in den nächst gelegenen Lymphknoten wandern und dort durch die Antigenpräsentation  $CD4^+$  T-Zellen aktivieren. Die aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen können infolgedessen ihrerseits B-Zellen aktivieren [20]. Einige PAMPs können auch durch Quervernetzung des Antigenrezeptors direkt als Antigen von der B-Zelle erkannt werden. Diese werden als Thymus-unabhängige Antigene bezeichnet, da sie die B-Zelle ohne T-Zell-Hilfe aktivieren. Die Hauptfunktion von B-Zellen ist die Produktion spezifischer Antikörper gegen Antigene. Des Weiteren können sie auch als APZ fungieren. Nach Aktivierung differenziert die B-Zelle entweder in eine Antigen-produzierende Plasmazelle oder eine B-Gedächtniszelle. Die Aktivierung der T- und B-Zellen erfolgt über ihren Antigenrezeptor, den T-Zellrezeptor (TZR) bzw. B-Zellrezeptor (BZR), und ist spezifisch für das jeweilige Antigen [21].

Um diese Spezifität zu erreichen ist eine hohe Variabilität des TZR und BZR notwendig. Die Polypeptide dieser Rezeptoren bestehen aus verschiedenen Strukturdomänen: einer variablen Region zur Bildung der Antigenbindestelle sowie einer konstanten Region, welche viele Effektorfunktionen vermittelt [22]. Die für den TZR oder BZR kodierenden Gene werden durch einen ortsspezifischen Prozess kombiniert, der als V(D)J-Rekombination bekannt ist und eine hohe Diversität generiert. Dieser Prozess ist von dem *recombination activation gene* (RAG) abhängig [23]. In der immunologischen Forschung werden RAG-defiziente (*Knockout* = Ko)-Mäuse, die über keine T- oder B-Zellen verfügen, verwendet um bestimmte Fragestellungen in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems zu untersuchen [24].

Die  $CD4^+$  T-Zellen, auch T-Helferzellen ( $T_H$ ) genannt, werden in verschiedene Subklassen unterteilt:  $CD4^+ T_H1$  mit dem Signalzytokin Interferon- $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ),  $CD4^+ T_H2$  mit dem Signalzytokin IL-4, *Transforming growth factor*  $\beta$ -produzierende  $CD4^+ T_H3$ , folliculäre  $CD4^+ T_H$ , die für den Transkriptionsfaktor Foxp3 positive regulatorische  $CD4^+ T_H$  ( $T_{reg}$ ) und  $CD4^+ T_H17$  mit dem Signalzytokin IL-17. Allen gemeinsam ist, dass sie aus einer naiven T-Vorläuferzelle stammen. Für Infektionskrankheiten, ausgelöst durch Viren, Bakterien oder Pilze sind die  $CD4^+ T_H1$  von besonderer Bedeutung, während Helmintheninfektionen und Allergien durch ein Engagement der  $CD4^+ T_H2$  charakterisiert sind [25].  $CD4^+ T_{reg}$  tragen zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz bei,

indem, aktiv selbstreaktive Lymphozyten unterdrückt werden [26]. Außer den  $CD4^+$   $T_H$  gibt es noch die  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen. Die Hauptaufgabe dieser Zellen besteht in der Beseitigung von abnormalen und infizierten Zellen, um die Entstehung von malignen Erkrankungen zu vermeiden und intrazelluläre Pathogene zu eliminieren. Die Unterscheidung zwischen diesen abnormalen und gesunden Zellen erfolgt dabei über die Erkennung des auf dem MHC-I der Zelle präsentierten Antigens durch die  $CD8^+$  T-Zellen [27]. Für diese Arbeit ist außerdem die Rolle der neutrophilen Granulozyten von besonderer Bedeutung. Diese werden daher in einem gesonderten Kapitel vorgestellt.

### 1.2.2 Die Reaktion des Immunsystems bei *Plasmodium*-Infektionen

Bei Infektionen mit Protozoen-Parasiten wie *Trypanosoma*, *Leishmania* und *Plasmodia* kann der Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker von Parasiten die Makrophagen [28] und Endothelzellen [29] des Wirtes aktivieren. Diese Aktivierung führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen ( $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6) sowie Stickstoffmonoxid (NO) und ähnelt dabei der Immunantwort auf das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS). Die Signalauslösung durch den GPI-Anker der Parasiten erfolgt über TLR2 und zu geringerem Anteil über TLR4 und führt zur MyD88-abhängigen Aktivierung des *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase- und NF- $\kappa$ B-Weges [28]. Auf ähnliche Weise können auch DZ aktiviert werden. Bei diesen Zellen erfolgt die Signalauslösung durch GPI hauptsächlich über TLR2 und induziert die Produktion von  $TNF\alpha$  und IL-12[30]. Diese Aktivierung von den Makrophagen und DZ durch den GPI-Anker der Plasmodien wird dabei maßgeblich durch CD36 unterstützt [30,31]. CD36 ist nicht nur ein Rezeptor für eine Bindung seines Liganden PfEMP-1 [10], sondern fördert auch die Opsonierung und die anschließende Phagozytose der Pathogene durch Makrophagen. Zusätzlich ist CD36 an der durch GPI induzierten MAP-Kinase-Aktivierung und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt [31]. Außerdem spielt CD36 eine Rolle bei der TLR2- induzierten Zytokinantwort der DZ [30]. Die von den DZ aufgenommenen *Plasmodium*-Antigene werden auf der Oberfläche den T-Zellen präsentiert und provozieren dadurch eine T- und B-Zellantwort [32].

Es wurde im Mausmodell gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine essenziell für die Kontrolle der *Plasmodium*-Blutphase sind. APZ produzieren IL-12, IL-15, IL-18 und  $TNF\alpha$ , welche die  $IFN\gamma$ -Produktion von Zellen des angeborenen Immunsystems

induzieren. Nach ungefähr 5 Tagen übernehmen die T-Zellen den Großteil der IFN $\gamma$ -Produktion [33]. Unbedingt notwendig für die Parasiteneliminierung ist die Beteiligung der IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1, des proinflammatorische Zytokins IL-12 sowie der durch B-Zellen produzierten spezifischen Antikörper. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Depletion von Monozyten und Makrophagen im Mausmodell eine Erhöhung der Parasitämie zur Folge hat [34].

In endemischen Gebieten mit hoher Transmission erreichen die Menschen nach wiederholten Infektionen eine Teilimmunität. Diese wird über spezifische Antikörper vermittelt [35]. So wurde schon 1961 in einer Studie gezeigt, dass z.B. bei Übertragung von IgG-Antikörpern von immunen Erwachsenen auf Kinder mit Malariainfektion, die Parasitämie schneller kontrolliert werden konnte [36]. Die Immunantwort gegen die Leberphase läuft hingegen über die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden von DZ in der Haut aktiviert. Diese präsentieren nach dem Stich der Mücke das *circumsporozoite protein* (CSP) der Sporozoiten den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Allerdings verbleiben die Parasiten in der Leber nur für eine kurze Zeit, so dass dieses oft nicht ausreicht um eine effektive Immunantwort und die Rekrutierung weiterer Lymphozyten aus anderen Organen auszulösen. Jedoch bietet die Leberphase, die symptomfrei verläuft, einen guten Angriffspunkt für Vakzine um das Entstehen der Blutphase zu verhindern [37]. So wird das CSP-Antigen auch in der RTS,S/AS01-Vakzine verwendet [1].

Eine Immunaktivierung ist zwar zum einen dringend notwendig, um die Infektion zu kontrollieren, kann allerdings auf der anderen Seite auch die Pathologie verstärken. Besonders die zerebrale Malaria (ZM) kann zu lebensbedrohenden Komplikationen führen. Studien zu ZM im Menschen durchzuführen gestaltet sich jedoch ethisch und in der Praxis schwierig, da es nicht möglich ist die pathophysiologischen Veränderungen mit den klinischen Beobachtungen präzise zu korrelieren. Dafür wird ein Mausmodell verwendet, indem in suszeptiblen Mäusen durch Infektion mit *Plasmodium berghei ANKA* (*PbA*) experimentelle zerebrale Malaria (EZM) erzeugt wird. Die Entstehung von EZM ist ein komplexes Zusammenspiel von vielen Faktoren. Sie ist assoziiert mit einer Sequestration von sowohl pRBZ als auch Leukozyten [38]. Es wurde gezeigt, dass nach einer Depletion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einem Antikörper keine EZM mehr auftrat [39]. Diese Beobachtung steht im Zusammenhang mit der IFN $\gamma$ -Produktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen [40] sowie mit der Freisetzung von Perforin und Granzym B durch CD8<sup>+</sup>

T-Zellen, die Antigene auf Endothelzellen erkennen [41]. T<sub>reg</sub> spielen in der Pathogenese von EZM jedoch nur eine untergeordnete Rolle [42]. Als weiterer Faktor scheint das Zytokin TNF $\alpha$  eine Rolle bei der Entstehung von ZM zu spielen. Es wurden erhöhte Konzentrationen von TNF $\alpha$  im Plasma als auch im Gehirn von Patienten mit ZM gefunden. Dabei ergab sich allerdings keine klare Korrelation zum Schweregrad der ZM. Bekannt ist, dass TNF $\alpha$  für eine Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, insbesondere ICAM-1, bei ZM verantwortlich ist. Jedoch führte eine anti-TNF $\alpha$ -Behandlung bei ZM zu keinem Erfolg [43]. Davon abgesehen wurde sowohl eine verminderte Suszeptibilität für EZM nach Depletion von Thrombozyten [44] als auch von neutrophilen Granulozyten in der frühen Infektionsphase beobachtet [45].

### 1.3 Der neutrophile Granulozyt

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten, kurz Neutrophile, gehören zusammen mit den Basophilen und Eosinophilen zur Familie der Granulozyten, die alle von Paul Ehrlich im späten 19. Jahrhundert entdeckt worden sind und nach ihrem Färbeverhalten des Protoplasmas eingeteilt werden. Granulozyten enthalten viele Sekretionsvesikel, die Granula [46]. Pro Tag entstehen  $10^{11}$  Neutrophile im Knochenmark des Menschen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen und werden anschließend in den Blutstrom entlassen [47], wo sie nur 6-8 Stunden zirkulieren bevor sie ins Gewebe einwandern. Sie sind eine der Zellarten im Körper mit der kürzesten Lebensdauer. Im Blut repräsentieren Neutrophile bis zu 70 Prozent der zirkulierenden Leukozyten und sind die ersten Zellen, die zu einem Infektionsherd rekrutiert werden. Bei der Maus ist die Anzahl der zirkulierenden Neutrophilen wesentlich geringer und liegt im Maximum bei 30 Prozent [46].

Bevor die Neutrophilen aus dem Blut rekrutiert werden, wird die Störung der Gewebemöostase zunächst von Wächterzellen wie Makrophagen, Mastzellen oder Stromazellen registriert. PAMPs oder *damage-associated molecular pattern* (DAMP)s aktivieren diese Zellen, so dass es zur Ausschüttung von IL-1 $\beta$ , TNF und Chemokinen kommt, und initiieren damit die Rekrutierung von Neutrophilen. Dieses bewirkt außerdem die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin und E-Selektin im zum Infektionsherd benachbarten Endothel [46]. Der Neutrophile folgt dem Gradienten von Chemokinen hin zur Infektionsstelle, wo dann die Leukozyten-Adhäsions-Kaskade abläuft. Diese ist gekennzeichnet durch das Rollen des Neutrophilen entlang des

Endothels aufgrund von niedrig affinen Bindungen mit den E- und P-Selektinen des Endothels. Das langsame Rollen geht einher mit einem Kontakt der auf Glykosaminoglykanen des Endothels präsentierten Chemokinen [48]. Die Bindung dieser Chemokine an die Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche des Neutrophilen führt zu einer verstärkten Expression von CD11b/CD18-Integrin auf dessen Oberfläche, welche an Liganden des Endothels wie ICAM binden können [49]. Das Rollen des Neutrophilen geht durch die Integrin-Ligand-Bindung in ein Kriechen über, bis es zu einer parazellulären oder transzellulären Transmigration durch das Endothel, der Leukozytendiapedese, kommt [48]. Im Gewebe migriert der Neutrophile dann aktiv entlang eines Konzentrationsgradienten von Chemokinen. Dieser Vorgang wird auch Chemotaxis genannt. Dadurch werden die Neutrophile zum Inflammationsort rekrutiert. Neutrophile sind in der Lage Konzentrationsunterschiede dieser Chemokine von weniger als ein Prozent pro Zelllänge zu erkennen. Mit 10  $\mu\text{m}$  pro Minute sind Neutrophile fünf-fach schneller als Keratozyten und Makrophagen und somit eine der am schnellsten migrierenden Zellen. Die Bindung von Chemokinen in diesem Prozess löst eine Aktivierung des trimeren G-Proteins aus. Diese Aktivierung kann im weiteren Signalweg zu Aktin-Polimerisation, Adhäsionsrezeptor-*Priming*, Superoxidproduktion und Sekretion proteolytischer Enzyme führen [50]. Intermediäre Chemokine sind Leukotrien B<sub>4</sub>, *platelet-activating factor* und IL-8, die vom Endothel produziert werden. Der Zielort wird markiert durch einen Chemokingradienten von Komplementfaktoren und N-formylierte Peptiden, welche charakteristisch für bakterielle Proteine sind [51].

Die Hauptaufgabe der Neutrophilen liegt in der Abwehr gegen Mikroben. Sie enthalten eine Vielzahl an Granula, die in azurophile, spezifische, tertiäre und sekretorische Granula unterschieden werden. Diese speichern mikrobizide Proteine und Proteasen wie Gelatinase, Elastase und Cathepsin-G. Neutrophile können Pathogene phagozytieren und intrazellulär durch Verschmelzen von Phagosomen und Lysosomen abbauen. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), dem *oxidative burst*. Die Aktivierung des oxidativen Metabolismus involviert als erstes die NADPH-Oxidase, die Sauerstoff zum Superoxidradikal-Anion ( $\text{O}_2^-$ ) reduziert. Dies bewirkt außerdem die Freisetzung der enzymatischen und antimikrobiellen Proteine aus den Granula [51]. Aus  $\text{O}_2^-$  entsteht nachfolgend unter Einwirkung der Superoxiddismutase Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), welches dem granulozytären Enzym Myeloperoxidase (MPO) zur Produktion der zytotoxischen hypochlorigen Säure (HOCl)

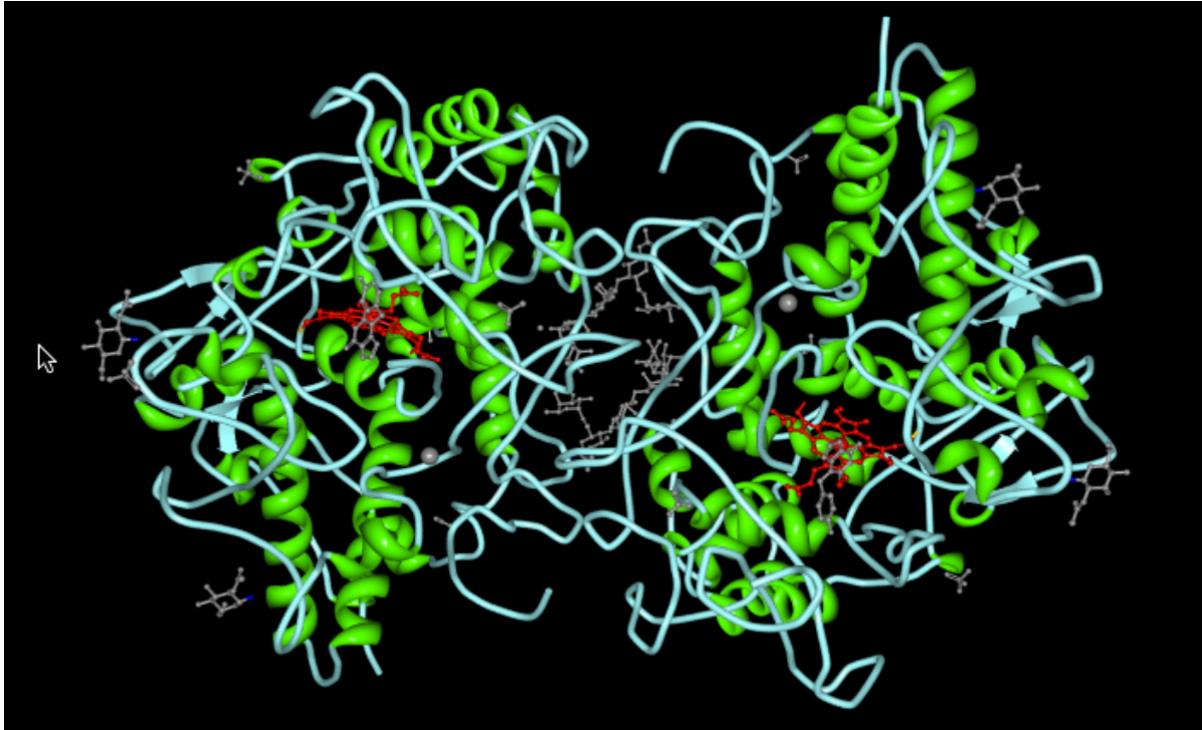
dient [52]. Zusätzlich werden durch die Xanthin-Oxidase [53] und die NO-Synthase (NOS) [51] weitere ROS und reaktive Stickstoffspezies (RNS) generiert. Vor einigen Jahren ist überdies bekannt geworden, dass Neutrophile einen weiteren Abwehrmechanismus nutzen, um Pathogene zu immobilisieren und abzutöten, die *neutrophil extracellular traps* (NETs). Aktivierte Neutrophile formen Netzwerke aus extrazellulären Fasern, die hauptsächlich aus der DNA des Neutrophilen bestehen. Gebunden an diese DNA sind Histone sowie antimikrobielle Proteine der Granula wie neutrophile Elastase, Cathepsin G, Gelatinase und Myeloperoxidase [54].

#### **1.4 Die Myeloperoxidase (MPO)**

Die MPO ist ein 150 kDa schweres Hämoprotein-Homodimer. Dieses ist aus zwei Monomeren, einer leichten (15 kDa) und einer schweren Kette (57-60 kDa), zusammengesetzt [55]. Der räumliche Aufbau besteht aus einer  $\alpha$ -helikalen sekundären Struktur, wobei jedes Monomer aus 5 Helixen und einer Hämgruppe gebildet ist (Abb. 1.3). Die Hämgruppe, welche Eisen als Zentralatom enthält, ist für die grüne Farbe der MPO verantwortlich. Die MPO gehört neben der Laktoperoxidase, eosinophilen Peroxidase und thyroiden Peroxidase zu der Familie der Säugetierperoxidasen. Allen Säugetierperoxidasen ist gemein, dass sie kovalente Bindungen zwischen der Methylgruppe des Pyrrolringes A und C und zwischen den Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure des Proteins besitzen. Jedoch unterscheidet sich die MPO von den anderen Mitgliedern der Familie dadurch, dass sie als einzige Peroxidase eine weitere kovalente Bindung zwischen dem Schwefelatom von Methionin<sup>243</sup> und dem terminalen Kohlenstoffatom der Vinylgruppe des Pyrrolringes A besitzt. Diese Bindung ist für die spezifischen Eigenschaften von MPO verantwortlich, wie z.B. die Fähigkeit Chlorid als Substrat nutzen zu können. Das Reaktionsoptimum der MPO liegt bei einem pH von 5,5. Ansonsten hat die MPO ein weites Reaktionsspektrum [56].

Hauptsächlich ist die MPO in den Granula von Neutrophilen lokalisiert und macht ungefähr fünf Prozent des gesamten Proteins des Neutrophilen aus. Des Weiteren ist die MPO ebenfalls in Monozyten, ungefähr ein Prozent, zu finden. Bei der Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen geht die Fähigkeit verloren, MPO zu synthetisieren. Diese kann aber durch Endozytose von Neutrophilen oder nur freier MPO allein wieder aufgenommen werden. Neben Leukozyten konnte die MPO auch in Kupferzellen der

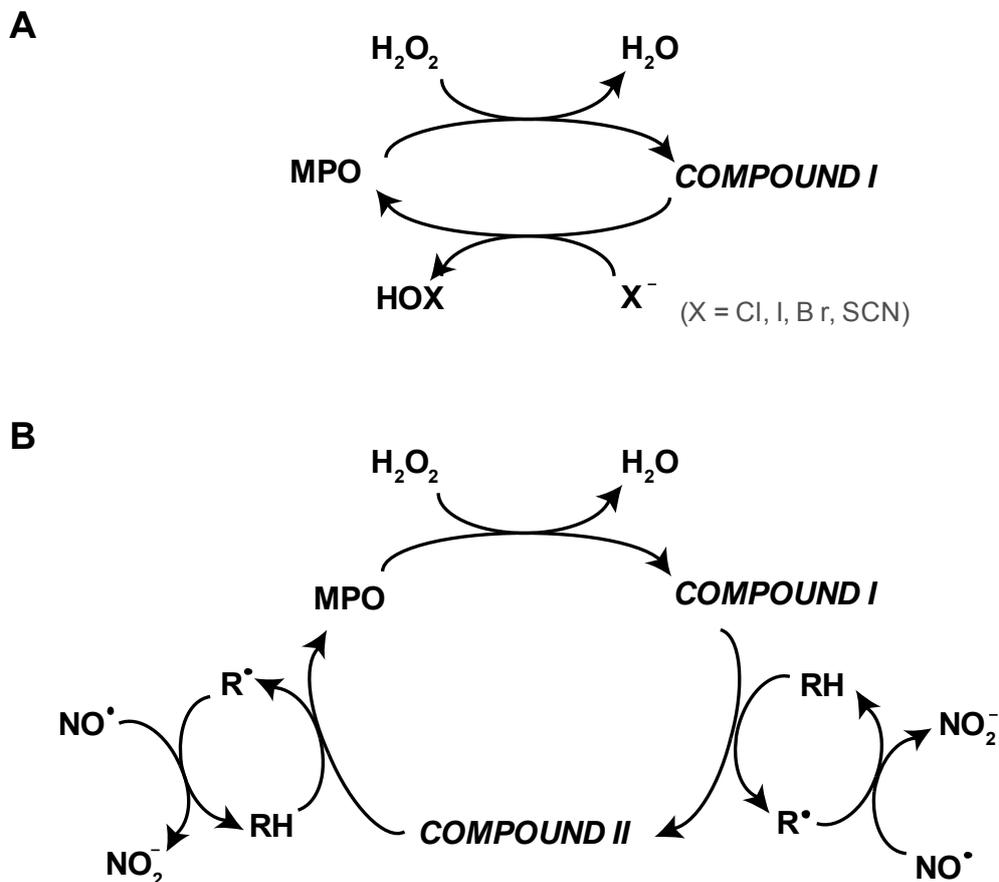
Leber sowie in Mikroglia, neuronalen Granula und den pyramidalen Neuronen des Hippocampus im Gehirn nachgewiesen werden [56].



**Abb. 1.3: Proteinstruktur der MPO.** Gezeigt ist die 3-dimensionale Struktur einer inaktivierten humanen Myeloperoxidase. Die Häm-Zentren sind mit rot und die  $\alpha$ -Helixen mit grün gekennzeichnet. Die Proteinstruktur wurde modifiziert nach der PDB-Struktur 3zs0 [57]. Die Abbildung wurde mit der Software Protein Workshop generiert [58].

Die MPO ist durch ihre antimikrobiellen Eigenschaften gekennzeichnet. Nach Aktivierung der Neutrophilen entlassen diese die MPO aus den Granula in deren Umgebung. Die MPO kann selektiv an Gram-negative und viele Gram-positive Bakterien binden und ein weites Spektrum an Bakterien abtöten, z.B. wie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Pseudomonas aeruginosa* [59]. Diese Fähigkeit beruht auf der enzymatischen Aktivität der MPO, indem die Reaktion von  $H_2O_2$  und Halogeniden ( $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ) sowie Pseudohalogeniden ( $SCN^-$ ) zur Generierung von zytotoxischen hypohalogeniden Säuren wie HOCl, hypobromiger Säure (HOBr), hypoiodiger Säure (HOI) und Hypothiocyansäure (HOSCN) katalysiert wird. Die Hauptprodukte sind dabei HOCl und HOSCN. HOCl kann im Anschluss zügig mit Schwefel- oder Stickstoffatomen reagieren, die aus Thiolen, Thioestern, Aminen oder Amiden stammen. Des Weiteren können auch NO sowie andere anorganische als auch organische Substrate oxidiert werden. Insgesamt erhöht die MPO hierdurch die Produktion von ROS und RNS, sowie anderen Radikalen. Diese Produkte können

anschließend zur Oxidation von Proteinen führen [60]. Der Oxidationsmechanismus im Detail funktioniert dabei wie folgt (Abb.1.4):



**Abb. 1.4: Durch MPO katalysierte Reaktionen.** Beim Halogenierungszyklus wird unter Verbrauch des Kosubstrates  $\text{H}_2\text{O}_2$  die MPO zum *Compound-I* oxidiert. Dieses wird in der weiteren Reaktion wieder reduziert und überträgt zwei Elektronen auf ein Halogenid, welches zur hypohalogeniden Säure oxidiert wird (A). Beim Peroxidasezyklus geschieht die Reduktion des *Compound-I* in zwei Ein-Elektronentransferschritten über das Zwischenprodukt *Compound-II*. Dabei entstehen jeweils Radikalintermediate (R) von biologischen Substraten (RH). Diese können ihrerseits mit NO reagieren (B).

$\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert mit der Hämgruppe der MPO und wird dabei reduziert. Des Weiteren führt diese Reaktion zu einem um zwei Elektronen oxidierten sogenannten *Compound-I* der MPO. Ein Elektron stammt dabei von dem  $\text{Fe}^{3+}$  der Hämgruppe, welches zu  $\text{Fe}^{4+}$  oxidiert wird. Das andere Elektron wird durch Oxidation der Porphyrinstruktur frei. *Compound-I* kann zu seinem Ursprungszustand über einen Halogenierungszyklus oder einen Peroxidasezyklus zurückkehren. Beim Halogenierungszyklus geschieht ein Zwei-Elektronentransfer, wobei Halogenide oder Pseudohalogenide oxidiert werden und das *Compound-I* der MPO wieder reduziert wird. Der Peroxidasezyklus hingegen umfasst zwei aufeinanderfolgende Ein-Elektronen-Reduktionen unter der Entstehung eines weiteren Zwischenproduktes, dem  $\text{Fe}^{4+}$  haltigen *Compound-II* [60]. Dabei entstehen

intermediäre Substratradikale die anschließend z.B. die Oxidierung von NO bewirken [61]. Die MPO ist nicht nur an der Abwehr von Bakterien beteiligt sondern spielt auch eine Rolle in der Bekämpfung von Pilzinfektionen. So wurde bei Patienten mit einer *Candida*-Infektion herausgefunden, dass diese vermehrt in Patienten mit genetischer MPO-Defizienz auftreten. Das Verhältnis für das Auftreten einer MPO-Defizienz ist von der geographischen Region abhängig. Es liegt in Europa und USA bei 1:2000-4000, während es in Japan nur bei 1:55000 liegt. Eine erhöhte Anfälligkeit gegen eine *Candida*-Infektion wurde nicht nur beim Menschen, sondern auch in MPO-Ko-Mäusen beobachtet. In diesen wurde außerdem eine erhöhte Suszeptibilität für Bakterieninfektionen festgestellt. Diese Beobachtungen können mechanistisch dadurch erklärt werden, dass die MPO essenziell für die Bildung von NETs ist, welche als wichtiger Verteidigungsmechanismus gegen Pilzinfektionen wie *Candida albicans* beschrieben sind [62].

Neben der Beteiligung an antimikrobiellen Abwehrmechanismen wurde die MPO in den letzten Jahren zunehmend in Zusammenhang mit inflammatorischen kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose [63] und koronarer Herzerkrankung beschrieben [64]. So erhöht die MPO z.B. über HOCl die Oxidation des *low density* Lipoproteins (LDL) in Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen [65]. Es wird angenommen, dass oxidiertes LDL maßgeblich an der Entstehung von Arteriosklerose beteiligt ist [63]. Bei einer Studie mit Patienten mit koronarer Herzerkrankung wurden überdies erhöhte MPO-Konzentrationen im Plasma detektiert, welche um so höher waren, je weiter die Erkrankung fortgeschritten war. Dabei war die diagnostische Sensitivität sogar höher als die der üblichen Labormarker für Myokardnekrose wie C-reaktives Protein oder kardiales Troponin [64]. Die MPO könnte demnach einen wichtigen Platz als Biomarker einnehmen, um Entzündungen und ein Voranschreiten der Erkrankung schneller zu erkennen. Des Weiteren trägt die MPO zur Generierung von Nitrotyrosinen bei, welche als Kennzeichen einer inflammatorischen Gewebeverletzung gelten. Die MPO bindet an das Endothel und akkumuliert in der subendothelialen Matrix, wo sie wie Heparin an anionischen Glykokalixreste bindet. Dort katalysiert die MPO die Nitrierung von Thyrosinresten und vermindert außerdem durch ihre oxidativen Mechanismen die Verfügbarkeit von NO [66]. NO wird durch oxidative Desaminierung durch die NOS aus L-Arginin gebildet. Es werden 3 Isoformen der NOS unterschieden: neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und induzierbare NOS (iNOS). Unter

inflammatorischen Bedingungen kann iNOS von zahlreichen Zelltypen synthetisiert werden, die große Mengen an NO produzieren [67]. Eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit kann zur Entstehung von endothelialer Dysfunktion beitragen und ist somit ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von inflammatorischen Erkrankungen von Blutgefäßen [56]. Zusätzlich vermag die MPO Neutrophile über elektrostatische Wechselwirkung zu rekrutieren. Die Elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ geladenen Glykokalix des Neutrophils und des Endothels wird durch Bindung der stark kationisch geladenen MPO vermindert und fördert so den ersten Kontakt bevor weitere Mechanismen der Leukozytenmigration ablaufen [68]. Die MPO aktiviert außerdem die Neutrophile sowohl autokrin als auch parakrin indem sie an die CD11b/CD18-Integrine der Neutrophilen bindet und dadurch die Induktion der intrazellulären Signalkaskade bewirkt. Dieses führt zur erhöhten Expression von CD11b, verstärkter Degranulation sowie der Aktivierung der NADPH Oxidase. Dieser Mechanismus scheint dabei ohne Beteiligung der katalytischen Aktivität der MPO abzulaufen [69].

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Die MPO ist durch ihre spezifische Eigenschaft, die Produktion von ROS zu erhöhen, direkt an der Pathogenabwehr beteiligt. Zusätzlich verstärkt sie die Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen. Diese Mechanismen sind auf der einen Seite nützlich um Infektionen zu bekämpfen, führen aber auch zu einer erhöhten Inflammation, wie insbesondere in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen gezeigt worden ist. Des Weiteren führen die Oxidationsprodukte von MPO zu einer Oxidierung von Molekülen und Proteinen, die für die endotheliale Funktion der Blutgefäße wichtig sind. Eine durch MPO ausgelöste endotheliale Dysfunktion sowie die Steigerung der Inflammation können zu einer gestörten Mikrozirkulation beitragen, welche in der Malaria bereits durch die Sequestration des Parasiten beeinträchtigt ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass MPO zum einen die Immunantwort gegen die Parasiten unterstützt und dadurch die Parasitämie verringert. Zum anderen wird angenommen, dass die MPO die Pathogenese fördert, indem sie in einem ähnlichen Vorgang wie bei Leukozyten die zirkulierenden pRBZ abbremst und hierdurch den ersten Kontakt zum Endothel initiiert. Darüber hinaus könnte die Bindung der MPO an das Endothel die Endothelfunktion beeinträchtigen. In dieser Arbeit soll die Rolle von MPO bei der Parasiteneliminierung

und Malariapathogenese aufgeklärt werden. Hiermit soll das Verständnis von pathophysiologischen Mechanismen der Malaria erweitert werden.

## 2. Material

### 2.1 Laborgeräte

Analysenwaage	<i>Satorius AG, Göttingen</i>
CO <sub>2</sub> -Inkubator	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Durchflusszytometer „Accuri C6“	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Durchflusszytometer „LSRII“	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
ELISA-Photometer MRX-II	<i>Dynex Technologies, Berlin</i>
Haltevorrichtung für Kraftaufnehmer	<i>Kent Scientific Co., Litchfield, USA</i>
Haltevorrichtung für Organbadanlage	<i>Kent Scientific Co., Litchfield, USA</i>
Heizplatte	<i>UNO B.V., Zevenaar, Niederlande</i>
Isofluran-Anlage	<i>UNO B.V., Zevenaar, Niederlande</i>
Kraftaufnehmer für Organbadanlage	<i>Kent Scientific Cooperation, Litchfield, USA</i>
Mikroskop „Axiostar plus“	<i>Zeiss, Oberkochen</i>
Mikroskop „Wilovert 30“	<i>Leica WETZLAR, Wetzlar</i>
MS1 Minishaker	<i>IKA Works Inc., Wilmington, USA</i>
Nano-Drop 2000c	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
Nikon A1 konfokales Laser-Mikroskop-System	<i>Nikon Instrument Europe, Amsterdam, Niederlande</i>
PCR Maschine „Corbett RG6000“	<i>Qiagen, Hilden</i>
Perfusor fm	<i>Braun, Melsungen</i>
pH-Meter (HI221)	<i>Hanna Instruments, Kehl am Rhein</i>
Pipetus®	<i>Hierschmann, Eberstadt</i>
Sterile Arbeitsbank „Lamin Air HB 2448“	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Thermomixer	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Wärmelampe (Sanitas)	<i>Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler</i>
Wasserbad	<i>Braun, Melsungen</i>
Wasserheizung für Organbadanlage	<i>Fa. Haake, Karlsruhe</i>
Zentrifuge „Centrifuge 5415 R“	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Zentrifuge „Centrifuge 5810 R“	<i>Eppendorf, Hamburg</i>

## 2.2 Glas- und Plastikware

Amicon Ultra-Filter (0,5 ml)	<i>Millipore, Eschborn</i>
Cell Strainer „Falcon“ (70 µm)	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Chirurgische Einmal-Skalpelle	<i>Braun, Melsungen</i>
Einmal-Injektionskanülen (0,4 x 20 mm)	<i>Braun, Melsungen</i>
FACS-Röhrchen	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Glaspipetten	<i>Brand, Wertheim</i>
Katheterschlauch (aus Polyäthylen)	<i>Smiths Medical, Keene, USA</i>
Messschieber	<i>Wiha Werkzeuge, Schunach</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Brand, Wertheim</i>
Objektträger (76 x 26 mm)	<i>Engelbrecht, Edermünde</i>
Organbäder	<i>Peter Hatch, Glasshop, University of Iowa, USA</i>
Petrischale	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Pipetten	<i>Gilson, Middleton, USA</i>
Pipettenspitzen	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen oder Sarstedt, Nümbrecht</i>
Präparierbesteck	<i>Neolab, Heidelberg</i>
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Spritzen (1 ml und 5 ml)	<i>Braun, Melsungen</i>
Zellkulturplatten 96-Well	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen</i>
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>

## 2.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder VWR (Darmstadt) bezogen.

CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub>	<i>Air Liquide, Düsseldorf</i>
---	--------------------------------

## 2.4 Mausstämme

<i>Mus musculus</i> C57Bl/6J (WT)	<i>Charles River, Sulzfeld</i>
<i>Mus musculus</i> C57Bl/6J MPO-Ko	<i>Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg oder Bernhard-Nocht Institut, Hamburg</i>
<i>Mus musculus</i> C57Bl/6J RAG-Ko	<i>Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg</i>
<i>Mus musculus</i> C57Bl/6J RAGxMPO-Ko	<i>Universitätsklinikum Eppendorf Hamburg</i>

## 2.5 Plasmodium-Stämme

<i>Plasmodium yoelii</i> , nicht letal (PyNL)	<i>Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg</i>
<i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA)	<i>Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg</i>

## 2.6 Material für tierversuchsbezogene Arbeiten

Acetylcholin	<i>Sigma Chemical, St. Louis, USA</i>
Bephanthen-Augensalbe	<i>Bayer, Leverkusen</i>
Enthaarungscreme	<i>Rufin cosmetics, Langenhagen</i>
Glyceroltrinitrat (Nitrolingual-Ampullen)	<i>G.Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt</i>
Indometacin	<i>Sigma Chemical, St. Louis, USA</i>
Ketamin	<i>Pfizer, Berlin</i>
NaCl (0,9 %)-Lösung	<i>Braun, Melsungen</i>
Probenecid	<i>Sigma Chemical, St. Louis, USA</i>
Prostaglandin F <sub>2α</sub>	<i>Sigma Alderich, München</i>
Rompun	<i>Bayer, Leverkusen</i>
Wright's stain	<i>Sigma Chemical, St. Louis, USA</i>

Krebs-Puffer

Kalziumchlorid	28,9 g
7-D-Glucose	10 g
Kaliumchlorid	1,75 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,7 g
Magnesiumsulfat	1,48 g
Natriumchlorid	28,9 g
Natriumhydrogencarbonat	10,5 g
Indometacin	15 ml
Aqua bidestillata	ad 5000 ml
mit Salzsäure auf pH 7,35 eingestellt	

Giemsa-Lösung

Giemsa	40 ml
Phosphatpuffer	360ml

May-Grünwald-Lösung

May-Grünwald	180 ml
Phosphatpuffer	360 ml

Phosphatpuffer

Di-Natriumhydrogenphosphat	5,45 g
Kaliumhydrogenphosphat	2,45 g
Aqua bidestillata	ad 5 l

Wright's stain-Lösung

Wright's stain	500 mg
Methanol	ad 500 ml

**2.7 Material für zellbiologische Arbeiten**

EDTA Probenröhrchen	<i>Kabe, Nürmbrecht-Elsenroth</i>
DBPS-Lösung	<i>PAN Biotech, Aidenbach</i>
Fc-Block	<i>Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg</i>
Fixierungs-/Permeabilisierungs-Diluent	<i>eBioscience, Frankfurt</i>
Fixierungs-/Permeabilisierungs-Konzentrat	<i>eBioscience, Frankfurt</i>
Fötale Kälberserum (FCS)	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
Gentamycin-Lösung	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
Ionomycin	<i>Sigma-Chemie, Deisenhofen</i>
L-Glutamin	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
Monensin	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Permeabilisierungspuffer	<i>eBioscience, Frankfurt</i>

PMA	<i>Sigma-Chemie, Deisenhofen</i>
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
TRIzol®	<i>Life Technologies, Darmstadt</i>

<u>Medium</u>	<u>Erythrozytenlysepuffer</u>
500ml RPMI 1640	10 % 0,1M Tris-HCl (pH 7,5)
50ml FCS	90% 0,16M Ammoniumchlorid
5ml L-Glutamin (200 mM)	
2,5ml Gentamycin (10 mg/ml)	

<u>20x PBS (Phosphate Buffered Saline)</u>	<u>FACS-Puffer</u>
160g Natriumchlorid (NaCl)	50ml 20xPBS
4g Kaliumchlorid (KCl)	10ml FCS
28.8g Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	10ml Natriumazid 10%-Lösung
4,8g Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	
ad 1L dH <sub>2</sub> O	
pH 7,4	

## 2.8 Material für biochemische Arbeiten

CBA Enhanced Sensitivity Flex Set Mouse IFN $\gamma$	<i>BD Biosciencse, Heidelberg</i>
CBA Enhanced Sensitivity Flex Set Mouse IL-10	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
CBA Enhanced Sensitivity Flex Set Mouse TNF $\alpha$	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
CBA Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
MPO ELISA Kit Human	<i>Hycult, Beutelsbach</i>
MPO ELISA Kit Maus	<i>Hycult, Beutelsbach</i>
Nitrate/Nitrite Colometric Assay Kit (Cayman)	<i>Biomol, Hamburg</i>

## 2.9 Material für molekularbiologische Arbeiten

Ampuwa®	<i>Fresenius Kabi, Bad Homburg</i>
dNTPs	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
eNOS Primer	<i>Life Technologies, Darmstadt</i>
GAPDH	<i>Life Technologies, Darmstadt</i>
iNOS Primer	<i>Life Technologies, Darmstadt</i>
NOX4 Primer	<i>Life Technologies, Darmstadt</i>
Oligo(dT)-Nukleotid	<i>Thermo Scientific, Waltham, US</i>
5x Reaction Buffer for RT	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
Revert Aid H minus reverse Transkriptase	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
TaqMan-Universal-PCR-Mastermix	<i>Life Technologies, Darmstadt</i>

## 2.10 Antikörper und fluoreszierende Reagenzien

Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper:

Spezifität	Klon	Herkunft
Anti-Maus CD3 PerCP-Cy5.5	145-2C11	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus CD4 FITC	L3T4	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus CD8 eFlour® 450	53-6.7	<i>eBioscience, Frankfurt</i>
Anti-Maus CD8 PerCP	53-6.7	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus CD11b V450	M1/70	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus GR-1 APC	RB6BC5	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus IFN $\gamma$ AlexaFlour488	XMG 1.2	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus IFN $\gamma$ PE	XMG 1.2	<i>eBioscience, Frankfurt</i>
Anti-Maus IL-10 PE	JES5-16E3	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus Ly6-G PerCP-Cy5.5	1A8	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus Ly6-C PE	HK1.4	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus TNF $\alpha$ APC	MP6-XT22	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>

Für die Intravitalmikroskopie verwendete fluoreszierende Reagenzien:

Spezifität	Herkunft
Calcein Red	<i>AAT Bioquest, Sunnyvale, USA</i>
Dextran Texas Red (neutral)	<i>Life Technologies, Darmstadt</i>
Syto16	<i>Life Technologies, Darmstadt</i>

Für die Depletion verwendete Antikörper:

Spezifität

Anti-Maus GR-1 (Klon RB6-8C5)

Anti-Maus Ly6-G (Klon 1A8)

Ratten-IgG (Chrom Pure Rat IgG)

Herkunft

*Bernhard-Nocht-Institut,  
Hamburg**BioXCell, West Lebanon, USA**Dianova, Hamburg***2.11 Software**

BD FACS Diva 6.0

FCAP-Array™ Software

FlowJo (Version 10)

GraphPad Prism5

NIS-Elements Microscope Imaging Software

*BD Biosciences, Heidelberg**BD Biosciences, Heidelberg**TreeStar, Ashland, USA*

GraphPad Software, La Jolla, USA

*Nikon Instrument Europe, Amsterdam,  
Niederlande*

## 3. Methoden

### 3.1 Tierversuche

#### 3.1.1 Mäuse

Die Verwendung der Mäuse erfolgte in einem Alter von 7-12 Wochen. Das Abtöten der Mäuse erfolgte durch Einleiten von CO<sub>2</sub> in den Käfig.

#### 3.1.2 Infektion mit *PyNL*

Für die Infektion der Mäuse mit *PyNL* wurden Blutphaseparasiten verwendet. Dafür wurden einer bereits infizierten Maus zwei bis drei Blutstropfen durch Schwanzpunktion entnommen und in einem EDTA-Röhrchen gefüllt mit 1 ml DPBS-Lösung aufgenommen. Des Weiteren wurde ein Blutausschmear vorgenommen. Dieser wurde mit Wright's stain-Lösung angefärbt. Hierzu wurden zehn Tropfen der Wright's stain-Lösung auf den Objektträger getropft und für zwei Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation mit zehn Tropfen dH<sub>2</sub>O für drei Minuten. Nach dem Abspülen des Objektträgers mit Leitungswasser wurde dieser bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Die Anzahl der pRBZ und nicht parasitierten RBZ wurde ausgezählt. Das sich daraus ergebende prozentuale Verhältnis bezeichnete die Parasitämie. Die Erythrozytensuspension wurde mit DPBS-Lösung verdünnt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Den zu infizierenden Mäusen wurde nachfolgend eine Suspension mit 2x10<sup>4</sup> pRBZ pro 200 µl DPBS-Lösung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Bei dem Versuch zur Bestimmung der endothelialen Vasodilatationsfähigkeit und der Infektion von RAG-1-Ko-Mäusen wurde nicht pRBZ aus Frischblut, sondern 1x10<sup>6</sup> zuvor in flüssigem N<sub>2</sub> eingefrorene pRBZ (Stabilat) pro Maus verwendet. Die höhere Anzahl an gefrorenen pRBZ wurde eingesetzt, da beim Auftauen des Stabilates einige pRBZ erylysieren.

#### 3.1.3 Infektion mit *PbA*

Die Infektion der Mäuse mit *PbA* erfolgte mit dem gleichen Verfahren wie die *PyNL*-Infektion. Dabei wurden 1x10<sup>5</sup> pRBZ pro Maus verwendet. Die Identifikation der EZM erfolgte anhand des Auftretens einer der folgenden neurologischen Symptome:

wackliger Gang, Lähmungserscheinungen, Krämpfe oder Koma. Die Mäuse wurden bei starker Ausprägung eines dieser Symptome abgetötet.

### **3.1.4 Bestimmung des Milz/Tibia-Quotienten**

Zur Bestimmung der Milzvergrößerung während der *PyNL*-Infektion wurde der Milz/Tibia-Quotient verwendet. Die Milz wurde der Maus nach Abtötung durch CO<sub>2</sub> entnommen, in PBS gewaschen und gewogen. Die Tibia (=Schienbeinknochen) wurde aus dem Bein der Maus herauspräpariert und die Länge mit einem Messschieber gemessen. Die Bildung eines Quotienten aus Organgewicht und Tibialänge ermöglicht eine Normierung auf die Größe der Mäuse, so dass auch Mausgruppen zusammengefasst werden können die sich in Alter unterscheiden [70].

### **3.1.5 Bestimmung der Parasitämie in der Milz**

Für die Bestimmung der Parasitämie in der roten Pulpa der Milz wurden Tupfpräparate angefertigt. Dafür wurde den Mäusen die Milz entnommen und mit einem Skalpell in zwei bis drei Stücke zerteilt, so dass ein Querschnitt der Milz erhalten wurde. Das Milzstück wurde mit der Schnittfläche nach unten, mehrmals auf einen Objektträger getupft. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst wenig Druck auf die Milz auszuüben. Die Tupfpräparate wurden daraufhin einen Tag bei RT getrocknet und anschließend mit einer Pappenheim-Färbung gefärbt. Dabei wurden die Objektträger zuerst für fünf Minuten in Methanol fixiert. Es folgte eine Färbung mit May-Grünwald-Lösung (fünf Minuten) und danach mit Giemsa-Lösung (20 Minuten). Im Anschluss wurden die Objektträger zwei Mal für zwei Minuten in Phosphatpuffer gewaschen.

### **3.1.6 Bestimmung der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Vasodilatationsfähigkeit im Organbad**

Für diesen Versuch wurde zunächst die Aorta der Maus präpariert. Nach Abtötung der Maus wurde ein Stück der thorakalen Aorta entnommen, indem die *Aorta descendens* unterhalb des Zwerchfells durchtrennt und entlang der *Columna vertebralis* bis hin zum Aortenbogen aus dem Brustkorb herauspräpariert wurde. Dabei wurde darauf geachtet, keinen zu starken Zug auf die Aorta auszuüben, um Endothelschädigungen der Aorta zu vermeiden. Nach Sektion wurde die Aorta sofort in eisgekühlte Krebs-Puffer überführt. Es folgte eine Säuberung der Aorta von Blut, Fett und Geweberesten. Daraufhin wurden zwei 0,4 cm langen Ringsegmente herausgeschnitten.

Ein präpariertes Aortenringsegment wurde im Anschluss vorsichtig auf zwei Haken aus rostfreiem Stahl aufgefädelt. Die Haken wurden dazu genutzt, den Ring im Organbad zu montieren. Dabei wurde der untere Haken an einer Halterung der Glaskammer fixiert, die mit Krebs-Puffer gefüllt war. Der obere Haken wurde über einen Draht mit einem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden. In die Pufferlösung wurde konstant Carbogen (Gasgemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) eingeleitet. Um eine Prostaglandinsynthese zu unterdrücken, wurde Indometacin, ein Inhibitor der Cyclooxygenase, zu dem Puffer hinzugefügt. Ein Überlaufseitenarm der Glaskammer bewirkte eine Volumenbegrenzung auf 25 ml. Der Puffer wurde durch ein Wasserbad auf 37 °C gehalten. Jede Veränderung der isometrischen Spannung des Ringes wurde über einen Kraftaufnehmer an einen Verstärker übermittelt. Die Signale wurden mit Hilfe der Chart 4.0-Software analysiert.

Die initiale isometrische Spannung von jedem Ring wurde auf 0,2 g eingestellt. In Abständen von sieben Minuten wurde die isometrische Spannung vier mal auf insgesamt 1,1 g erhöht. Als Nächstes wurde 1 ml KCl-(2M)-Lösung hinzugefügt. Dieses wurde wiederholt, sobald die isometrische Spannungskurve wieder abgesunken war. Jede Glaskammer wurde mit frischer Krebs-Puffer gewaschen und es wurde erneut 1 ml KCl-(2M)-Lösung hinzugegeben. Der sich einstellende maximale isometrische Spannungswert wurde mit 100 Prozent gleich gesetzt und die Glaskammer wurde wieder mit Puffer gewaschen. KCl diente hierbei dazu, die einzelnen Muskelfilamente des Aortenringes zu aktivieren. Um eine konstante Vasokonstriktion zu erreichen wurde Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) hinzugefügt, bis eine isometrische Spannung von ca. 2,2 g erreicht wurde. Zur Untersuchung der endothelabhängigen Vasodilatation wurde anschließend kumulativ Acetylcholin (ACh) in Konzentrationsschritten von 0,5 logM dazu gegeben, die zu Endkonzentrationen von 10<sup>-9</sup> bis 10<sup>-5,5</sup> logM führten. Die Glaskammern wurden im Anschluss gewaschen und es wurde erneut eine Vasokonstriktion mit PGF<sub>2α</sub> herbeigeführt. Für die Bestimmung der endothelunabhängigen Vasodilatation wurde kumulativ Glyceroltrinitrat (NTG) in 0,5 log Schritten zum Puffer hinzu pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 10<sup>-9</sup> bis 10<sup>-4,5</sup> erreicht wurde. Zuletzt wurden die pro zugegebenes vasodilatierendes Agens gemessenen Relaxationen in einer Dosis-Wirkungskurve zusammengefasst und als Grad der Relaxation relativ zur maximalen PGF<sub>2α</sub>-Antwort in Prozent dargestellt. Eine

100%ige Relaxation würde dementsprechend den Wert der isometrischen Spannung vor der Vasokonstriktion mit  $\text{PGF}_2\alpha$  bedeuten.

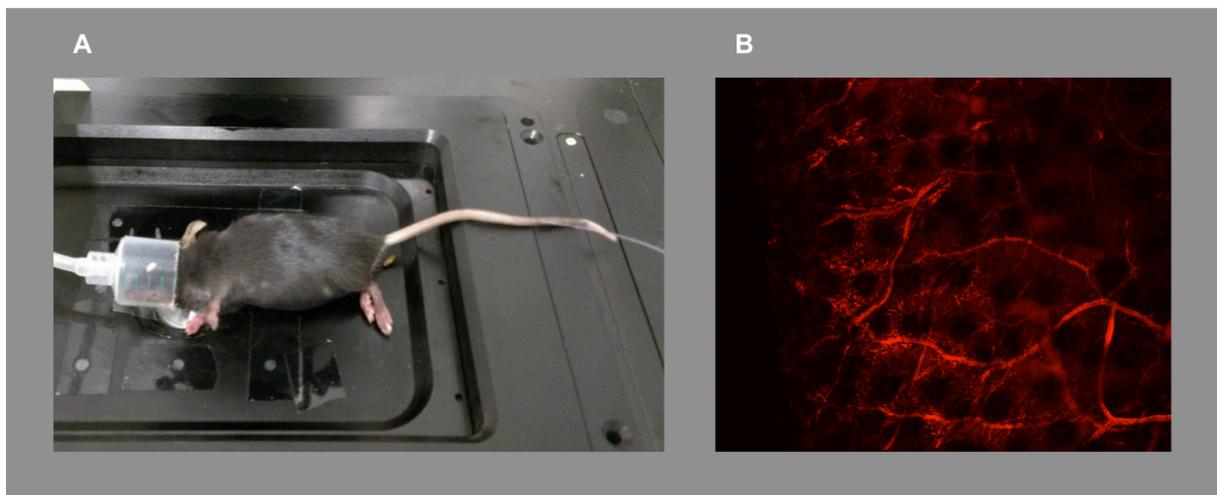
### **3.1.7 Intravitalmikroskopische Analyse der pRBZ-Adhäsion und des Blutflusses in den Blutgefäßen des Ohres**

In der intravitalmikroskopischen Analyse sollten die Blutgefäße des Ohres betrachtet werden. Eine Verwendung des Ohres als anatomischen Ort für die Analyse ermöglicht eine nicht invasive Methode zur Untersuchung von kleinen peripheren Blutgefäßen. Zur Vorbereitung für den Versuch wurde jede zu untersuchende Maus mit Hilfe eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches (100 %  $\text{O}_2$ , 1-2 % Isofluran) anästhesiert. Für die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurde eine Heizplatte (37 °C) verwendet und zum Schutz der Augen Bepanthen®-Augensalbe aufgebracht. Um eine Störung durch die Autofluoreszenz der Haare im Intravitalmikroskop zu vermeiden, wurden die Haare an der Außenseite des Ohres der Maus 2 Tage vor der Versuchsdurchführung mit einer Enthaarungscreme depiliert. Anschließend wurde der Hautbereich mit einem Desinfektionsmittel desinfiziert und gleichzeitig Reste der Creme entfernt.

Am Versuchstag wurde zwei Mäusen, die als Blutspendermäuse dienten, retrobulbär Blut entnommen und das Blut in einem EDTA-Röhrchen gesammelt. 50  $\mu\text{l}$  Blut wurde mit 450  $\mu\text{l}$  NaCl (0,9 %)-Lösung und 4  $\mu\text{l}$  eines DNA-Farbstoffes (Syto16) gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach Abzentrifugation (300 g, 22 °C, fünf Minuten) und zweimaligem Waschen mit NaCl (0,9 %)-Lösung wurden zu dem Zellpellet 5  $\mu\text{l}$  einer 4 mmol Stocklösung von Calcein Red und 2000  $\mu\text{l}$  Probenecid (2,5mM) in DPBS-Lösung hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation von 25 Minuten, Abzentrifugation (300 g, 22 °C, fünf Minuten) und zweimaliges Waschen mit NaCl (0,9 %)-Lösung. Nachfolgend wurde das Zellpellet in 1000  $\mu\text{l}$  NaCl (0,9 %)-Lösung resuspendiert.

Die zu untersuchende Maus wurde anästhesiert und ein Katheter in die Vene des Schwanzes gelegt. Es wurde nicht die gleiche Maus verwendet, an der zuvor eine Blutentnahme vorgenommen worden ist. Die Anästhesierung erfolgte bei dem Versuch zum Vergleich von naiven und infizierten WT-Mäusen i.p. mit 150-200  $\mu\text{l}$  eines Ketamin-Rompun-Gemisches (1,2 ml Ketamin 100 mg/ml + 0,8 ml Rompun 2% + 8 ml NaCl (0,9 %)-Lösung). Zum Vergleich von infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen wurde eine Inhalationsnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (100 %  $\text{O}_2$ ,

1-2 % Isofluran) verwendet. Die Maus wurde auf dem Mikroskoptisch fixiert und erhielt Augensalbe zum Schutz der Augen. Die Belüftung der Mikroskopkammer sorgte für eine konstante Temperatur von 37 °C. Um die Blutgefäße im Intravitalmikroskop besser sichtbar zu machen, wurde über den Katheter intravenös (i.v.) 20 µl einer in 200 µl NaCl (0,9 %)-Lösung gegebenen Stocklösung von 70kDa Dextran-Texas-Red injiziert (Abb. 3.1). Nach Visualisierung der peripheren Blutgefäße des Ohres wurde i.v. 400 µl der resuspendierten RBZ-Lösung über einen Spritzenperfusor langsam injiziert. Nachfolgend wurde pro venösem Blutgefäß ein 30 Sekunden langes Video aufgenommen, welches für die spätere Auswertung mit der NIS-Elements Microscope Imaging Software verwendet wurde.



**Abb. 3.1: Intravitalmikroskopie der Ohrblutgefäße.** Gezeigt ist die fixierte Maus auf dem Mikroskoptisch (A). Über einen Schlauch erfolgt die Inhalationsnarkose, an der Vene des Schwanzes ist ein Katheter angebracht. Des Weiteren ist eine Übersicht der mit Dextran-Texas-Red angefarbten Blutgefäße im Ohr der Maus gezeigt (B).

Für jedes Blutgefäß wurden der Gefäßdurchmesser und die Geschwindigkeit von fünf RBZ ermittelt die mit dem Calcein Red-Farbstoff angefarbt wurden. Aus diesen wurde die mittlere RBZ-Geschwindigkeit berechnet. Über den Gefäßdurchmesser und die mittleren RBZ-Geschwindigkeit wurde dann der Blutfluss mit folgender Formel errechnet:

$$\vartheta_B = \frac{\pi}{4} 10^{-6} \bar{\vartheta} d^2$$

$$\vartheta_B = \text{Blutfluss [nl/s]}$$

$$\bar{\vartheta} = \text{mittlere RBZ-Geschwindigkeit [\mu\text{m/s}]}$$

$$d = \text{Gefäßdurchmesser [\mu\text{m}]}$$

Des Weiteren wurde die Anzahl der mit dem DNA-Farbstoff angefärbten pRBZ, die während der 30 Sekunden an das Endothel adhärerten, dokumentiert.

### **3.1.8 Depletion von Neutrophilen durch Antikörper**

Zur Depletion von Neutrophilen *in vivo* wurden zwei verschiedene Antikörper benutzt, anti-GR-1 und anti-Ly6-G. Ein Tag vor der Infektion wurde den Mäusen 300 µg anti-GR-1 i.p. gespritzt und die Depletion am nächsten Tag in der Durchflusszytometrie überprüft. Als Kontrollantikörper wurde 300 µg Ratten IgG verwendet. Anti-GR-1 depletiert nicht nur Neutrophile, sondern auch Monozyten. Für eine reine Depletion der Neutrophilen wurde den Mäusen i.p. 500 µg anti-Ly6-G, bzw. Ratten IgG als Kontrolle, zwei Tage sowie einen Tag vor Infektion verabreicht.

## **3.2 Zellbiologische Methoden**

### **3.2.1 Aufreinigung von Milzzellen**

Zur Präparation muriner Milzzellen wurden Mäusen nach der Abtötung mit CO<sub>2</sub> die Milzen entnommen und in RPMI-Medium durch ein Zellsieb (0,2 µm) zerrieben. Nach der Zentrifugation (1400 rpm, 4 °C, fünf Minuten) der Einzelzellsuspension wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in 5 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und für acht Minuten bei RT inkubiert. Die Lyse wurde durch 10 ml DPBS-Lösung abgestoppt. Es folgte eine erneute Zentrifugation und zweimaliges Waschen mit je 5 ml Medium. Danach wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### **3.2.2 Durchflusszytometrie**

Die Methode der Durchflusszytometrie ist ein Messerverfahren, welches eine individuelle und effiziente Analyse vieler Zellen ermöglicht. Dabei können spezifisch extra- und intrazelluläre Moleküle der Zellen durch einen fluorochrommarkierten Antikörper angefärbt werden. Zudem kann eine Einteilung einer Zellsuspension nach Größe und Granularität über Lichtbeugung und Reflexion der Zellen erfolgen. Die suspendierten Einzelzellen werden dabei über einen laminaren Strom in die Detektionskammer eines Durchflusszytometers geführt. Dort werden sie durch monochromatische Laserstrahlen angeregt. Die relative Größe der Zelle wird mittels des

Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* = FSC) und die relative Granularität über das Seitwärtsstreulicht (*side scatter* = SSC) quantifiziert. Zugleich wird die Fluoreszenzintensität der Zellen, die den fluorochrommarkierten Antikörper gebunden haben, gemessen. Diese Fluoreszenzintensität ermöglicht einen Aufschluss über die Expressionsstärke des zu analysierenden Moleküls.

Für die Überprüfung der *in vivo* Depletion von Neutrophilen durch anti-GR-1 und anti-Ly6-G wurde den Mäusen am Tag nach der letzten Antikörpergabe 10-20 µl Blut entnommen und in 1000 µl DPBS-Lösung aufgenommen. Nach der Zentrifugation (600 g, 4 °C, fünf Minuten) erfolgte eine Inkubation mit Erythrozytenlysepuffer für sechs Minuten. Es folgte eine weitere Zentrifugation (600 g, 4 °C, fünf Minuten) und das Abpipettieren des Überstandes und zweimaliges Waschen mit DPBS-Lösung. Der Zellrückstand wurde mit anti-GR-1 und anti-CD11b bzw. mit anti-Ly6-G und anti-Ly6-C und Fc-Block für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Bei Fc-Block handelt es sich um den Zellkulturüberstand einer Hybridomzelllinie, die monoklonale Antikörper gegen die murinen Fcγ-Rezeptorketten produziert. Der Fc-Block wird verwendet, um unspezifische Oberflächenproteinbindung des für die Analyse eingesetzten fluorochrommarkierten Antikörpers an den Fcγ-Rezeptor zu unterbinden. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal gewaschen und in 150 µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

Bei der Analyse der inflammatorischen T-Zellantwort wurden zunächst  $1 \times 10^6$  Milzzellen in RPMI-Medium mit 50 ng/ml Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA) und 400 ng/ml Ionomycin für vier Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. PMA aktiviert die Proteinkinase C, da es eine Strukturähnlichkeit zum natürlichen Liganden Diacylglycerol aufweist. Ionomycin ist als Ionophor in der Lage, die intrazelluläre Calciumkonzentration zu erhöhen. Die Kombination aus PMA und Ionomycin dient dazu, den Effekt der T-Zell-Rezeptorstimulation zu simulieren. Die letzten drei Stunden der Stimulation erfolgten dabei in Anwesenheit von 2 µM Monensin. Monensin inhibiert den intrazellulären Proteintransport. Dies führt zu einer Anreicherung von Zytokinen im Golgi-Apparat und dadurch zu einer verbesserten Detektierbarkeit der Zytokine. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit anti-CD4 und anti-CD8 in Fc-Block bzw. mit anti-CD3 und anti-CD8 in Fc-Block gefärbt (4 °C, 45 Minuten). Nach einem weiterem Waschschrift erfolgte eine Inkubation mit

FoxP3-Fix/Perm (RT, 40 Minuten) zur Zellpermeabilisierung. Die Zellen wurden mit FoxP3-Perm-Waschpuffer zweimal gewaschen und intrazellulär mit anti-INF $\gamma$  und anti-TNF $\alpha$  bzw. mit anti-INF $\gamma$  und anti-TNF $\alpha$  und anti-IL-10 gefärbt (RT, 45-60 Minuten). Zuletzt wurden die Zellen dreimal gewaschen, in 150  $\mu$ l Perm-Waschpuffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo.

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 MPO-Konzentrationsbestimmung von humanen und murinen Plasmaproben mittels *enzyme-linked absorbant assay* (ELISA)

Die Plasmaproben wurden von Patienten mit importierter *P. falciparum*-Malaria, nach deren schriftlicher Einwilligung, von der Sektion für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg, erhalten. Die Patienten wurden dort vor Ort eingehend untersucht und die Schwere der Erkrankung, gemäß der Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und internationaler Gesundheit e.V. (DTG) (AWMF Nr. 042/001 – S1-Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Malaria), in komplizierte und unkomplizierte Malaria unterteilt. Freiwillige gesunde Probanden wurden als Kontrollgruppe verwendet. Die Abnahme der Blutproben erfolgte im Zeitraum zwischen Juni 2011 und November 2013 unter Zustimmung der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer.

Für den Erhalt von murinen Plasmaproben wurde *PyNL*-infizierten WT-Mäusen Blut durch Herzpunktion entnommen. Zur Konzentrationsbestimmung von MPO aus den Plasmaproben wurde ein *Human-MPO-ELISA*- bzw. *Mouse-MPO-ELISA-Kit* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Kit-Anleitung des Herstellers und beruhte auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip. Dabei wurde eine mit MPO-spezifischen-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte verwendet. Darauf wurden die zu untersuchende Plasmaprobe und eine Standardreihe aufgetragen. Das darin enthaltende MPO band an den Antikörper. Nach einem Waschschrift wurde ein biotinyliertes Indikatormolekül dazugegeben, welches an das gebundene MPO band. Es wurde erneut gewaschen und ein Konjugat aus Streptavidin und Peroxidase hinzugefügt. Dieses band an das Indikatormolekül. Nach weiterem Waschen erfolgte eine Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB), das mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat reagierte.

Die Reaktion wurde nach vorgegebener Inkubationszeit durch Oxalsäure abgestoppt und die Absorption von 450 nm an einem ELISA-Photometer gemessen. Die Berechnung der MPO-Konzentration der Proben erfolgte anhand der Standardkurve.

### **3.3.2 Nitrat/Nitrit-Bestimmung aus dem Plasma**

Die Plasmaproben von naiven sowie infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen wurden auf die Konzentration von Nitrat/Nitrit untersucht. Für diesen Test wurde das *Nitrate/Nitrite-Colometric-Assay-Kit* verwendet. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Nitrat wurde dabei im ersten Schritt durch die Nitrat-Reduktase zu Nitrit reduziert. Im zweiten Schritt wurde Sulfanilamid (Griess-Reagenz 1) und N-(1-Naphthyl)ethyldiamin (Griess-Reagenz 2) hinzugegeben. Dies bewirkte die Reaktion zu einem farbigen Azo-Produkt, welches bei 540 nm detektiert wurde. Über eine Standardreihe mit Nitrat wurde die Nitrat/Nitrit-Konzentration der Probe ermittelt.

### **3.3.3 Messung von Zytokinkonzentrationen durch *Cytometric Bead Array* (CBA)**

Das System des CBA ermöglicht den Einsatz von nur geringen Probenmengen und die simultane Messung verschiedener Zytokine. Dabei werden mit Antikörper gekoppelte Mikropartikel eingesetzt. Der Antikörper bindet spezifisch einen Analyten aus der Probe. Zur Detektion wird dann ein zweiter, mit Phycoerythrin (PE)-gekoppelter Antikörper, hinzugegeben. Dies ist ein fluoreszierender Antikörper, der als Reportermolekül dient. Während einer Inkubationsphase wird ein Sandwichkomplex aus Analyt und den Antikörpern gebildet und daraufhin mittels Durchflusszytometrie die Fluoreszenzintensität gemessen. Jede Mikropartikel-Population hat dabei eine spezifische Fluoreszenzintensität, die es möglich macht, mehrere Analyten gleichzeitig in der Probe zu messen. Aus Plasmaproben von infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen wurden simultan die Konzentration von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-10 bestimmt. Die Verwendung des CBA-Kits erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Die Proben wurden zuvor im Verhältnis 1:4 verdünnt. Die Auswertung erfolgte mit der FCAP-Array™-Software (Version 3.0).

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Isolation von *messenger* RNA (mRNA) aus Herz und Lunge

Das Herz und die Lunge wurden den Mäusen sechs Tage nach Infektion mit *PyNL* entnommen und in 5 ml PBS aufgenommen, um anhaftende Blut- oder Haarreste abzuspielen. Anschließend wurden die Organe auf Zellstoff abgetupft und bei -70 °C eingefroren. Die Isolation der mRNA erfolgte nach dem Auftauen auf RT. Dafür wurde das Organ mit 1 ml TRIzol® versetzt und mit einem Pistill zerkleinert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde die Organsuspension 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt und daraufhin für drei Minuten bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (12000 g, 4 °C, 15 Minuten) und das Abpipettieren der wässrigen Phase, welche die mRNA enthielt. Zu dieser wurde dann 0,5 ml 100%iges Isopropanol gegeben. Nach einer Inkubation von zehn Minuten erfolgte eine weitere Zentrifugation (12000 g, 4 °C, zehn Minuten). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das mRNA-haltige Pellet wurde mit 1 ml 75 %igem Ethanol versetzt, gemischt und zentrifugiert (7500 g, 4 °C, fünf Minuten). Das erhaltene Pellet wurde zehn Minuten bei RT getrocknet. Danach wurde dieses in 100 µl RNase-freiem Ampuwa® resuspendiert, 12 Minuten bei 55 °C inkubiert und die mRNA-Konzentration am Nanodrop gemessen. Die mRNA wurde bis zur weiteren Verwendung wieder bei -70 °C eingefroren.

#### 3.4.2 Komplementäre DNA (cDNA)-Synthese

Für die Herstellung der cDNA wurde eine retrovirale reverse Transkriptase verwendet. Dieses Enzym ist in der Lage aus mRNA eine cDNA zu synthetisieren. Zunächst wurden pro Ansatz 12 µl einer Lösung von 1000 ng mRNA gelöst in Ampuwa® mit 1 µl Oligo(dT)-Nukleotid für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. Die Inkubation ermöglicht das Aufbrechen der Sekundärstrukturen der mRNA und die Anlagerung des Oligo(dT)-Primer an den Poly-(A)-Schwanz der mRNA. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Eis wurden 8 µl eines Reaktionsmixes hinzugegeben, bestehend aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Lösung (10mM) und 1 µl reverser Transkriptase. Es folgte eine Inkubation von 60 Minuten bei 42 °C. Die Reaktion wurde anschließend durch Inkubation bei 70 °C für 15 Minuten beendet und die generierte cDNA bei -20 °C eingefroren.

### 3.4.3. Quantitative *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient als Methode zur Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz *in vitro*. Zur Erkennung dieses bestimmten DNA-Abschnittes werden Oligonukleotide eingesetzt, welche an die Start- und Endsequenz des zu amplifizierenden Abschnittes binden. Der Amplifikationsprozess geschieht in drei Schritten. Als Erstes wird die DNA auf 95 °C erhitzt um den Doppelstrang zu trennen. Es folgt ein Abkühlen, um das Anlagern der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Enden des Zielgens zu ermöglichen. Die Temperatur ist dabei von den jeweils eingesetzten Primern abhängig. Im dritten Schritt erfolgt eine DNA-Synthese durch Elongation mittels Polymerase in 5'-3' Richtung. Mit jedem Amplifikationszyklus wird dabei die Zielsequenz verdoppelt. Zur Quantifizierung des Zielgens wird außerdem eine PCR eines konstitutiv exprimierten Referenzgens durchgeführt. Dadurch wird die Menge des jeweils exprimierten Zielgens normalisiert.

In dieser Arbeit wurde mittels der TaqMan-PCR die Expression der Gene quantifiziert welche für iNOS, eNOS und NADPH Oxidase (NOX4) kodieren. Als Referenzgen wurde das kodierende Gen für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse welches konstitutiv exprimiert wird, verwendet. Das TaqMan-Prinzip beruht auf sequenzspezifischen Oligonukleotiden (TaqMan-Sonden), die mit zwei Farbstoffen markiert sind: einem fluoreszierenden Reporter und einem *Quencher*. Hydrolyse der Sonden durch die Polymeraseaktivität führt zur Freisetzung des Reporterfluorophors und somit zu einer erhöhten Reporter-Fluoreszenz. Pro Ansatz wurden 9 µl cDNA (1:50 Verdünnung), 10 µl TaqMan-Universal-PCR-Mastermix und 1 µl Primer-Mix eingesetzt. Der Temperaturverlauf wurde wie folgt gewählt: 20 Sekunden bei 95 °C, 40 Wiederholungen von je 1 Sekunde bei 95 °C und 20 Sekunden bei 60 °C. Die Analyse der Daten erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

## 3.5 Statistische Analysen

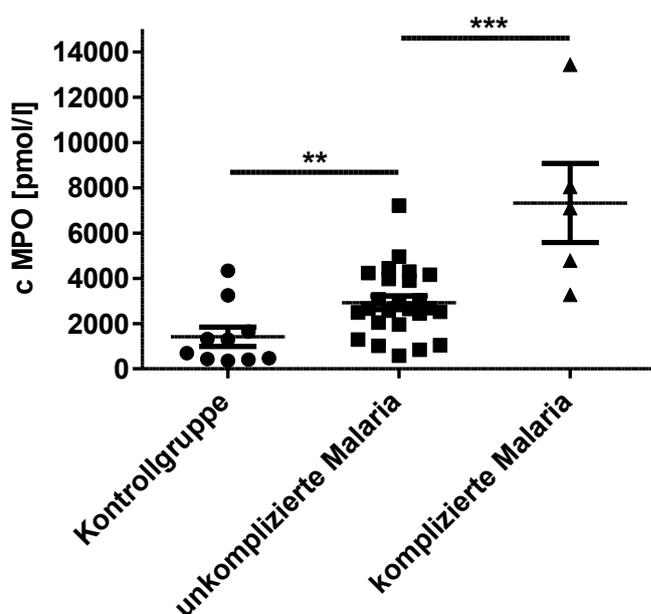
Für die statistische Auswertung der Experimente wurde die Software Graph Pad Prism 5 benutzt. Es wurden als parametrischer Test der Student's-*t*-Test (*unpaired*) und die *two-way* ANOVA (*repeated measures*, mit Bonferroni *post test*)-Analyse verwendet. Des Weiteren wurde der Mann-Whitney Test als nicht parametrischer Test eingesetzt. Die statistische Signifikanz wurde wie folgt deklariert: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Bedeutung der MPO für die Malariainfektion

#### 4.1.1 Bestimmung der MPO-Plasmaspiegel bei der *P. falciparum*-Infektion

Zunächst sollte untersucht werden, in welchem Maße eine Infektion mit *P. falciparum* die Konzentration von MPO im Plasma beeinflusst. Dazu wurden die MPO-Spiegel von Plasmaproben von Patienten mit importierter Malaria sowie von gesunden Probanden (Kontrollgruppe) gemessen. Die Patienten mit importierter Malaria wurden in zwei Gruppen unterteilt, unkomplizierte und komplizierte Malaria.



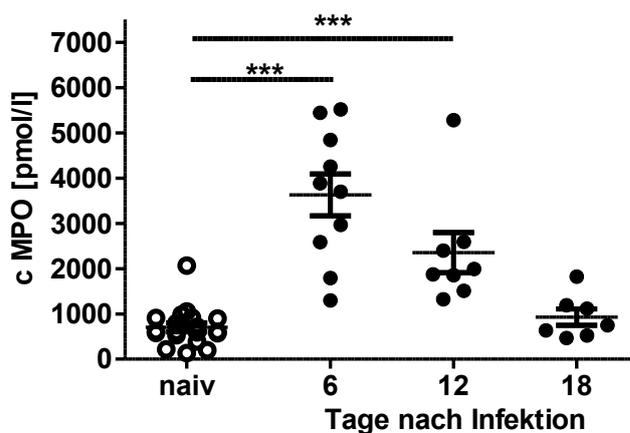
**Abb. 4.1: MPO-Plasmaspiegel von Patienten mit importierter *P. falciparum*-Infektion im Vergleich zu gesunden Probanden.**

Patienten mit importierter Malaria wurden in unkomplizierte und komplizierte Malaria unterteilt. Die MPO-Plasmakonzentration der Patienten sowie einer Kontrollgruppe, bestehend aus gesunden Probanden, wurde mittels ELISA ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n_{\text{Kontrollgruppe}}=10$ ,  $n_{\text{unkomplizierte Malaria}}=25$ ,  $n_{\text{komplizierte Malaria}}=5$ ). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's-*t*-Test (*unpaired*): \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen der MPO im Plasma der Patienten mit einer unkomplizierten Malaria gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 4.1). Die Patienten mit einer komplizierten Malaria zeigten eine weitere Erhöhung der MPO-Plasmaspiegel im Vergleich zu Patienten mit unkomplizierter Malaria.

#### 4.1.2 Bestimmung der MPO-Plasmaspiegel bei *PyNL*-infizierten WT-Mäusen

Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung der MPO-Plasmaspiegel nicht nur bei der humanen Malaria, sondern auch im Mausmodell zu beobachten ist, wurden WT-Mäuse i.p. mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infiziert. An Tag 6 und 12 nach Infektion konnten im Vergleich mit naiven Mäusen eine signifikante Erhöhung der MPO-Plasmakonzentration beobachtet werden (Abb. 4.2). An Tag 18 nach Infektion näherten sich die MPO-Spiegel wieder den Werten von naiven WT-Mäusen an.

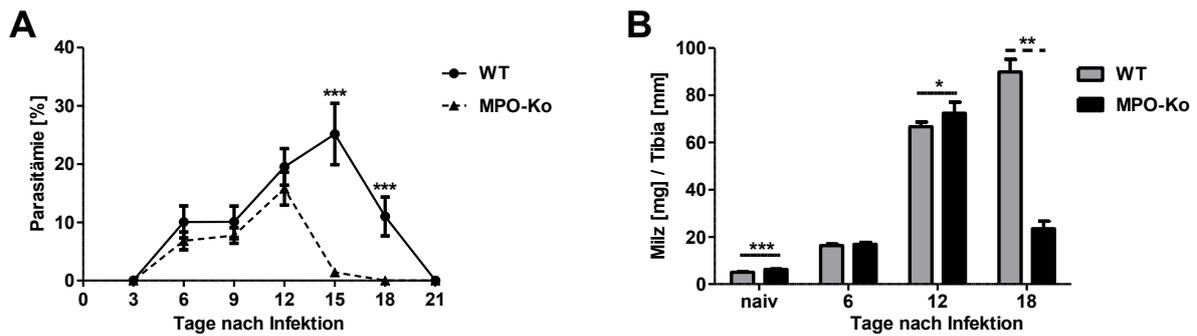


**Abb. 4.2: MPO Plasmaspiegel von naiven WT-Mäusen und WT-Mäusen nach Infektion mit *PyNL* Blutphaseparasiten.**

WT-Mäuse wurden i.p. mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde die MPO-Plasmakonzentration mittels ELISA analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (zusammengefasste Daten,  $n_{\text{naiv}}=19$ ,  $n_{\text{Tag 6}}=10$ ,  $n_{\text{Tag 12}}=8$ ,  $n_{\text{Tag 18}}=7$ ). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's-*t*-Test (*unpaired*): \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

#### 4.1.3 Auswirkungen der MPO-Defizienz auf den Infektionsverlauf von *PyNL*

Im nächsten Schritt sollte der Infektionsverlauf bei der murinen Malaria in Abwesenheit von MPO näher betrachtet werden. MPO führt, wie beschrieben, durch ihre katalytische Aktivität zu einer Erhöhung von ROS. Für ROS wird eine antiparasitäre Wirkung postuliert. Dies bedeutet, dass ein erhöhter MPO Spiegel auch zur verbesserten Parasitenkontrolle beitragen könnte. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde das Infektionsmodell mit *PyNL* verwendet. Die Mäuse entwickeln dabei eine hohe Parasitämie, die sie selbstständig nach 21 Tagen wieder vollständig eliminieren können. WT- und MPO-Ko-Mäuse wurden für diesen Versuch i.p. mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infiziert. An den Tagen 3, 6, 12, 18 und 21 wurde die Parasitämie bestimmt und im zeitlichen Verlauf dargestellt (Abb. 4.3 A).



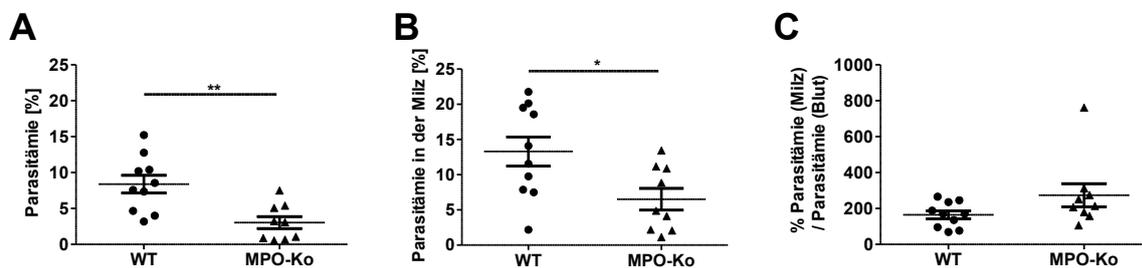
**Abb. 4.3: Parasitämieverlauf und Milzvergrößerung in WT- und MPO-Ko-Mäusen während der Infektion mit PyNL-Blutphaseparasiten.**

WT- und MPO-Ko-Mäuse wurden i.p. mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ infiziert. Während des Verlaufs der Infektion wurde die Parasitenlast bestimmt (zusammengefasste Daten;  $n=12$ ) (A). Für die Untersuchung der Milzvergrößerung wurde von naiven Mäusen sowie Mäusen an Tag 6, 12 und 18 nach Infektion das Milzgewicht und die Tibialänge bestimmt und der Quotient berechnet (zusammengefasste Daten;  $n_{\text{naiv}}=18-19$ ,  $n_{\text{Tag 6}}=45$ ,  $n_{\text{Tag 12}}=12$ ,  $n_{\text{Tag 18}}=6$ ) (B). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

Während der Beginn der Parasitämiekurve von infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen ähnlich verlief, konnten MPO-Ko-Mäuse jedoch die Parasitenlast früher vollständig beseitigen als die WT-Mäuse. Des Weiteren wurde die für die Malariaerkrankung charakteristische Milzvergrößerung untersucht. Dafür wurde der Quotient aus der Milzgröße und der Tibialänge verwendet (Abb. 4.3 B). Interessanterweise zeigten die Milzen naiver MPO-Ko-Mäuse eine signifikante Vergrößerung gegenüber den Milzen naiver WT-Mäuse. Dieser Unterschied war an Tag 6 nach Infektion nicht mehr sichtbar. An Tag 12 nach Infektion wiesen die mit PyNL infizierten MPO-Ko-Mäuse eine erhöhte Milzvergrößerung gegenüber den WT-Mäusen auf. Zum Ende des Infektionsverlaufes hin nahm die Milzgröße der MPO-Ko-Mäuse deutlich ab während die der WT-Mäuse weiterhin anstieg. Dieses könnte darauf beruhen, dass an Tag 18 nach Infektion in den MPO-Ko-Mäusen keine Parasiten im Blut mehr detektiert werden konnten und sich die Milz bereits in einer Regenerationsphase befindet.

Die verstärkte Milzvergrößerung in den MPO-Ko-Mäusen könnte durch eine erhöhte Parasiteneliminierung in der Milz bedingt sein. Um diesen möglichen Effekt eingehender zu untersuchen, wurde die Parasitämie des peripheren Blutes und der roten Pulpa der Milz analysiert. WT- und MPO-Ko-Mäuse wurden i.p. mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ infiziert und an Tag 6 nach Infektion die Parasitämie bestimmt (Abb. 4.4 A). Die Milz wurde entnommen und die Parasitämie der noch intakten pRBZ in der roten Pulpa der Milz mittels Anfertigung eines Tupfpräparates mikroskopisch bestimmt (Abb. 4.4 B). Die Parasitämie in der Milz und der des peripheren Blutes wurden ins prozentuale

Verhältnis gesetzt um zu analysieren, ob in den MPO-Ko-Mäusen vermehrt pRBZ in der Milz verblieben und sie deshalb eine geringere Parasitämie im Blut hatten (Abb. 4.4 C). Es war zu erkennen, dass die infizierten MPO-Ko-Mäuse sowohl eine geringere Parasitämie im Blut als auch in der Milz aufwiesen. Das prozentuale Verhältnis von der Parasitämie in Milz und Blut war bei MPO-Ko-Mäusen leicht, jedoch nicht signifikant erhöht. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass MPO-Ko-Mäuse eine geringere Parasitämie bzw. verbesserte Parasiteneliminierung nach *PyNL* Infektion aufwiesen als WT-Mäuse. Es konnte nicht belegt werden, dass dieses aufgrund einer erhöhten Beseitigung der Parasiten in der Milz geschah.



**Abb. 4.4: Untersuchung der Parasitenlast in der Milz im Vergleich zur Parasitämie des Blutes.**

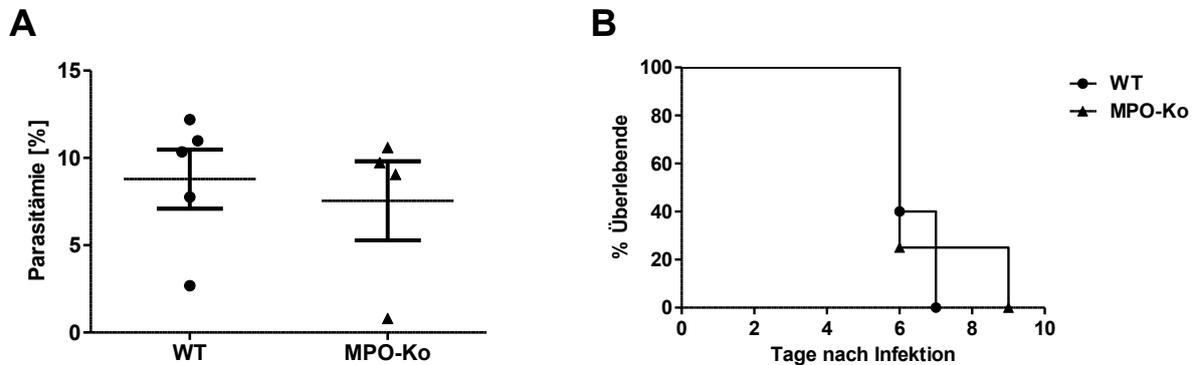
WT- und MPO-Ko-Mäuse wurden i.p. mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infiziert. Am Tag 6 nach Infektion wurde die Milz entnommen und die Parasitämie in dem Blut und der Milz mikroskopisch ermittelt. Gezeigt ist die Parasitämie des Schwanzblutes (A) und in der roten Pulpa der Milz (B). Daraufhin wurde das prozentuale Verhältnis aus Parasitämie in Blut und Milz bestimmt (C). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (n=9-10). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

## 4.2 Einfluss der MPO auf die Endothelfunktion und Mikrozirkulation

### 4.2.1 Auswirkung der MPO-Defizienz auf die Inzidenz von EZM

Eine gestörte Endothelfunktion und Mikrozirkulation kann in der Malaria zu lebensgefährlichen Komplikationen wie z.B. der ZM führen. Im Modell der EZM wurde untersucht, ob eine MPO-Defizienz die Inzidenz der EZM beeinflusst. WT- und MPO-Ko-Mäuse wurden dafür mit  $10^5$  *PbA* pRBZ infiziert. An Tag 5 nach Infektion wurde die Parasitämie ermittelt. Diese zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen (Abb. 4.5 A). Die Inzidenz der EZM wurde durch die Feststellung des Auftretens von neurologischen Symptomen bestimmt. Alle infizierten WT- und MPO-Ko-Mäuse zeigten im für EZM charakteristischen Zeitraum neurologische

Symptome (Abb. 4.5 B). Es konnte daher keine Auswirkung einer MPO-Defizienz auf die Inzidenz der EZM im Verlauf der *PbA*-Infektion beobachtet werden.



**Abb. 4.5: Parasitämie und Inzidenz von EZM nach einer Infektion mit *PbA*-Blutphaseparasiten.**

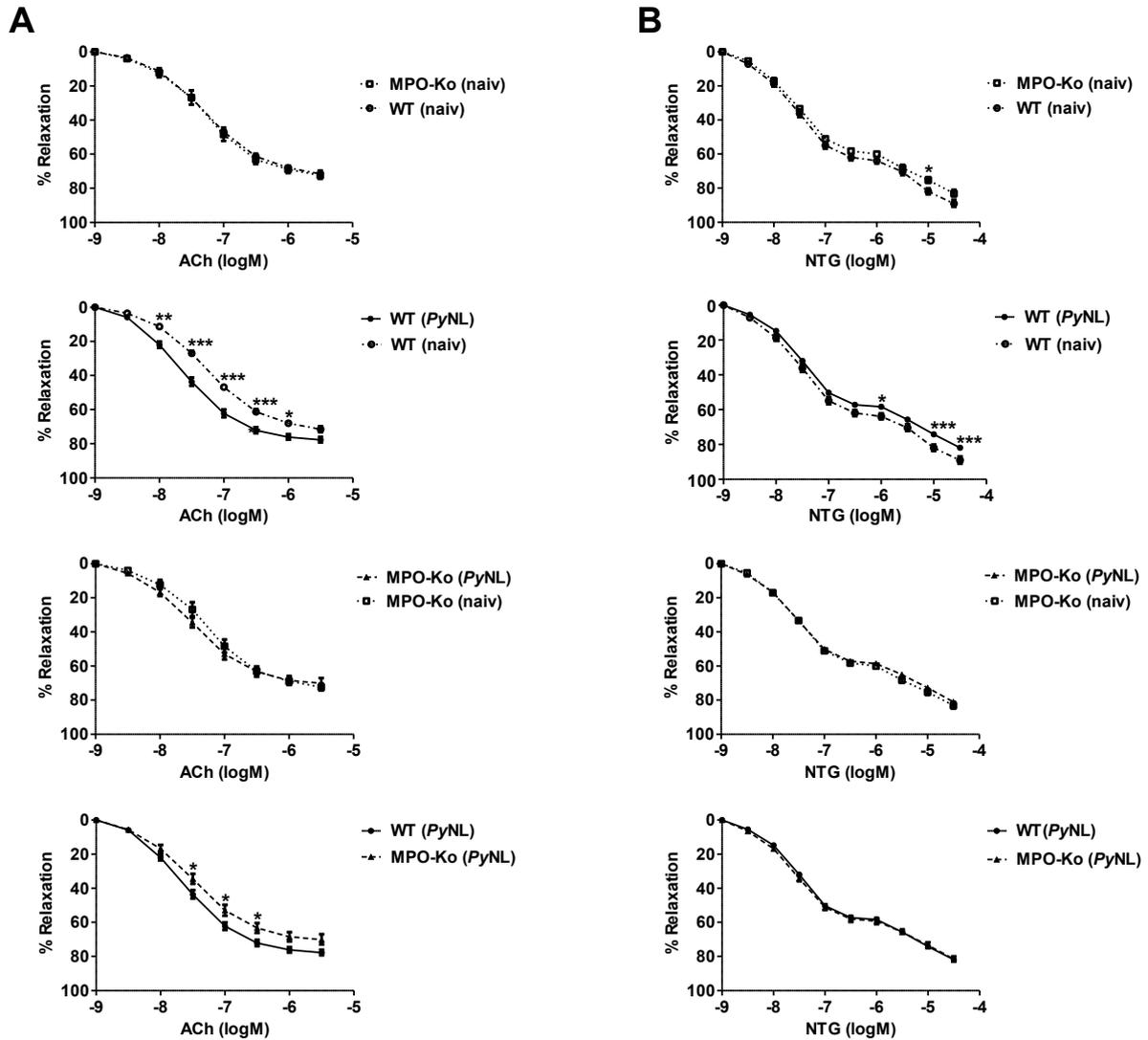
WT- und MPO-Ko-Mäuse wurden i.p. mit  $10^5$  *PbA* pRBZ infiziert. Am Tag 5 nach Infektion wurde die Parasitämie aus dem Schwanzblut bestimmt (A). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n=4-5$ ). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Das Auftreten von EZM wurde, über den Verlauf der Infektion hin, anhand des Auftretens von neurologischen Symptomen analysiert (B).

#### 4.2.2 Einfluss der MPO-Defizienz auf die NO abhängige Relaxation der Aorta

Da MPO in Zusammenhang mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen u.a. durch eine Beeinflussung des Signalmoleküls NO steht, sollte untersucht werden ob eine MPO-Defizienz die endothelabhängige Vasodilatationsfähigkeit beeinflusst. Daraus sollten weitere Erkenntnisse über mögliche Auswirkungen von MPO auf die Endothelfunktion in der Malaria gewonnen werden.

Nach der Präparation der Aorta wurden Aortensegmente von naiven und mit  $2 \times 10^6$  PyNL Stabilat-pRBZ infizierten WT-bzw. MPO-Ko-Mäusen in ein Organbad eingespannt. Diese Aortensegmente wurden daraufhin mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  kontrahiert. Durch die Messung der isometrischen Spannung konnte nach kumulativer Zugabe von ACh die NO abhängige Relaxation analysiert werden. Diese gemessene Relaxation für jede Konzentrationsstufe ist als Dosis-Wirkungs-Kurve gezeigt (Abb. 4.6 A). Eine 100%ige Relaxation würde dem Wert der isometrischen Spannung vor der Vasokonstriktion mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  entsprechen. Die endothelabhängige Vasodilatation von naiven WT-Mäusen entsprach der von naiven MPO-Ko-Mäusen. Bei infizierten WT-Mäusen ließ sich eine verbesserte Relaxation gegenüber naiven WT-Mäusen erkennen, wohingegen die Analyse von infizierten zu naiven MPO-Ko-Mäusen keine Unterschiede erbrachte. Im Vergleich der beiden infizierten Mausgruppen untereinander war eine verbesserte Relaxation der WT- gegenüber den MPO-Ko-Mäusen sichtbar. Dieses könnte auf einer

verstärkten Verfügbarkeit des für die endothelabhängige Vasodilatation benötigten NO zurückzuführen sein.



**Abb. 4.6: Effekt des endothelabhängigen Vasodilatators ACh und des endothelunabhängigen Vasodilatators NTG auf die Relaxation von Aortensegmenten von naiven sowie PyNL-infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen.**

Gezeigt sind die Dosis-Wirkungs-Kurven der Vasodilatation von Aortensegmenten durch ACh (A) und NTG (B). Es wurde jeweils die Relaxation naiver Mäuse gegen mit  $2 \times 10^6$  PyNL-Stabilat-pRBZ infizierte WT-bzw. MPO-Ko-Mäuse verglichen, als auch die naiven bzw. infizierten Mausgruppen untereinander. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (zusammengefasste Daten;  $n_{\text{naiv}}=6-8$ ,  $n_{\text{PyNL}}=14-19$ ). Die statistische Analyse erfolgte mit *two-way ANOVA (repeated measures, mit Bonferroni post test)*: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

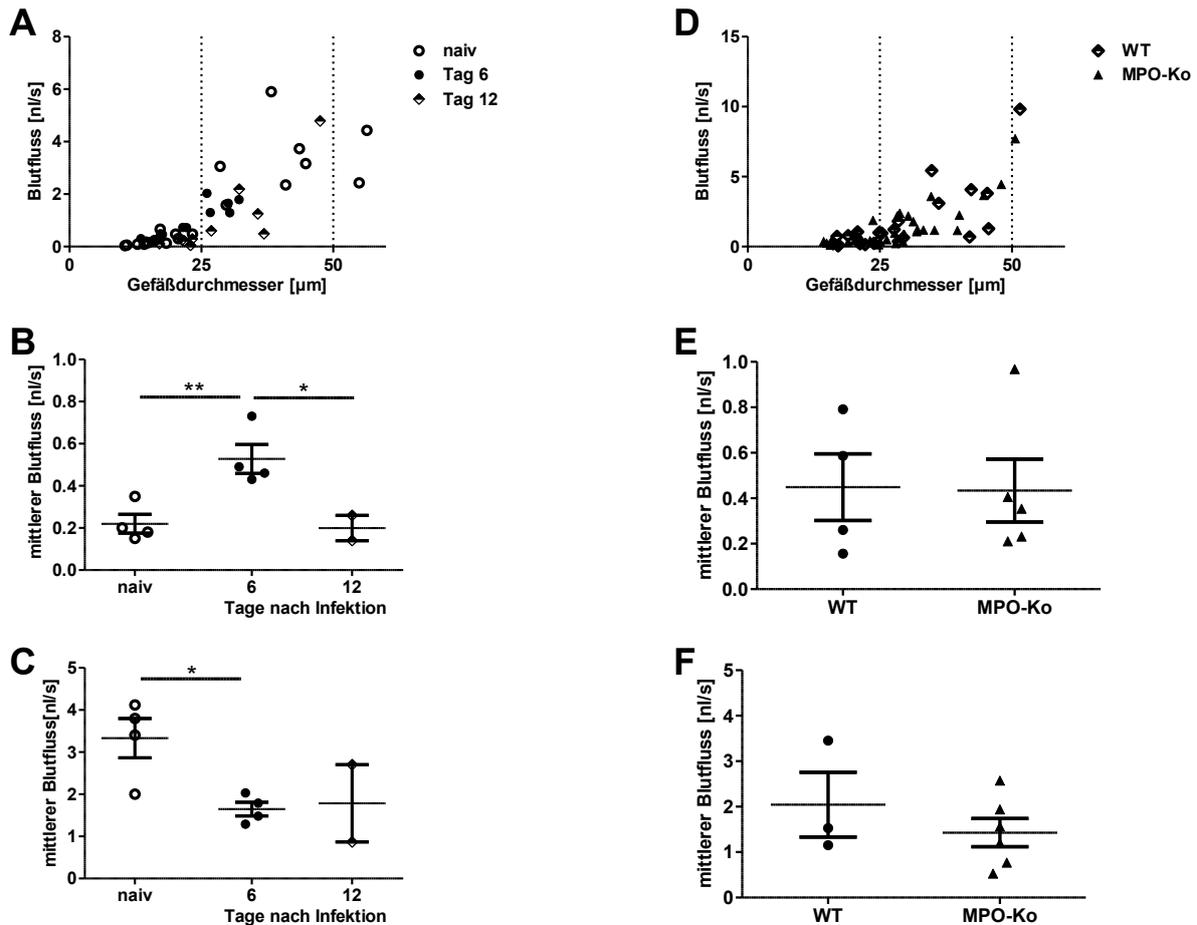
Als Kontrollkurve wurde in diesem Versuch zusätzlich die endothelunabhängige Vasodilationsfähigkeit bestimmt, um zu untersuchen ob keine fibrotischen Veränderungen der Aorten vorlagen (Abb. 4.6 B). Dazu wurden die Aortensegmente erneut mit  $\text{PGF}_2\alpha$  kontrahiert und kumulativ NTG hinzugefügt. Bei dem Vergleich von infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen zeigten sich dabei keine Unterschiede in der

endothelunabhängigen Vasodilatationsfähigkeit. Jedoch war bei der Analyse von infizierten gegenüber naiven WT-Mäusen eine verbesserte Relaxation der Aortensegmente naiver WT-Mäuse in höheren NTG Konzentrationsstufen zu beobachten. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die gezeigten Unterschiede in der Relaxation mit ACh allein auf der verschiedenen endothelabhängigen Vasodilatationsfähigkeit beruhten und nicht von einer eventuell veränderten Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskelzellen der Aorta beeinflusst wurden.

#### **4.2.3 Einfluss der MPO-Defizienz auf die Mikrozirkulation und Adhäsion von pRBZ an die Gefäßwand**

Um die Rolle von MPO bei der Mikrozirkulation und der endothelialen Sequestration von pRBZ näher zu analysieren wurde ein nicht invasives intravitalmikroskopisches Modell etabliert. Dieses bietet die Möglichkeit, *in vivo* Untersuchungen des Blutflusses von venösen Gefäßen sowie eine visuelle Beurteilung der Interaktion von pRBZ mit dem Endothel durchzuführen. Zunächst wurde der Blutfluss von Blutgefäßen des Ohres von naiven Mäusen sowie von Tieren an den Tagen 6 und 12 nach Infektion mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ analysiert. Eine Darstellung des Blutflusses in Abhängigkeit des Gefäßdurchmessers von allen analysierten Blutgefäßen ermöglichte eine Einteilung der Gefäße in zwei Gruppen: 10-25  $\mu\text{m}$  und 25-50  $\mu\text{m}$ , in denen der Blutfluss erhöht ist (Abb. 4.7 A und D).

Pro Maus wurde der mittlere Blutfluss aus allen untersuchten Gefäßen für diese zwei Gruppen berechnet. Für die Gruppe mit dem Gefäßdurchmesser von 10-25  $\mu\text{m}$  ist ein Anstieg des Blutflusses an Tag 6 nach Infektion zu beobachten, der an Tag 12 nach Infektion wieder abnimmt (Abb. 4.7 B). Bei der Gruppe mit dem Gefäßdurchmesser von 25-50  $\mu\text{m}$  verringert sich der Blutfluss der infizierten WT-Mäuse gegenüber den naiven WT-Mäusen (Abb. 4.7 C).



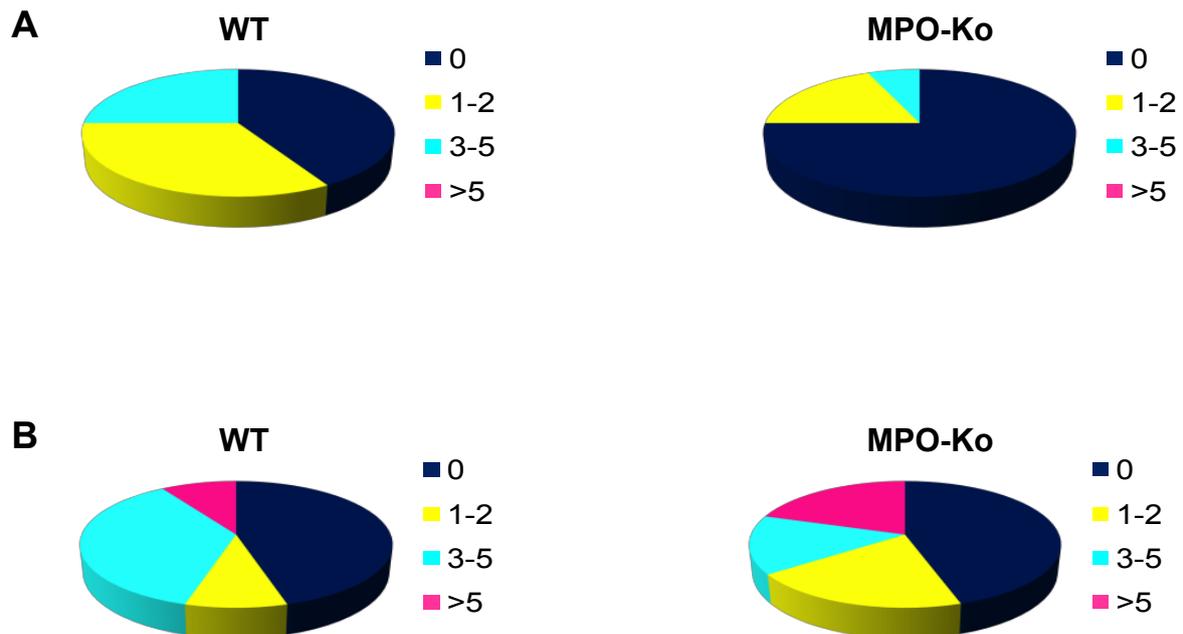
**Abb. 4.7: Bestimmung des mittleren Blutflusses bei der PyNL Infektion.**

Die Gefäße von sowohl naiven und als auch infizierten WT-Mäusen an 6 bzw. 12 Tagen nach Infektion mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ wurden im Intravitalmikroskop untersucht. Es wurde jeweils der Gefäßdurchmesser gemessen und die Geschwindigkeit von 5 verschiedenen RBZ pro Gefäß quantifiziert, aus denen der Mittelwert bestimmt wurde. Aus diesen Werten wurde der Blutfluss errechnet. Die Abhängigkeit des Blutflusses vom Gefäßdurchmesser von allen aufgenommenen Blutgefäßen ist gezeigt ( $n_{\text{naiv}}=21$ ,  $n_{\text{Tag6}}=12$ ,  $n_{\text{Tag12}}=10$ ) (A). Aus den Blutgefäßen mit dem Durchmesser 10-25  $\mu\text{m}$  (B) bzw. 25-50  $\mu\text{m}$  (C) wurde pro Maus der mittlere Blutfluss bestimmt. Das gleiche Verfahren wurde für WT- und MPO-Ko-Mäuse am Tag 12 nach Infektion mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ durchgeführt. Die Abhängigkeit des Blutflusses vom Gefäßdurchmesser von allen aufgenommenen Blutgefäßen ( $n_{\text{WT}}=25$ ,  $n_{\text{MPO}}=38$ ) (D), sowie der mittlere Blutfluss von Gefäßen mit einem Durchmesser von 10-25 (E) bzw. 25-50  $\mu\text{m}$  (F), ist gezeigt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n=2-6$ ). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's-*t*-Test (*unpaired*): \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

Als Nächstes wurde die Mikrozirkulation von mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ infizierten MPO-Ko-Mäusen mit infizierten WT-Mäusen am Tag 12 nach Infektion verglichen. Es konnten keine Unterschiede für den mittleren Blutfluss der Gefäßgruppe 10-25  $\mu\text{m}$  (Abb. 4.7 E) als auch 25-50  $\mu\text{m}$  (Abb. 4.7 F) bei WT- und MPO-Ko-Mäuse festgestellt werden.

Für die Analyse der Sequestration wurde die Adhärenz von mit einem Farbstoff markierten pRBZ an das Endothel des Ohrblutgefäßes betrachtet. Pro Gefäß wurde ein

30s langes intravitalmikroskopisches Video aufgenommen. Die Anzahl der in dieser Zeit adhärierenden pRBZ wurde dokumentiert. Es konnte beobachtet werden, dass sich bei der Gesamtheit der 10-25  $\mu\text{m}$  großen Blutgefäße von infizierten WT-Mäusen ein höherer Anteil von 1-2 bzw. 3-5 adhärrender pRBZ pro Gefäß ergab als bei den infizierten MPO-Ko-Mäusen. Dort lag ein wesentlich höherer Anteil an Gefäßen ohne eine Adhärenz von pRBZ vor (Abb. 4.8 A).



**Abb. 4.8: Adhäsion von pRBZ an das Endothel der Blutgefäße.**

WT- und MPO-Ko-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ infiziert. Am Tag 12 nach Infektion wurde die Anzahl adhärrender pRBZ pro 30s je Blutgefäß dokumentiert. Dargestellt ist die Gesamtanzahl der Blutgefäße ( $n=11-20$ ) pro Mausgruppe, unterteilt nach Anteil der Blutgefäße mit 0, 1-2, 3-5 oder über 5 adhärrender pRBZ pro Blutgefäß, für die Blutgefäße mit einem Durchmesser 10-25 (A) und 25-50  $\mu\text{m}$  (B).

Solch ein Effekt konnte bei den Gefäßen mit dem Durchmesser 25-50  $\mu\text{m}$  nicht ermittelt werden. Dort war der Anteil an Gefäßen ohne eine Adhärenz von pRBZ gleich. Die infizierten WT-Mäuse hatten zwar einen erhöhten Anteil an 3-5 pRBZ pro Gefäß gegenüber den infizierten MPO-Ko-Mäusen, jedoch hatten diese einen geringfügig höheren Anteil an Gefäßen mit über 5 pRBZ pro Gefäß (Abb 4.8 B).

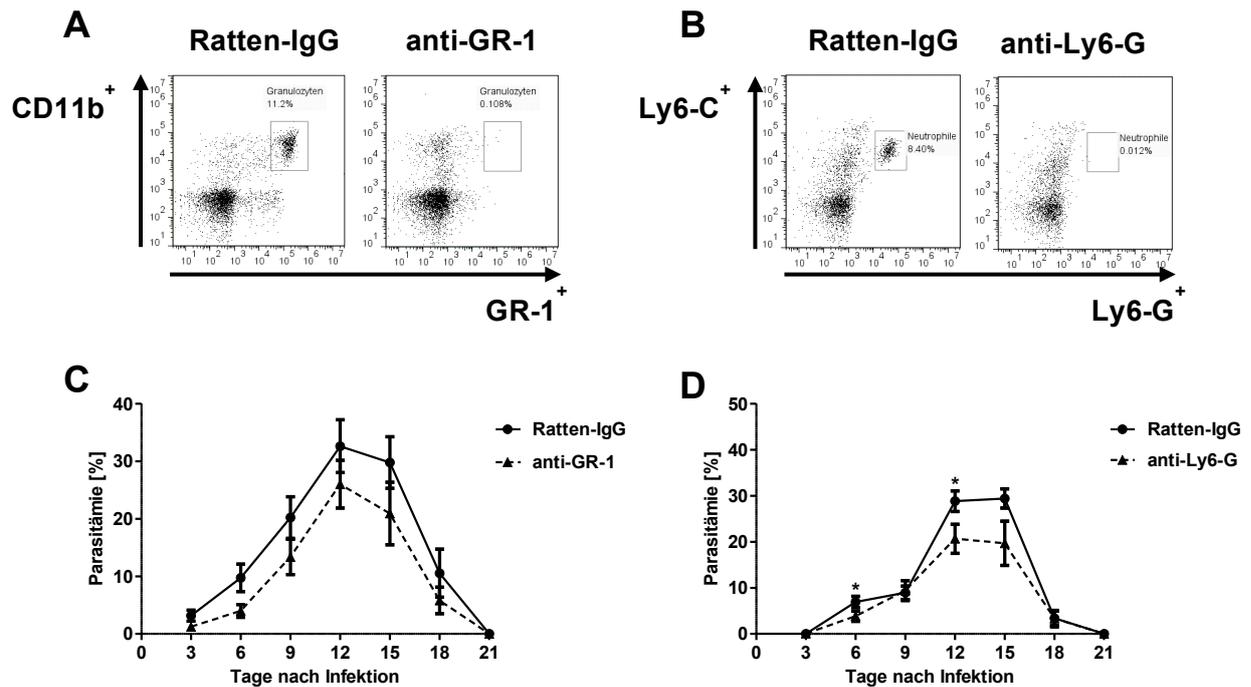
Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine verschlechterte Mikrozirkulation in der Malariainfektion zu beobachten war. Diese unterschied sich jedoch nicht zwischen infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen. Bei der Sequestration von

pRBZ konnte nur ein Einfluss der MPO-Defizienz auf kleinere Blutgefäße mit einem Durchmesser von 10-25  $\mu\text{m}$  festgestellt werden, in denen weniger Adhärenz von pRBZ an das Endothel auftrat.

### **4.3 Einfluss der MPO auf die Immunantwort gegen *PyNL***

#### **4.3.1 Einfluss eines neutrophilendepletierenden Antikörpers auf den Infektionsverlauf von *PyNL***

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wiesen MPO-Ko-Mäuse eine geringere Parasitämie bei einer *PyNL*-Infektion auf. Der Hauptanteil an im Körper vorkommender MPO wird von Neutrophilen gebildet. Nun sollte untersucht werden, ob der parasitämievermindernde Effekt auch auftritt, wenn Neutrophile mit einem Antikörper depletiert werden. Zu diesem Zweck wurden WT-Mäuse einen Tag vor Infektion mit anti-GR-1 i.p. behandelt und am Folgetag wurde die Depletion in der Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 4.9 A). Anti-Gr-1 bewirkt sowohl eine Depletion der Neutrophilen als auch von Subpopulationen der Monozyten, die zu einem geringeren Anteil ebenfalls zur MPO Synthese beitragen. Als Kontrollantikörper wurde Ratten-IgG verwendet. Die Mäuse wurden daraufhin i.p. mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infiziert und der Parasitämieverlauf ermittelt (Abb. 4.9 C). Es konnte eine leichte, jedoch nicht signifikant verminderte Parasitämie bei den Mäusen, die den anti-GR-1 Antikörper erhielten, festgestellt werden. Als weiterer neutrophilendepletierender Antikörper wurde anti-Ly6-G verwendet. Dieser depletiert ausschließlich die Neutrophilen. Der anti-Ly6-G-Antikörper bzw. der Kontrollantikörper wurde WT-Mäusen i.p. zwei Tage als auch einen Tag vor Infektion verabreicht. Am Tag der Infektion wurde die Depletion wiederum überprüft und die Mäuse i.p. mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infiziert (Abb. 4.9 B). Im Parasitämieverlauf wurde eine signifikante Verminderung der Parasitenlast an den Tagen 6 und 12 nach Infektion beobachtet (Abb. 4.9 C). Es lässt sich schlussfolgern, dass ein Antikörper, der nur die Neutrophilen depletiert die Parasitämie zu verringern vermag.



**Abb. 4.9: Einfluss von anti-GR-1 und anti-Ly6-G auf die Parasitämie nach Infektion mit *PyNL* Blutphaseparasiten.**

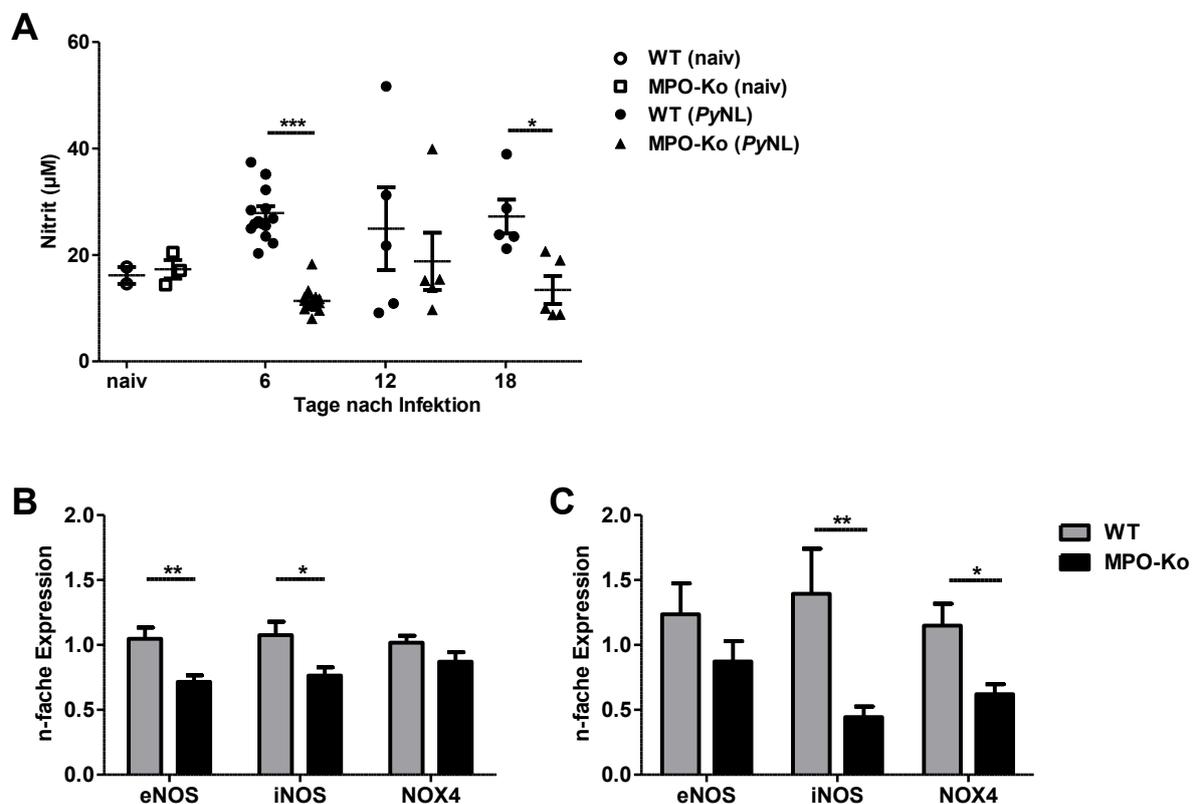
Die Granulozyten von WT-Mäusen wurden einen Tag vor Infektion durch i.p. Injektion von anti-GR-1, 300 µg, depletiert. Der Kontrollgruppe wurde Ratten-IgG verabreicht. Der Erfolg der Depletion wurde am Tag der Infektion mittels Durchflusszytometrie einer Blutprobe überprüft. Eine exemplarische Abbildung ist gezeigt (A). In einem zweiten Versuch wurden Neutrophile durch i.p. Gabe von 500 µg anti-Ly6-G zwei Tage und ein Tag vor Infektion depletiert, bzw. Ratten-IgG injiziert. Der Depletionserfolg wurde ebenfalls am Tag der Infektion überprüft (B). Nach sowohl anti-GR-1- als auch anti-Ly6-G-Gabe waren die Neutrophilen am Tag 3 nach Infektion noch depletiert. An Tag 6 nach Infektion waren diese jedoch wieder repopuliert (Daten nicht gezeigt). Die Mäuse wurden einen Tag nach der Depletion mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infiziert. Der Parasitämieverlauf wurde aus dem Schwanzblut ermittelt (C) bzw. (D). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (zusammengefasste Daten;  $n=11-12$ ). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

#### 4.3.2 Die Rolle von NO und der NADPH-Oxidase während der Infektion mit *PyNL*

Es wird diskutiert, dass NO, genauso wie ROS, als antiplasmodialer Immunfaktor fungiert. Ob NO ebenfalls eine Rolle in der verstärkten Parasiteneliminierung in MPO-Ko-Mäusen spielt, sollte daher näher untersucht werden. Um den NO-Haushalt in naiven und mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen zu analysieren, wurden zuerst die im Plasma vorkommende Oxidationsprodukte des kurzlebigen NOs, Nitrat und Nitrit, bestimmt. Dafür wurde ein Test verwendet, mit dem im Plasma vorhandenes Nitrat zu Nitrit umgewandelt und anschließend die Gesamtkonzentration an Nitrit gemessen wurde (Abb. 4.10 A). Die Nitrat/Nitrit-Konzentration von naiven WT- und MPO-Ko-Mäusen lag bei einem ähnlichen Wert. An den Tagen 6, 12 und 18 nach Infektion war im Plasma von WT-Mäusen eine erhöhte Nitrat/Nitrit-Konzentration im

Vergleich zu den MPO-Ko-Mäusen und naiven Mäusen zu beobachten. Diese Erhöhung war am Tag 6 nach Infektion am stärksten ausgeprägt.

Im Anschluss daran sollte die Expression des für die iNOS und eNOS kodierenden Gens betrachtet werden, um Rückschlüsse auf die NO-Synthese ziehen zu können. Das Herz und die Lunge von WT- und MPO-Ko-Mäusen wurden am Tag 6 nach Infektion isoliert und die mRNA aufgereinigt. Danach wurde die Expression mit quantitativer Real-Time-PCR gemessen. In Herz (Abb. 4.10 B) als auch Lunge (Abb. 4.10 C) von MPO-Ko-Mäusen konnte eine verminderte Expression des iNOS- und eNOS-Gens gegenüber der von den WT-Mäusen ermittelt werden.



**Abb. 4.10: Bestimmung des NO-Haushaltes während der PyNL Infektion.**

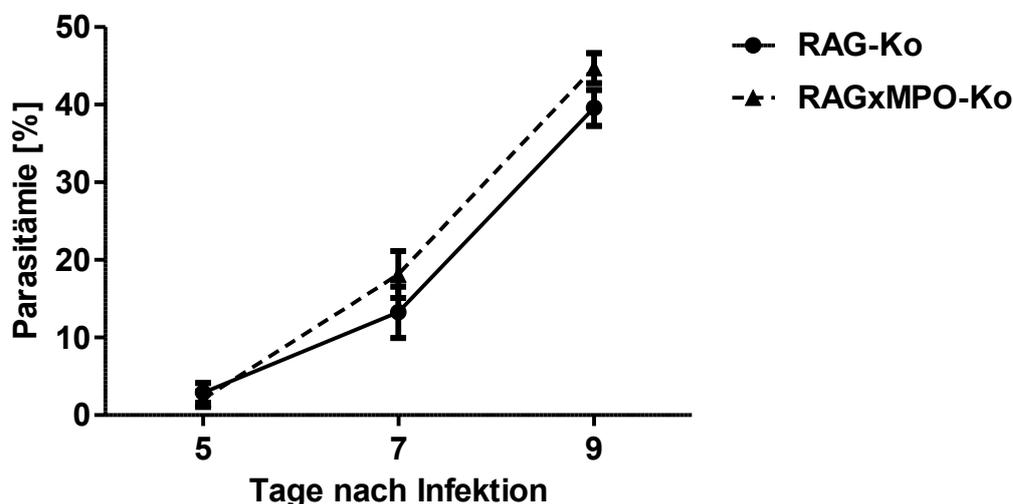
Die Oxidationsprodukte von NO, Nitrit und Nitrat, wurden aus dem Plasma von naiven WT- und MPO-Ko-Mäusen sowie an Tag 6, 12 und 18 nach Infektion mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ bestimmt. Vorhandendes Nitrat wurde bei diesem Test als erstes in Nitrit umgewandelt und anschließend die Gesamtkonzentration an Nitrit bestimmt (zusammengefasste Daten;  $n_{\text{naiv}}=2-3$ ,  $n_{\text{Tag 6}}=14-15$ ,  $n_{\text{Tag 12}}=5$ ,  $n_{\text{Tag 18}}=5$ ) (A). Aus dem Herz (B) und der Lunge (C) von WT- und MPO-Ko-Mäusen wurde die mRNA am Tag 6 nach Infektion mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ isoliert und die Genexpression von eNOS, iNOS als auch NOX4 bestimmt (zusammengefasste Daten;  $n=13-15$ ). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's-t-Test (*unpaired*): \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

Des Weiteren wurde die Expression des NOX4 Gens, welches für die NADPH-Oxidase kodiert, bestimmt. Die NADPH-Oxidase ist neben der MPO ein weiteres Enzym, welches

an der Erzeugung von ROS beteiligt ist. In den Lungen, nicht aber in den Herzen, wurde eine signifikant verringerte Expression von NOX4 in MPO-Ko-Mäusen gemessen. Eine verbesserte Beseitigung der Parasiten durch direkte Beteiligung von NO oder Produkten der NADPH-Oxidase wird als unwahrscheinlich erachtet.

#### 4.3.3 Bedeutung der MPO-Defizienz in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems auf den Infektionsverlaufes von *PyNL*

Da weder Neutrophile noch NO-Aktivität zu der erhöhten Parasiteneliminierung in MPO-Ko-Mäusen zu führen scheint, sollte untersucht werden ob dieser Effekt auch auftritt wenn kein adaptives Immunsystem vorhanden ist.



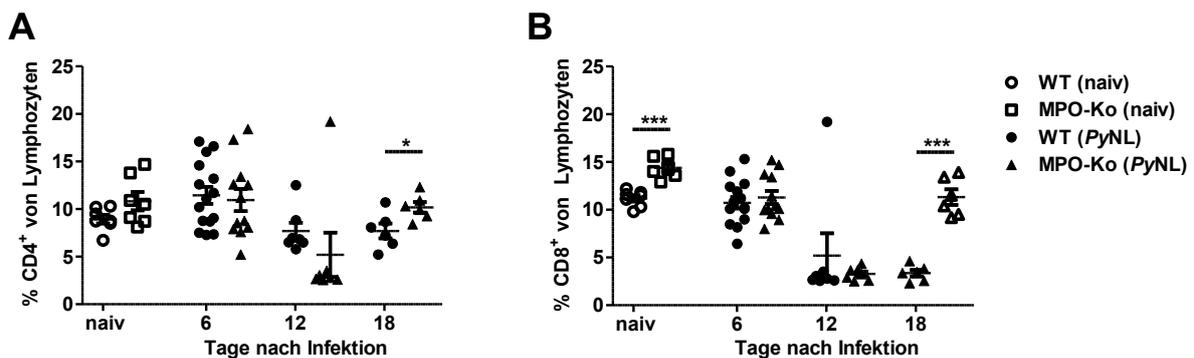
**Abb. 4.11: Einfluss der MPO-Defizienz auf die Parasitämie von *PyNL* in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems.**

Der Parasitämieverlauf von RAG-Ko und RAGxMPO-Ko-Mäusen nach Infektion mit  $2 \times 10^6$  *PyNL*-Stabilat-pRBZ wurde bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (zusammengefasste Daten;  $n=10-11$ ). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

Dafür wurden RAG-Ko-Mäuse verwendet, die keine T- und B-Zellen besitzen. Diese wurden mit MPO-Ko-Mäusen verpaart um RAGxMPO-Doppelknockoutmäuse zu erhalten. RAG-Ko- und RAGxMPO-Ko-Mäuse wurden i.p. mit  $2 \times 10^6$  *PyNL* Stabilat-pRBZ infiziert und an den Tagen 5, 7 und 9 nach Infektion die Parasitämie bestimmt (Abb. 4.11). Beim Erreichen einer Parasitämie von über 40 % wurden die Mäuse abgetötet. Es konnte keine signifikant verminderte Parasitämie in den MPO-Ko-Mäusen festgestellt werden. In Abwesenheit des adaptiven Immunsystems scheint eine MPO-Defizienz demnach keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf zu besitzen.

#### 4.3.4 Bestimmung der inflammatorischen T-Zellantwort gegen *PyNL*

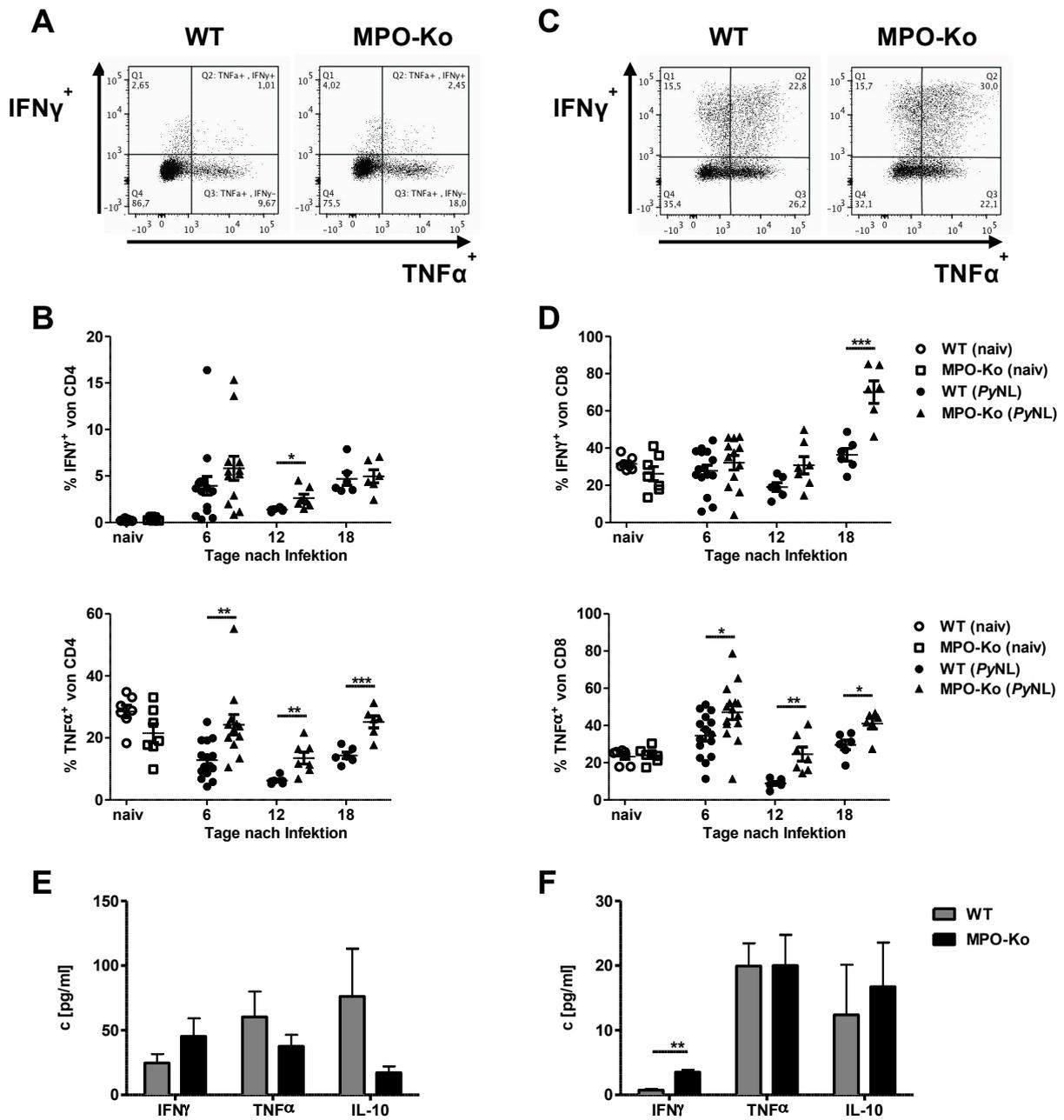
Da bei einer MPO-Defizienz kein Einfluss auf den Infektionsverlauf festgestellt werden konnte, wenn nur das angeborene Immunsystem beteiligt war, sollte die adaptive Immunantwort untersucht werden. Dafür wurden WT- und MPO-Ko-Mäuse i.p. mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infiziert und Milzzellen isoliert. Zunächst wurde die Frequenz der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtymphozytenpopulation quantifiziert. Während bei den naiven Mäusen kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Frequenz der CD4<sup>+</sup> Population (Abb. 12 A) zu beobachten war, war die Frequenz der CD8<sup>+</sup> Population (Abb. 12 B) der MPO-Ko-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen deutlich erhöht. Für beide Zellpopulationen war am Tag 6 und 12 nach Infektion kein signifikanter Unterschied zu finden. Am Tag 18 nach Infektion jedoch war die CD4<sup>+</sup> Population als auch die CD8<sup>+</sup> Population bei MPO-Ko-Mäusen vergrößert.



**Abb. 12: Rolle von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Infektion mit *PyNL*.**

Aus naiven WT- und MPO-Ko-Mäusen sowie an den Tagen 6, 12 und 18 nach Infektion mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ wurden die Milzzellen isoliert. Der Anteil an CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtymphozytenpopulation (B) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (n=6-7, außer am Tag 6: zusammengefasste Daten mit n=13-15). Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's-t-Test (*unpaired*): \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

Des Weiteren sollte die Frequenz der T-Zellen ermittelt werden, die proinflammatorische Zytokine sezernieren. Nach Stimulation der isolierten Milzzellen mit PMA/Ionomycin in Anwesenheit von Monensin wurde die Frequenz der IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch intrazelluläre Zytokinfärbung bestimmt (Abb. 4.13). Die Frequenz der TNF  $\alpha$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen war über den ganzen Infektionsverlauf in den MPO-Ko-Mäusen erhöht. Diese Erhöhung war im Vergleich zwischen den naiven WT- und MPO-Ko-Mäusen nicht zu sehen.



**Abb. 13: Einfluss der MPO-Defizienz auf die Frequenz der IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Milz während der Infektion mit PyNL.**

WT- und MPO-Ko-Mäuse wurden i.p. mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ infiziert. Milzzellen von naiven Mäusen sowie an den Tagen 6, 12 und 18 nach Infektion wurden isoliert und die Frequenz der IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> (**B**) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (**D**) durchflusszytometrisch bestimmt (n=6-7, außer am Tag 6: zusammengefasste Daten mit n=13-15). Eine exemplarische Abbildung der IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> (**A**) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (**C**) der Milz am Tag 6 nach Infektion ist gezeigt. Am Tag 6 (**E**) und 12 (**F**) nach Infektion wurde zudem die IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - sowie die IL-10-Konzentration aus dem Plasma mittels CBA bestimmt (n=3-5). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's-t-Test (*unpaired*): \* p $\leq$ 0.05, \*\* p $\leq$ 0.01, \*\*\* p $\leq$  0.001

Bei den IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen war ebenfalls eine Steigerung der Frequenz in den MPO-Ko-Mäusen feststellbar, die für CD4<sup>+</sup> an Tag 12 und für CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Tag 18 nach Infektion signifikant war. Infolgedessen wurde untersucht,

ob auch eine erhöhte Konzentration der Zytokine im Plasma der infizierten Mäuse zu beobachten ist. Aus dem Plasma von WT- und MPO-Ko-Mäusen wurde an den Tagen 6 (Abb. 13 E) und 12 (Abb. 13 F) nach Infektion die Konzentration von  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  als auch des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 mittels CBA bestimmt. Für  $\text{TNF}\alpha$  konnte keine erhöhte Plasmakonzentration ermittelt werden.  $\text{IFN}\gamma$  war hingegen geringfügig an Tag 6 und deutlich am Tag 12 nach Infektion im Plasma von MPO-Ko-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen erhöht. In der Messung von IL-10 ergaben sich hohe Standardabweichungen, so dass keine eindeutige Aussage über eventuelle Unterschiede getroffen werden konnte.

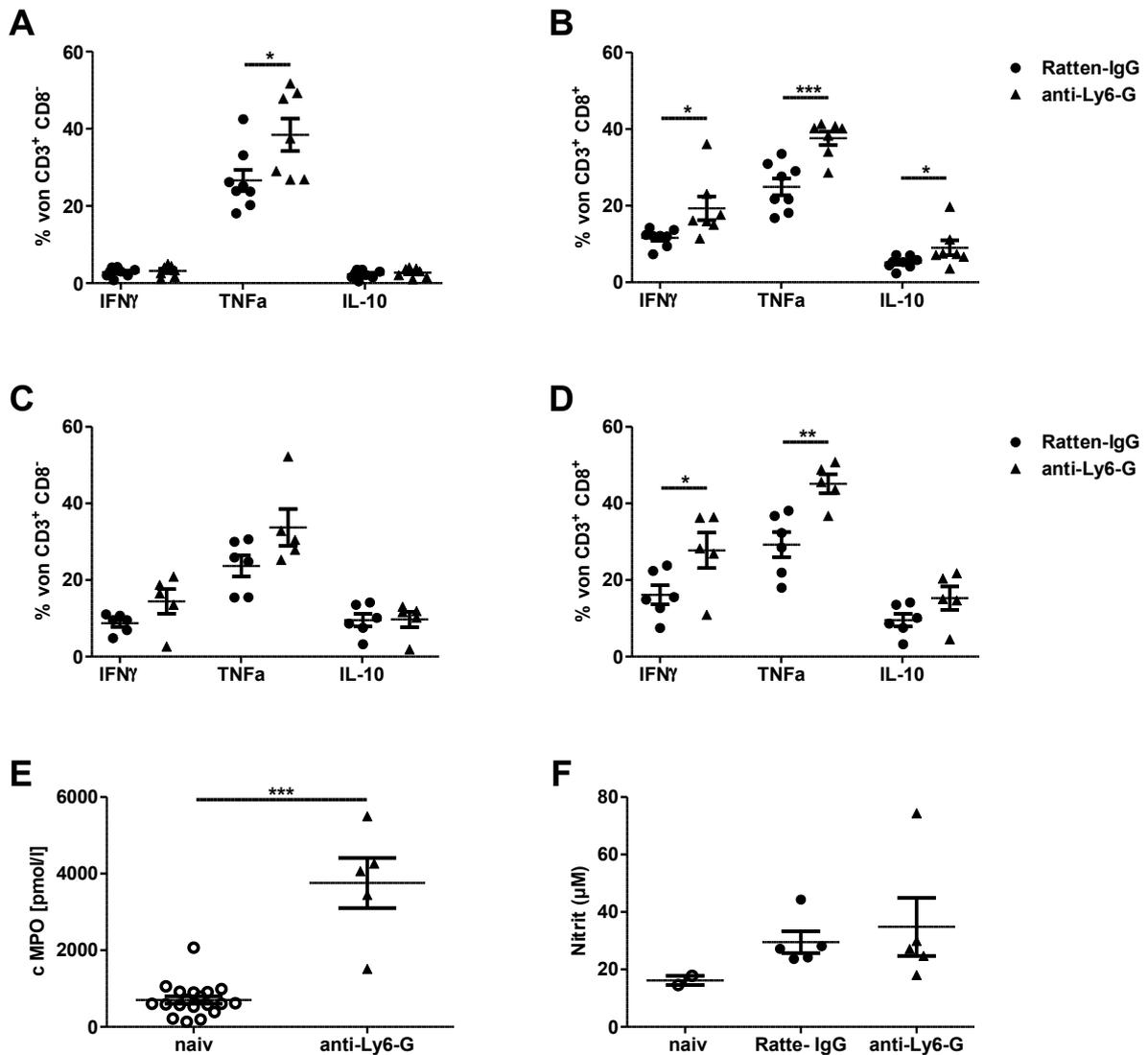
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der  $\text{IFN}\gamma$ - und  $\text{TNF}\alpha$ -produzierenden  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen der Milz in MPO-Ko-Mäusen erhöht war. Eine Erhöhung an  $\text{IFN}\gamma$ , nicht aber von  $\text{TNF}\alpha$ , konnte auch im Plasma von MPO-Ko-Mäusen detektiert werden.

#### **4.3.5 Einfluss eines neutrophilendepletierenden Antikörpers auf die inflammatorische T-Zellantwort**

Aufgrund der Erkenntnisse, dass die  $\text{IFN}\gamma$ - und  $\text{TNF}\alpha$ - Produktion der T-Zellen in MPO-Ko-Mäusen erhöht war, sollte überprüft werden ob ein neutrophilendepletierender Antikörper ebenfalls Einfluss auf die T-Zellantwort bei der durch *PyNL* induzierten Malariainfektion hat. Hierfür wurden WT-Mäusen zwei Tage und einen Tag vor Infektion anti-Ly6-G i.p. injiziert und daraufhin wurden die Mäuse i.p. mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ infiziert. Als Kontrollantikörper wurde Ratten-IgG eingesetzt. Die Frequenz der  $\text{IFN}\gamma$ -,  $\text{TNF}\alpha$ - und IL-10-produzierenden T-Zellen wurde am Tag 5 nach Infektion wieder nach PMA/Ionomycin Stimulation, unter Beteiligung von Monensin, durch intrazelluläre Zytokinfärbung bestimmt.  $\text{CD3}^+\text{CD8}^-$  T-Zellen, die hier als  $\text{CD4}^+$  T-Zellen klassifiziert wurden, zeigten eine erhöhte Frequenz an  $\text{TNF}\alpha$ -produzierenden Zellen in der mit Antikörper behandelten Gruppe (Abb. 4.14 A). Bei den  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  T-Zellen (=  $\text{CD8}^+$  T-Zellen) nahm sowohl die Frequenz an  $\text{IFN}\gamma$ -,  $\text{TNF}\alpha$ - als auch an IL-10-produzierenden Zellen zu (Abb. 4.14 B).

Im Anschluss wurde als Kontrolle der gleiche Versuch mit infizierten MPO-Ko-Mäusen durchgeführt. Diesen wurde ebenfalls anti-Ly6-G oder Ratten-IgG vor Infektion verabreicht, und die Frequenz an zytokinproduzierenden T-Zellen am Tag 6 nach

Infektion durch intrazelluläre Zytokinfärbung bestimmt. Auch hier zeigte sich eine Zunahme der IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -produzierenden CD3 $^+$ CD8 $^+$  T-Zellen (Abb. 4.14 D) sowie der TNF $\alpha$ -produzierenden CD3 $^+$ CD8 $^-$  T-Zellen, wenn auch in geringerem Ausmaße als bei den WT-Mäusen.



**Abb. 14: Einfluss von anti-GR-1 und anti-Ly6-G auf die Frequenz der IFN $\gamma$ -, TNF $\alpha$ - und IL-10-produzierenden T-Zellen der Milz während der Infektion mit PyNL.**

WT- und MPO-Ko-Mäuse wurden i.p. mit  $2 \times 10^4$  PyNL-pRBZ infiziert. Neutrophile von WT- und MPO-Ko-Mäusen wurden zwei Tage und ein Tag vor Infektion durch Gabe von anti-Ly6-G, 500  $\mu$ g, depletiert. Als Kontrollantikörper wurde Ratten-IgG verwendet. Am Tag 5 nach Infektion wurden in den WT-Mäusen die Milzzellen isoliert und die Frequenz IFN $\gamma$ -, TNF $\alpha$ - und IL-10 produzierender CD3 $^+$ CD8 $^-$  (A) und CD3 $^+$ CD8 $^+$  T-Zellen (B) durchflusszytometrisch bestimmt (n=7-8). In MPO-Ko-Mäusen wurde am Tag 6 nach Infektion die Frequenz der IFN $\gamma$ -, TNF $\alpha$ - und IL-10-produzierenden CD3 $^+$ CD8 $^-$  (C) und CD3 $^+$ CD8 $^+$  T-Zellen (D) bestimmt (n=5-6). Es wurde zudem die MPO Konzentration (n<sub>naiv</sub>=19, n<sub>Ratten-IgG</sub>=5, n<sub>anti-Ly6-G</sub>=5) (E) und der Nitrat/Nitrit-Gehalt (n<sub>naiv</sub>=2, n<sub>Ratten-IgG</sub>=5, n<sub>anti-Ly6-G</sub>=5) (F) im Plasma gemessen und mit den Werten von naiven Mäusen verglichen. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's-t-Test (*unpaired*): \* p $\leq$ 0.05, \*\* p $\leq$ 0.01, \*\*\* p $\leq$  0.001

Da sowohl bei WT- als auch bei MPO-Ko-Mäusen eine Verstärkung der proinflammatorischen Zytokinproduktion von T-Zellen bei *PyNL* Infektion nach Antikörpergabe von anti-Ly6-G beobachtet wurde, sollte in einem Kontrollexperiment untersucht werden, inwiefern der Antikörper die MPO-Produktion wirklich beeinflusst. Es konnte festgestellt werden, dass bei Gabe von anti-Ly6-G zur Neutrophilendepletion die MPO-Konzentration trotzdem am Tag 6 nach Infektion mit  $2 \times 10^4$  *PyNL*-pRBZ anstieg (Abb. 4.14 E). Es war des Weiteren kein Unterschied in der Plasma-Nitrit/Nitrat-Konzentration zwischen anti-Ly6-G und Kontrollantikörper behandelten Mäusen erkennbar (Abb. 4.14 F), so wie es bei MPO-Ko-Mäusen der Fall war, die gegenüber WT-Mäusen verminderte Nitrit/Nitrat-Konzentrationen aufwiesen (Abb. 4.10 A).

Die Ergebnisse zeigen, dass ein neutrophilendepletierender Antikörper die inflammatorische T-Zellantwort der Milz verstärkt. Da dieser Effekt auch in schwächerer Form bei MPO-Ko-Mäusen auftritt, lässt sich vermuten, dass auch andere durch Neutrophile ausgelöste Mechanismen die inflammatorische T-Zellantwort beeinflussen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Bedeutung der MPO für die Malariainfektion

In Studien zu kardiovaskulären Erkrankungen wurde in den letzten Jahren zunehmend von hohen MPO-Plasmaspiegeln berichtet, die außerdem eine prognostische Rolle in der Erkennung des inflammatorischen Zustandes bei der Arteriosklerose [64] oder des Myokardinfarkts spielen können [71]. Auch von Malariapatienten wurden bereits erhöhte MPO-Plasmaspiegel berichtet [72,73]. Mohammed *et al.* konnten dabei in einer Studie signifikant höhere Konzentrationen von MPO im Blut von Patienten mit komplizierter Malaria im Vergleich zu Patienten mit unkomplizierter Malaria finden [73]. Allerdings kritisierten die Autoren selber, dass die Patienten nicht auf bakterielle Koinfektionen getestet worden sind. Solche Koinfektionen wurden z.B. bei einer Studie in einem holoendemischen Gebiet beobachtet [74]. Außerdem wurden bei der Studie [73] die Malariapatientengruppen nicht in Erwachsene und Kinder unterschieden. Davon abgesehen ist bisher nicht beschrieben worden, ob oder in welchem Maße hohe Konzentrationen an MPO die Malaria-Pathogenese beeinflussen können.

In dieser Arbeit sollten daher zunächst die MPO-Plasmaspiegel von Erwachsenen mit importierter *P. falciparum*-Infektion bestimmt werden. Diese MPO-Plasmaspiegel waren in der Patientengruppe gegenüber den Werten der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei einem Vergleich der MPO-Plasmakonzentration innerhalb der Patientengruppe mit importierter Malaria konnte festgestellt werden, dass die Patienten mit komplizierter Malaria wesentlich höhere MPO-Plasmakonzentrationen besitzen als die Patienten mit unkomplizierter Malaria. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der kürzlich erschienenen Studie zur klinischen Relevanz von verschiedenen Biomarkern in adulten Patienten mit importierter *P. falciparum*-Malaria [75]. Dort wurden ebenfalls signifikant erhöhte MPO-Plasmaspiegel in Patienten mit importierter *P. falciparum*-Infektion gefunden. MPO war dabei nach dem C-reaktiven Protein der Biomarker mit der höchsten Sensitivität. Jedoch korrelierten die Biomarker nicht mit der Schwere der Erkrankung. Vergleicht man allerdings die Absolutplasmawerte von MPO mit denen, die in kardiovaskulären Erkrankungen auftreten, lässt sich feststellen, dass die MPO-Plasmakonzentrationen in Malariapatienten wesentlich höher sind. In einer Studie zur diagnostischen und prognostischen Fähigkeit von MPO in Patienten mit akuten

Brustschmerzen hatten Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine mittlere Plasmakonzentration von 1070 pmol/l [76]. Die mittlere Plasmakonzentration von Patienten mit unkomplizierter Malaria lag bei der Studie von Stauga *et al.* [75] hingegen bei 2827 pmol/l und die der Patientengruppe mit komplizierter Malaria gar bei 4848 pmol/l. Diese Werte sind um das 2,5-fache bzw. 4,5-fache höher als bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt aus der Studie von Rudolph *et al.* [76]. Daher erscheint es sinnvoll zu untersuchen, welche Rolle solch hohe MPO-Plasmaspiegel in der Immunantwort und Pathogenese in der Malaria spielen.

Es wurde zunächst untersucht, ob solch hohe MPO-Plasmaspiegel auch in einem Mausmodell zur Malaria beobachtet werden können. Es zeigte sich, dass an Tag 6 und 12 nach Infektion mit *PyNL* die MPO-Plasmakonzentrationswerte gegenüber denen von naiven Mäusen signifikant erhöht waren. Dieser Effekt konnte an Tag 18 nicht mehr beobachtet werden. Die MPO-Plasmakonzentration war an diesem Tag wieder vermindert und unterschied sich nicht mehr signifikant von derjenigen bei naiven Mäusen. Es konnte somit der Beweis erbracht werden, dass im Mausmodell ebenfalls hohe MPO-Plasmakonzentrationen während der akuten Phase der Malaria auftreten. Für die folgenden Untersuchungen zur Auswirkung dieser hohen MPO-Spiegel auf die Immunantwort und Pathogenese in der Malaria wurde die MPO-Ko-Maus verwendet. Da der MPO mikrobizide Eigenschaften zugeschrieben werden [59,62], war nach den ersten Ergebnissen aus humaner und muriner Malaria vermutet worden, dass hohe MPO-Plasmaspiegel mit einer raschen Parasiteneliminierung einhergehen. Es ließ sich jedoch überraschenderweise das Gegenteil feststellen. Die Infektion konnte von den MPO-Ko-Mäusen wesentlich früher vollständig kontrolliert werden als von den WT-Mäusen. Dieser Effekt zeigte sich dadurch, dass an Tag 15 nach Infektion die Parasitämie in den MPO-Ko-Mäusen signifikant vermindert war und an Tag 18 nach Infektion die MPO-Ko-Mäuse bereits alle im peripheren Blut messbaren Parasiten eliminiert hatten, während in den WT-Mäusen noch eine anhaltende Infektion zu beobachten war.

Die während der Malariainfektion beobachteten hohen MPO-Plasmaspiegel lassen sich auf eine starke Neutrophilenaktivierung zurückführen [73]. Erhöhte MPO-Spiegel könnten allerdings nicht nur durch eine Aktivierung der Neutrophilen bedingt sein, sondern auch dadurch, dass sich die Rekrutierung der Neutrophilen in der akuten

Malaria zu erhöhen scheint [77], wohingegen sie in der Genesungsphase wieder absinkt [78]. Neutrophile können dabei entweder direkt vom Parasiten oder durch Zytokine wie TNF $\alpha$  [79] sowie andere Mediatoren stimuliert werden. So wurde publiziert, dass  $\beta$ -Hämatin eine strukturell identische synthetische Struktur zum Hämozoin, einem Produkt, welches bei dem Abbau des Hämoglobins durch den Parasiten entsteht, aufweist. Dieses  $\beta$ -Hämatin erhöht zum einen die TNF $\alpha$ -Produktion von Makrophagen und aktiviert zum anderen auch die Neutrophilen selber. Zusätzlich induziert  $\beta$ -Hämatin die Chemotaxis *in vitro* und die Neutrophilenmigration *in vivo*. Dieser Effekt konnte von den Autoren durch eine erhöhte Aktivität von MPO gemessen werden [80]. Die MPO erhöht durch ihre enzymatische Eigenschaft ROS wie z.B. HOCl [60] und wird essenziell für die Bildung von NETs nach Neutrophilenaktivierung benötigt [62]. Hierdurch ist sie an der Abwehr zahlreicher Bakterien und Pilze beteiligt [59]. Dass MPO-Ko-Mäuse eine geringere Parasitämie als WT-Mäuse aufweisen, ist deshalb überraschend, da für ROS, genauso wie für NO, eine antiplasmodiale Wirkung beschrieben wird [81]. Auf der anderen Seite wurde von Sobolewski *et al.* [82] gezeigt, dass *PbA*-Blutphaseparasiten gegen ROS und NO-Gabe resistent waren. Außerdem scheint eine Phagozytose von Malariaparasiten durch Neutrophile unabhängig von der MPO-Aktivität zu sein [83].

An einer effektiven Parasiteneliminierung ist die Milz als zentrales Organ maßgeblich beteiligt. Sie ist in der Malaria ein wichtiger Ort für die Beseitigung von pRBZ aus der Zirkulation, Aktivierung der T- und B-Zellen durch Parasiten-Antigenpräsentation der APZ sowie Bildung neuer RBZ [32]. Dadurch kommt es in der Infektion zu einer strukturellen Veränderung in der Milz, die zu deren Vergrößerung führt [16]. Neben der Parasitämie sollte in den WT- und MPO-Ko-Mäusen daher auch die Rolle der Milz untersucht werden. Es wurde dafür zunächst die Vergrößerung der Milz während der Infektion analysiert. Dies geschah anhand des Quotienten aus Milzgewicht und Tibialänge, der es ermöglicht, Organgrößen trotz unterschiedlichen Alters und Größe der Mäuse zu vergleichen [70]. Bereits in naiven Mäusen waren die Milzen von MPO-Ko-Mäusen signifikant gegenüber denen von WT-Mäusen vergrößert. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls am Tag 12 nach Infektion. Es wurde vermutet, dass diese vergrößerte Milz in den MPO-Ko-Mäusen mit einer erhöhten Eliminierung der pRBZ in der Milz einhergeht und deshalb weniger Parasiten in der Zirkulation zu finden waren. Deshalb sollte überprüft werden, ob ein höherer Anteil an pRBZ in der Milz von MPO-Ko-Mäusen abgefangen wird. Die Parasitämie des Blutes und der roten Pulpa der Milz am Tag 6 nach

Infektion wurden infolgedessen ermittelt. Sowohl im Blut als auch in der Milz zeigte sich in den MPO-Ko-Mäusen eine geringere Parasitämie. Die Parasitämiewerte in Blut- und Milz wurden ins prozentuale Verhältnis gesetzt, um zu ermitteln, ob sich die Parasitämie in der Milz von der Parasitämie im peripheren Blut im Vergleich der beiden Mausgruppen unterschied. Dieses Verhältnis war in den MPO-Ko-Mäusen leicht, aber nicht signifikant erhöht. Ein erhöhtes Abfangen von pRBZ in der Milz als Ursache für die verbesserte Parasiteneliminierung in den MPO-Ko-Mäusen erscheint daher unwahrscheinlich. Allerdings konnten mit dieser Methode nicht die pRBZ in der Milz erfasst werden, die bereits phagocytiert oder den Prozess des „Pitting“ durchlaufen hatten [32]. Außerdem ist es strittig, inwieweit die Milzgröße mit der Parasitämie in der Malaria zusammenhängt. Während im Mausmodell bei niedriger Parasitämie auch eine kleinere Milz beobachtet worden ist [84], wurden von Humanstudien berichtet, dass eine Milzvergrößerung nicht in Korrelation mit der Parasitenlast stand [85, 86].

Basierend auf diesen Ergebnissen und der vorhandenen Literatur sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit anhand von unterschiedlichen experimentellen Strategien die zugrunde liegenden Mechanismen für die in den MPO-Ko-Mäusen beobachtete erhöhte Parasiteneliminierung untersucht werden. Dies sollte Hinweise auf die Bedeutung der hohen MPO-Plasmaspiegel in der humanen Malaria geben. Es wurden zwei Hypothesen für die Ursache der verbesserten Parasiteneliminierung bei den MPO-Ko-Mäuse aufgestellt. Zum einen könnte die MPO, ähnlich wie die Leukozyten-Endothel-Interaktion, auch die Adhäsion der pRBZ an das Endothel verstärken. Dadurch würden die sequestrierten pRBZ vermehrt in der Peripherie verbleiben und der Eliminierung in der Milz entgehen. Zum anderen könnte die von der MPO katalysierte Produktion von ROS die Immunantwort gegen die Plasmodien inhibieren, da sie nicht wie beobachtet zu einer verbesserten Parasiteneliminierung zu führen scheint. Des Weiteren sollte der Einfluss der MPO für die Pathogenese in der Malaria untersucht werden.

## **5.2 Einfluss der MPO auf die Endothelfunktion und Mikrozirkulation**

Durch die Involvierung der MPO in die Regulation der zellulären Homöostase kann MPO eine wichtige Rolle in der Entstehung von vaskulären inflammatorischen Erkrankungen spielen [56]. Diese Mechanismen könnten auch in der Malaria von Bedeutung sein. Es wurde beschrieben, dass Mäuse nach Neutrophilendepletion im frühen Stadium der Malariainfektion keine EZM mehr entwickelten [87]. In der *P. falciparum*-Infektion beim

Menschen ist das Auftreten von ZM eine lebensbedrohende Komplikation. Diese ist durch ein Verstopfen der zerebralen Mikrogefäße aufgrund von pRBZ-Sequestration und Ablagerung von Immunkomplexen gekennzeichnet [88]. Die MPO verstärkt eine Aktivierung der Neutrophilen über Bindung an deren CD11b/CD18-Integrine auf der Oberfläche und führt dadurch zur erhöhten Degranulation [89]. Dies könnte daher auch die Entstehung von EZM beeinflussen. Zudem wurde gezeigt, dass durch die MPO generierte ROS eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke induzieren [90]. Es wurde daher untersucht, ob MPO-Ko-Mäuse suszeptibel für EZM sind. Jedoch zeigte sich in mit *PbA* infizierten Mäusen, dass MPO-Ko-Mäuse genauso wie die WT-Mäuse EZM entwickelten. Alle Mäuse zeigten neurologische Symptome in dem für EZM charakteristischem Zeitraum von 6-9 Tagen nach Infektion. Auch die Parasitämie, die am Tag 5 nach Infektion gemessen wurde, unterschied sich in den beiden Mausgruppen mit *PbA*-Infektion nicht signifikant voneinander. Der vor der Entwicklung einer EZM schützende Effekt einer Neutrophilendepletion scheint daher nicht aufgrund einer Abwesenheit von MPO verursacht worden zu sein.

Als nächstes sollte der direkte Einfluss von MPO auf die Endothelfunktion untersucht werden. Die MPO akkumuliert in der subendothelialen Matrix von Gefäßen, wo sie die posttranslationale Proteinmodifikation über Oxidierung von NO katalysiert [66]. Diese Bindung von MPO an das Endothel und die Oxidation von vom Endothel produziertem NO steht z.B. in Zusammenhang mit endothelialer Dysfunktion bei der Erkrankung der Koronararterien [63]. Für die Untersuchung der Endothelfunktion wurde das Modell zur Analyse der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit verwendet. Dabei werden Aortensegmente von Mäusen *in vitro* kontrahiert und anschließend durch kumulative Gabe von ACh dilatiert. Das ACh stimuliert die NO-Produktion in den Endothelzellen. NO löst daraufhin in den glatten Gefäßmuskelzellen über den cyclisches-Guanosinmonophosphat (cGMP)-Signalweg die Relaxation des Blutgefäßes aus. Mit diesem Modell wurde von Eiserich et al. bereits gezeigt, dass eine Inkubation von Rattenaortensegmenten mit MPO die endothelabhängige Relaxation verringerte, während die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit gleich blieb [61]. Dieser Effekt konnte desgleichen in Aortensegmenten von mit LPS behandelten Ratten gesehen werden. In naiven und mit *PyNL* infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen sollte nun ebenso die Relaxationsfähigkeit analysiert werden. Dabei zeigte sich eine signifikant stärkere endothelabhängige Relaxation in den infizierten WT-Mäusen im Vergleich mit sowohl

naiven WT-Mäusen als auch infizierten MPO-Ko-Mäusen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hohe MPO-Plasmaspiegel in der Malaria nicht mit einer verschlechterten Endothelfunktion einhergehen. Die WT-Mäuse besaßen dem Anschein nach eine höhere NO-Bioverfügbarkeit, welches eventuell auf eine erhöhte Aktivität der iNOS [91] oder eNOS in den Endothelzellen zurückzuführen sein könnte [92]. Neben der Relaxationskurve mit ACh wurde außerdem eine Kontrollkurve zur endothelunabhängigen Relaxation mit NTG durchgeführt. Diese diente zur Prüfung der vollen Funktionsfähigkeit des von NO induzierten Signalweges in den glatten Muskelzellen. Die durch NTG ausgelöste Relaxationskurve zeigte keine Unterschiede. Einzige Ausnahme war eine verschlechterte endothelunabhängige Relaxation von infizierten gegenüber naiven WT-Mäusen bei hoher NTG-Konzentration. Dies schien aber nicht den Effekt der endothelabhängigen Relaxation zu beeinflussen, da dort trotzdem eine verbesserte Relaxation in den infizierten WT-Mäusen gemessen werden konnte.

Neben der Endothelfunktion sollte ferner untersucht werden, ob MPO die Sequestration und die Mikrozirkulation beeinflusst. Endotheladhäsion und Sequestration von pRBZ und nicht parasitierten RBZ [12] sind entscheidende Faktoren in der Entstehung von Mikrozirkulationsstörungen, die zu Organversagen führen können. Die MPO könnte diese Faktoren dadurch beeinflussen, da sie nicht nur an das Endothel bindet [66], sondern dieses auch aktiviert. So wurde für HOSCN, einem Produkt der enzymatischen Aktivität von MPO, in *in vitro* gezeigt, dass es die Expression von E-Selektin, ICAM-1 und *vascular cell adhesion protein-1* (VCAM-1) auf humanen umbilikalen venösen Endothelzellen über die Aktivierung des transkriptionalen NF- $\kappa$ B-Signalweges erhöht [93]. Diese Zelladhäsionsproteine können auch als Rezeptor für PfEMP-1 in der *P. falciparum*-Infektion dienen. PfEMP-1 ist in der *P. falciparum*-Infektion der seitens des Parasiten auf der Oberfläche der pRBZ exprimierte Rezeptor, der für die Adhäsion an das Endothel essenziell ist [9].

Für die Untersuchung der Mikrozirkulation wurde zunächst der Blutfluss in infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen bestimmt. Dieser war allerdings in den beiden Mausgruppen weder in den kleineren Blutgefäßen mit Durchmesser von 10-25  $\mu$ m noch in den mittelgroßen Gefäßen mit Durchmesser von 25-50  $\mu$ m unterschiedlich. Bei der Messung des Blutflusses in infizierten WT-Mäusen gegenüber naiven Mäusen war eine

Verminderung des Blutflusses in den mittelgroßen Gefäßen sichtbar. In den kleineren Gefäßen konnte keine Verminderung festgestellt werden. Es gab lediglich eine vorübergehende Steigerung des Blutflusses an Tag 6. Dies könnte auf einem Kompensierungseffekt durch die kleineren Blutgefäße beruhen, um den verringerten Blutfluss in den mittelgroßen Gefäßen auszugleichen [94]. Andere Forschungsgruppen konnten im Mausmodell ebenfalls eine Verringerung der RBZ-Geschwindigkeit in infizierten gegenüber naiven Mäusen feststellen [95,96].

Abgesehen von dem Blutfluss wurde in diesen Gefäßen der infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen außerdem das Auftreten von pRBZ-Adhäsion an das Endothel dokumentiert. Diese Adhäsion könnte von MPO auf ähnliche Weise beeinflusst werden wie die Leukozyten-Adhäsionskaskade, welche vom Ablauf her Ähnlichkeiten zur pRBZ-Endothel-Interaktion hat [97]. Die MPO leitet die Leukozyten-Adhäsionskaskade ein, indem sie den ersten Kontakt zwischen Neutrophil und Endothel über elektrostatische Wechselwirkung herstellt und die zirkulierenden Neutrophilen abbremst, bevor es zur nachfolgenden Selektin- sowie Integrin-Ligand-Bindung kommt. Die stark kationische MPO bindet dabei an die negativ geladene Oberfläche der Neutrophilen und an die des Endothels und vermindert hierdurch die elektrostatische Abstoßung zwischen diesen beiden [68]. Auch die Oberfläche der RBZ ist negativ geladen, wobei sich die Anzahl der anionischen Ladungen auf der Oberfläche der pRBZ in der Malariainfektion noch erhöht. Dieser Effekt beruht auf Veränderungen der Plasmamembran begleitet durch verstärkte Phosphatidylserin-Exposition [98]. Die positiv geladene MPO könnte dementsprechend verstärkt an pRBZ binden und somit die erste Interaktion mit dem Endothel forcieren, bevor es zur Ligand-Rezeptorbindung kommt. Dadurch könnte MPO die Sequestration fördern und entsprechend eine Parasiteneliminierung in der Milz verhindern, was die gesteigerte Parasitenlast in den WT-Mäusen erklären könnte. Infolgedessen sollte die Adhäsion von pRBZ an das Endothel der Blutgefäße von infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass in beiden Mausgruppen die Anzahl an adhärierenden pRBZ pro Gefäß in den mittelgroßen Gefäßen größer war als in den kleinen Gefäßen. Kaul *et al.* beobachteten hingegen in den Venen des *Musculus cremaster* von Mäusen eine erhöhte Adhäsion von pRBZ je geringer der Durchmesser des venösen Gefäßes war [95]. Während in den mittelgroßen Gefäßen keine großen Unterschiede in der Anzahl der adhärierenden pRBZ pro Gefäß zu beobachten war, war diese bei den MPO-Ko-Mäusen in den kleineren Gefäßen vermindert. Dies lässt eine

Involvierung der MPO bei der pRBZ-Sequestration vermuten. Da aber dieser beobachtete Effekt nur gering ausfiel, konnte der Einfluss von MPO auf die pRBZ-Endotheladhäsion nicht eindeutig belegt werden. Allerdings ist dabei auch zu beachten, dass für Mausmodelle wenig über die Rezeptoren und Liganden der Sequestration bekannt ist und dass diese eventuell anders als im Menschen ablaufen könnte [99]. Ein Einfluss von MPO auf die Endothelrezeptoren wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, welche als Rezeptoren für die pRBZ-Endotheladhäsion in der *P. falciparum*-Infektion fungieren, könnte für die humane Malaria daher durchaus von Bedeutung sein.

### **5.3 Einfluss der MPO auf die Immunantwort gegen *PyNL***

Nachdem die Ergebnisse dieser Arbeit bereits gezeigt hatten, dass MPO-Ko-Mäuse die *PyNL*-Infektion früher kontrollieren können als WT-Mäuse, sollte ermittelt werden, ob dieser Effekt auch auftritt, wenn die Hauptproduzenten von MPO, die Neutrophilen, depletiert werden. WT-Mäuse wurden dafür einen Tag vor der Infektion mit anti-GR-1 behandelt. Dieser Antikörper bindet nicht nur an Ly6-G, einem Granulozytenoberflächenmarker, sondern auch an Ly6-C. Ly6-C ist außer auf Neutrophilen auch noch auf DZ sowie Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen exprimiert [100]. Für eine reine Depletion der Neutrophilen wurde daher in einem zweiten Versuch den Mäusen anti-Ly6-G einen und zwei Tage vor der Infektion verabreicht. Die Mausgruppe, die anti-GR-1 erhielt, hatte eine leicht, jedoch nicht signifikant, verminderte Parasitämie als die Gruppe mit dem Kontrollantikörper. Nach anti-Ly6-G-Depletion hingegen konnte eine signifikant niedrigere Parasitämie an Tag 6 und 12 nach Infektion festgestellt werden. Dennoch ist keine frühere Parasiteneliminierung wie bei den MPO-Ko-Mäuse zu beobachten, wo die Parasitämie signifikant an den Tagen 15 und 18 nach Infektion vermindert war. Es muss allerdings dabei berücksichtigt werden, dass die durchgeführte Neutrophilendepletion nur eine transiente Depletion ist und die Zellen nach 3-6 Tagen im Organismus repopulieren.

Neutrophile sind im Immunsystem die erste Verteidigungslinie, da sie schnell zum Infektionsort migrieren können [101]. Sie könnten daher gerade zu Beginn der Infektion für die Parasitenabwehr wichtig sein. Interessanterweise konnte in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell genau dieses nicht beobachtet werden. Mäuse, die zu Beginn der Infektion keine Neutrophilen besaßen, hatten keine erhöhte sondern eine leicht verminderte Parasitämie. Dieses ist überraschend, da von anderen gezeigt worden war,

dass Neutrophile sowohl Merozoiten [102] als auch pRBZ phagozytieren können [83]. Zudem wird vermutet, dass die in den letzten Jahren bekannt gewordene Fähigkeit der Neutrophilen zur NET-Bildung auch eine Rolle in der Malaria spielen könnte. So wurde eine Adhäsion von NET-Strukturen an pRBZ sowie RBZ in Kindern mit *P. falciparum*-Infektion beobachtet [103]. Auf der anderen Seite wurde berichtet, dass Makrophagen für die Kontrolle der ersten Parasitenwelle verantwortlich sind [33]. Des Weiteren können Monozyten pRBZ phagozytieren [104] sowie sich nach Aktivierung in Makrophagen oder DZ differenzieren [105]. Die Involvierung der Monozyten und Makrophagen in der Eliminierung der Parasiten könnte eine Ursache dafür sein, dass der Parasitämie-vermindernde Effekt von anti-GR-1, welcher neben Neutrophilen auch Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen depletiert [100], weniger stark ausfiel als von anti-Ly6-G. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Neutrophile im Mausmodell der Malaria eher einen inhibierenden Einfluss auf die Immunantwort haben und nicht protektiv wirken. Darüber hinaus tragen sie auch zur Pathogenese der Malaria bei, z.B. durch Induzierung der Apoptose von Endothelzellen durch die von Neutrophilen sekretierten Produkte [106].

Ein von Neutrophilen produzierter Immunmediator ist das NO. Für dieses wird eine Beteiligung an der Parasiteneliminierung über dessen oxidative Metabolite postuliert [107,108]. Außer von Neutrophilen wird NO allerdings auch von diversen anderen Zelltypen freigesetzt, wobei in inflammatorischen Erkrankungen insbesondere die Makrophagen zu einer Produktion von NO beitragen [92]. Es ist abgesehen davon strittig, welche Rolle NO in der Pathogenese der Malaria spielt. So wurden auf der einen Seite hohe NO-Konzentrationen mit dem fatalen Ausgang einer ZM-Erkrankung in Zusammenhang gebracht [109]. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass Mäuse, die inhalativ NO erhielten, vor dem Auftreten einer EZM besser geschützt waren [110]. Eine der Hauptquellen für oxidierte Metabolite von NO ist der Verbrauch von NO durch das MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-katalytische-System [61]. In MPO-Ko- und WT-Mäusen sollte daher der Gehalt aus den im Plasma zirkulierenden Oxidationsprodukten von NO, Nitrat und Nitrit, gemessen werden. Während sich die Werte in den naiven Mäusen nicht unterschieden, konnten im Plasma von infizierten WT-Mäusen signifikant erhöhte Konzentrationen an Nitrat/Nitrit ermittelt werden. Obwohl Nitrat/Nitrit *in vitro* zur Eliminierung von *P. falciparum* führt [107], scheint es *in vivo* im Mausmodell nicht essenziell an der Parasitenbeseitigung beteiligt zu sein. Die MPO-Ko-Mäuse zeigten keine erhöhten

Konzentrationen an Nitrat/Nitrit im Plasma und besaßen trotzdem eine bessere Parasitenkontrolle. Neben der Messung der Metabolite von NO im Plasma wurde zudem die Genexpression von eNOS und iNOS in Herz- und Lungengewebe von infizierten Mäusen bestimmt. Sowohl von eNOS als auch iNOS war die mRNA-Expression in MPO-Ko-Mäusen gegenüber WT-Mäusen erniedrigt. Dieser Befund untermauert die Annahme, dass in WT-Mäusen eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit vorliegt, worauf bereits die Versuche zur endothelialen Vasodilatationsfähigkeit hindeuteten. Ursächlich hierfür könnte sein, dass MPO die katalytische Aktivität der iNOS hochreguliert, indem es den von NO ausgelösten *feedback*-Effekt inhibiert [111]. Dieses könnte ebenfalls zur erhöhten iNOS-Expression führen. Dass NO- bzw. iNOS-Engagement im Mausmodell nicht essenziell für die Parasiteneliminierung ist, wird durch die Ergebnisse von Gillmann *et al.* [112] bestätigt, welche bei der *P. chabaudi*-Infektion keinen Unterschied in der Parasitämie zwischen iNOS-Ko- und Kontrollmäusen ermitteln konnten.

Bei Patienten mit MPO-Defizienz wurde jedoch vermutet, dass eine erhöhte Produktion von NO sowie  $O_2^-$  die fehlende enzymatische Aktivität der MPO ausgleicht. Diese Patienten zeigten kein stark erhöhtes Risiko für bakterielle Infektionen, obwohl für MPO eine antimikrobielle Funktion beschrieben ist [52]. Für eine Kompensation durch  $O_2^-$  würde sprechen, dass RAG-Ko-Mäuse, die keine T- und B-Zellen besitzen [24], mit einer zusätzlichen Defizienz für MPO keine erhöhte Suszeptibilität für Infektionen aufgewiesen haben [113]. Dagegen haben RAG-Ko-Mäuse, die auch eine Defizienz für NADPH-Oxidase besitzen, eine deutlich verringerte Überlebensrate, wobei die iNOS-Aktivität in diesen Mäusen nicht beeinträchtigt ist [113]. Aufgrund dessen wurde in den mit PyNL infizierten WT- und MPO-Ko-Mäusen neben der iNOS- und eNOS-Genexpression auch die Genexpression für die NADPH-Oxidase untersucht. Das war allerdings in den MPO-Ko-Mäusen ebenfalls geringer als in den WT-Mäusen. Dieses lässt ein erhöhtes Engagement der NADPH-Oxidase als Ursache für die verbesserte Parasiteneliminierung durch die MPO-Ko-Mäuse unplausibel erscheinen. Dafür würde darüber hinaus sprechen, dass eine Defizienz für NADPH-Oxidase im Mausmodell keinen Einfluss auf die Parasitämie hat [114].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass weder die Neutrophilen noch die MPO selber förderlich für die Parasiteneliminierung in der Malaria sind. Des Weiteren konnte keine Beteiligung von durch eNOS oder iNOS produziertem NO sowie der NADPH-

Oxidase an der verbesserten Parasiteneliminierung festgestellt werden. Dies sind alles Immunmediatoren des angeborenen Immunsystems. Es sollte infolgedessen geklärt werden, ob eine verminderte Parasitämie auch in den MPO-Ko-Mäusen zu beobachten ist, wenn das adaptive Immunsystem abwesend ist. Dafür wurden RAG-Ko-Mäuse verwendet und diese mit RAGxMPO-Ko-Mäusen verglichen. RAG initiiert die VDJ-Rekombination und ohne diese entstehen keine T- und B-Zellen [24]. Die RAG-Ko-Mäuse besitzen daher nur das angeborene Immunsystem und die RAGxMPO-Ko-Mäuse haben zusätzlich dazu noch eine Defizienz für MPO. Beide Mausgruppen wurden mit PyNL infiziert und der Parasitämieverlauf verglichen. Dabei wurde kein Unterschied in der Parasitämie ermittelt. Dies lässt eine Involvierung des adaptiven Immunsystems in der verbesserten Immunantwort in den MPO-Ko-Mäusen vermuten, wohingegen die MPO auf die angeborene Immunantwort keinen für den Infektionsverlauf entscheidenden Einfluss zu haben scheint.

Aufgrund dieses Ergebnisses, dass eine MPO-Defizienz die Parasiteneliminierung nicht verbessert, wenn das adaptive Immunsystem abwesend ist, sollte im nächsten Schritt die T-Zellantwort in den MPO-Ko-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen charakterisiert werden. Dafür wurde die Frequenz der IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. Es ließ sich feststellen, dass am Tag 18 nach der Infektion der prozentuale Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Lymphozytenpopulation signifikant in den MPO-Ko-Mäusen gegenüber dem der WT-Mäuse erhöht ist. Zudem konnte eine erhöhte Frequenz an IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$  produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den MPO-Ko-Mäusen ermittelt werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in der Immunantwort gegen Malaria hauptsächlich in der Leberphase für eine schützende Wirkung von Bedeutung. Von CD8<sup>+</sup> T-Zellen sekretiertes IFN $\gamma$  induziert die Produktion von NO und ROS in den Hepatozyten. Diese Immunmediatoren können daraufhin die Plasmodium-Leberphase inhibieren [115]. Außerdem können an der schützenden CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort auch direkt zytotoxische, Perforin-vermittelte Signalwege [116] sowie von CD8<sup>+</sup> T-Zellen sekretiertes TNF $\alpha$  [117] beteiligt sein. In der Blutphase hingegen ist für CD8<sup>+</sup> T-Zellen hauptsächlich eine Rolle in der Pathogenese beschrieben, da sie im Gehirn sequestrieren und dort an pathophysiologischen Effektormechanismen der EZM beteiligt sind [118]. Ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch eine schützende Immunantwort in der Blutphase vermitteln, wird dagegen kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen, dass ein Transfer von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur

Parasitenkontrolle führt [119], während andere dagegen sprechen [120]. Es wurde allerdings beobachtet, dass sowohl CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Blutphase aktiviert sind [121].

Dagegen sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie IFN $\gamma$  essenziell für die Parasiteneliminierung in der Blutphase [122]. Die Frequenz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtlymphozytenpopulation war wie die Frequenz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen am Tag 18 nach Infektion in den MPO-Ko-Mäusen erhöht. Fernerhin konnte ein höherer Anteil an IFN $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den MPO-Ko-Mäusen identifiziert werden. Obendrein gibt es in dieser Mausgruppe einen größeren Anteil an TNF $\alpha$ -produzierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen während des gesamten Infektionsverlaufes. Neben den durchgeführten durchflusszytometrischen Bestimmungen wurde auch die Zytokinkonzentration im Plasma mittels CBA gemessen. Dabei ergab sich, dass die IFN $\gamma$ -Konzentration im Plasma der MPO-Ko-Mäuse am Tag 6 nach Infektion leicht und am Tag 12 nach Infektion signifikant erhöht war. Die Konzentration von TNF $\alpha$  hingegen war im Plasma nicht signifikant erhöht. Neben diesen beiden Zytokinen wurde außerdem auch noch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 bestimmt. Das Ergebnis dieser Messung deutet auf eine verminderte Konzentration an IL-10 im Plasma am Tag 6 nach Infektion hin. Wegen der hohen Standardabweichung der Proben der WT-Mausgruppe ließ sich jedoch keine statistische Signifikanz erreichen. Die erhöhte Frequenz der IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Spätphase der Infektion sowie die gemessene, erhöhte IFN $\gamma$ -Plasmakonzentration weisen auf einen ursächlichen Effektormechanismus für die beobachtete, bessere Parasiteneliminierung in den MPO-Ko-Mäusen hin. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass nach Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Mäusen mit *PyNL*-Infektion die Parasitämie unkontrolliert ansteigt [123]. Es wurde zudem gezeigt, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen ab Tag 5 nach *PyNL*-Infektion die Hauptproduzenten von IFN $\gamma$  sind. Ferner weisen Mäuse mit einer Defizienz für IFN $\gamma$  zwar zu Beginn der Infektion eine verminderte Parasitämie auf, können aber die Parasitenlast im Blut erst später vollständig beseitigen [124].

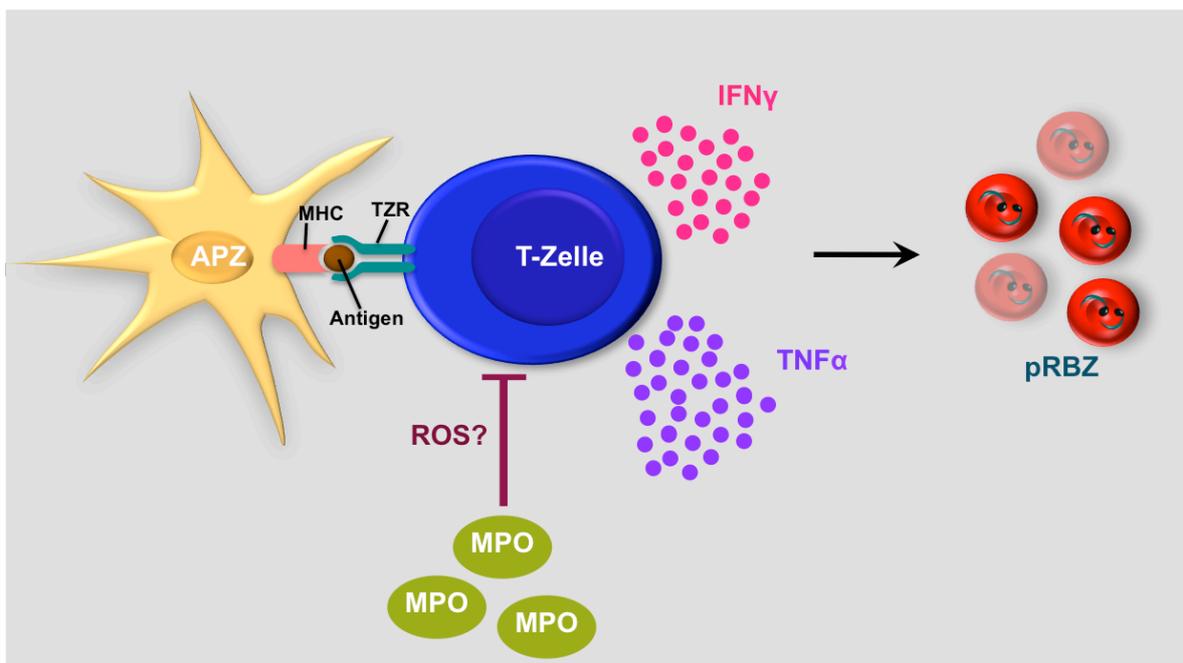
Um zu untersuchen, ob die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort auch in Abwesenheit der Neutrophilen, den Hauptproduzenten von MPO, verbessert ist, wurde außerdem der Einfluss eines neutrophilendepletierenden Antikörpers auf die Immunantwort untersucht. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in diesem Versuch für die Klassifizierung der

CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen für die Klassifizierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen würden dabei auch die natürlichen Killer-T-Zellen umfassen, die aber in einem viel kleinerem Verhältnis als die CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milzzelllymphozytenpopulation vorhanden sind. Sie machen dabei nur ein Prozent der gesamten T-Zellen in der Milz aus [125] und wurden daher in der Analyse der Ergebnisse vernachlässigt. Für WT-Mäuse, die vor der Infektion anti-Ly6-G zur Neutrophilendepletion erhalten hatten, konnte eine höhere Frequenz an TNF $\alpha$ -produzierenden CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie ein größerer Anteil an IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -produzierenden CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt werden. Als Kontrolleexperiment zur Auswirkung des neutrophilendepletierenden Antikörpers wurde der gleiche Versuch ebenfalls mit MPO-Ko-Mäusen durchgeführt. Interessanterweise war auch hier die Frequenz der zytokinproduzierenden T-Zellen erhöht, wenn auch mit weniger stark ausgeprägtem Effekt. Zusätzlich wurde die MPO-Konzentration und der Nitrat/Nitrit-Gehalt im Plasma der mit anti-Ly6-G behandelten WT-Mäuse bestimmt. Es wurde überraschenderweise auch hier eine hohe Konzentration an MPO gefunden. Der Nitrat/Nitrit-Gehalt war zudem genauso hoch wie in der WT-Mausgruppe, die den Kontrollantikörper erhalten hatte. Der Antikörper führt dadurch also nicht, wie angenommen, zu einer merklichen Reduktion von MPO. Das könnte zum einen daran liegen, dass die Depletion nur transient verläuft und schon der erste Schub an neu gebildeten Neutrophilen zur Erhöhung der MPO-Konzentration führt. Zum anderen ist unklar, wie die mit dem neutrophilendepletierenden Antikörper markierten Neutrophilen aus der Zirkulation entfernt werden. Als Mechanismus wird eine Beteiligung des Komplementsystems sowie Opsonierung mit nachfolgender Phagozytose durch Makrophagen vermutet [126]. Es ist dabei nicht bekannt, ob die Neutrophilendepletion zur Ausschüttung von MPO aus den Granula führt und somit die MPO-Konzentration erhöhen würde.

Die verschlechterte T-Zellantwort von infizierten WT- gegenüber MPO-Ko-Mäusen könnte sich mechanistisch dadurch erklären lassen, dass die von MPO generierten ROS die T-Zellen supprimieren. Hinweise aus der Literatur unterstützen diese Hypothese. So induziert z.B. HOCl über oxidiertes LDL *in vitro* die T-Zellapoptose von Jurkat-T-Zellen [127]. Des Weiteren wird von Samstag *et al.* beschrieben, dass ein oxidatives Milieu Cofilin inaktiviert [128]. Dieses ist wichtig für die Bildung der immunologischen Synapse und T-Zellaktivierung. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie andere physiologische Oxidantien können zudem die

Kalzineurinaktivität in T-Zellen inhibieren [129]. Kalzineurin wird für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT benötigt, welcher die Proliferation der T-Zelle initiiert. Dass eine Depletion von Neutrophilen in WT- und MPO-Ko-Mäusen ebenso zu einer verbesserten T-Zellantwort führt, könnte daran liegen dass insgesamt die Konzentration an ROS und RNI, zu der nicht nur die MPO, sondern auch die NADPH-Oxidase und iNOS beitragen [52], vermindert wird.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl der Anteil der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtlmphozytenpopulation in den MPO-Ko-Mäusen in der Spätphase der Infektion anstieg und zudem die Frequenz der IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhöht war. Dieser Effekt wurde ebenso in abgeschwächter Form in WT- und MPO-Ko-Mäusen nach der Neutrophilendepletion beobachtet. Basierend auf diesen Ergebnissen ist eine Inhibierung der T-Zellen durch von Neutrophilen sezernierte Faktoren wie der MPO denkbar. Diese Inhibierung führt vermutlich zu einer verminderten Parasitenbeseitigung. Diese Hypothese ist im folgenden Modell veranschaulicht:



**Abb. 5.1: Modell zum Einfluss der MPO auf die T-Zellantwort bei der Malariainfektion.** T-Zellen werden über die Antigenpräsentation durch APZ aktiviert und produzieren daraufhin inflammatorische Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , welche letztendlich zu einer Eliminierung der pRBZ führen. Die MPO kann diese T-Zellantwort, vermutlich über die Generierung von ROS, inhibieren und erhöht dadurch die Parasitämie.

## 5.4 Ausblick

Die gezeigten Ergebnisse dieser Arbeit sollten den pathophysiologischen Mechanismus der Malariaerkrankung weiter aufklären, um dadurch Hinweise für die Entwicklung neuer adjuvanter Therapiemöglichkeiten zu erhalten. Eine antiparasitäre Arzneimitteltherapie reicht oft alleine nicht aus, um den lebensbedrohlichen Verlauf der komplizierten Malaria zu verhindern und es stehen bisher nur wenige und zumeist unzureichend klinisch belegte Möglichkeiten für unterstützende Behandlungsmaßnahmen zur Verfügung [130]. Hierfür ist es interessant, dass die MPO die Malariainfektion auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Zum einen führt die MPO, vermutlich über die Generierung von ROS, zu einer Inhibierung der proinflammatorischen T-Zellantwort. Zum anderen fördert sie offenbar die pRBZ-Endotheladhäsion, welches ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der zerebralen Malaria ist. Diese Befunde provozieren eine Reihe weiterführender Fragestellungen. Es wäre von Bedeutung zu untersuchen, ob die T-Zellantwort tatsächlich direkt von oxidativen Produkten der MPO vermindert oder dieser Effekt durch Involvierung anderer Zelltypen vermittelt wird. Infolgedessen könnten Versuche zu einem möglichen Aufheben dieses Effektes durch Einsatz von Antioxidantien oder einem Inhibitor der MPO-Aktivität vorgenommen werden. Des Weiteren ist in dieser Arbeit nicht weiterführend untersucht worden, welche Auswirkung die beobachtete erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen der T-Zellen im Detail hatte und ob eventuell dadurch die B-Zellen und Makrophagen stärker aktiviert wurden. Dieser Mechanismus könnte die verminderte Parasitämie in den MPO-Ko-Mäusen erklären [34]. Es ist dabei jedoch zu beachten, dass die Immunreaktion im Menschen nicht immer identisch wie in der Maus abläuft und im Mausmodell gesammelte Erkenntnisse zunächst im Menschen überprüft werden müssen. So ist z.B. der Anteil der Neutrophilen an der Gesamtleukozytenpopulation im Menschen wesentlich höher als bei der Maus [46]. Einflüsse der von Neutrophilen produzierten MPO könnten beim Menschen demnach im verstärkten Ausmaße auftreten. Ein erster Schritt zur Übertragung der gesammelten Erkenntnisse auf die Analyse der Immunantwort in der humanen Malaria wäre z.B., die T-Zellantwort *in vitro* von Patienten mit Malaria jeweils in Anwesenheit von MPO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, den MPO-produzierenden Neutrophilen oder dessen Hauptprodukt HOCl sowie anderer ROS zu untersuchen. Dieses soll klären, inwieweit die MPO oder ROS dort zu einer Inhibition der T-Zellen führt.

Abgesehen davon wäre es von Interesse, die Rolle der MPO in der Pathogenese weitergehender zu untersuchen. Auch wenn gezeigt wurde, dass MPO im Gegensatz zu kardiovaskulären Erkrankungen die endotheliale Relaxationsfähigkeit bei der Malariainfektion nicht vermindert, scheint MPO an der Sequestration beteiligt zu sein. Es ist denkbar, dass MPO die pRBZ-Endothel-Interaktion auf ähnliche Weise beeinflusst wie die Leukozyten-Adhäsion-Kaskade [68], indem die MPO das Endothel aktiviert und den ersten Kontakt von pRBZ zum Endothel initiiert. Es böte sich an, diese Hypothese in weiteren Modellen zu überprüfen. So könnten z.B. gleichermaßen Untersuchungen im *PbA*-Mausmodell vorgenommen werden, für das ebenfalls eine Sequestration von pRBZ beschrieben wurde [99]. Außerdem könnte eine Verwendung eines humanisierten Mausmodelles zur Malaria in Betracht gezogen werden [131]. Dabei können Mäuse, die keine T- und B-Zellen sowie natürliche Killerzellen besitzen mit *P. falciparum* infiziert werden. Durch Kreuzung dieser Mäuse mit MPO-Ko-Mäusen könnte der MPO spezifische Einfluss bei diesem Mausmodell untersucht werden. Unterstützen diese Versuche die Hypothese einer Förderung der pRBZ-Endotheladhäsion durch MPO, wäre ein Einsatz von Heparin als Therapie denkbar. Es wurde in humanen Studien bereits gezeigt, dass Heparin die an das Endothel gebundene MPO wieder freisetzen kann [63]. Zwar ergab der Einsatz von Heparin in einem anderen Zusammenhang bei klinischen Studien zur Malaria ein erhöhtes Risiko für Blutungen aufgrund des antikoagulativen Effektes, jedoch werden neuentwickelte niedermolekulare Heparine mit geringerem antikoagulativen Effekt als neue Therapieoption postuliert [132]. Diese könnten eventuell ebenfalls zur Inhibierung der MPO-Endothel-Bindung verwendet werden und dadurch einen weiteren Mechanismus der Malariapathogenese verhindern.

## 6. Zusammenfassung

Das leukozytäre Enzym Myeloperoxidase (MPO) wird während einer Infektion oder Entzündung von aktivierten Neutrophilen sezerniert und ist seit langem für seine antimikrobiellen Eigenschaften bekannt. Die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Beteiligung an *neutrophil extracellular trap*-Bildung tragen dabei direkt zur Pathogenabwehr bei. Zudem hat in jüngster Zeit vermehrt der proinflammatorische Einfluss der MPO an Aufmerksamkeit gewonnen. So aktiviert MPO Neutrophile und begünstigt deren Rekrutierung. Des Weiteren bindet die MPO an das Endothel und führt außerdem über ihre oxidativen Produkte zur Endothelaktivierung und endothelialer Dysfunktion. Welche Bedeutung die MPO für die Parasiteneliminierung und Endothelfunktion in der Malaria hat, wurde allerdings bisher kaum aufgeklärt. In dieser Arbeit wurden zunächst die MPO-Plasmaspiegel von Patienten mit importierter *P. falciparum*-Infektion bestimmt. Diese waren um ein Vielfaches gegenüber der Basalkonzentration erhöht. Um im Folgenden weitere Untersuchungen zur Rolle von MPO bei der Malaria durchzuführen, wurde ein Mausmodell der Malaria verwendet. Vergleichbar zu den Ergebnissen in der humanen Malaria wurden auch in infizierten Mäusen erhöhte MPO-Plasmaspiegel gefunden. Zudem wurde gezeigt, dass MPO nicht für eine effektive Kontrolle der Parasitämie benötigt wird. MPO-Knockout (Ko)-Mäuse konnten im Gegenteil die Parasiten früher eliminieren als die Wildtyp (WT)-Kontrollmäuse. Ferner war an dieser verbesserten Parasiteneliminierung offenbar weder die NADPH-Oxidase noch von der induzierbaren oder endothelialen Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase generiertes NO beteiligt, obwohl für ROS und NO eine antiplasmodiale Wirkung postuliert wird. Dafür konnte ein höherer Anteil an Interferon- $\gamma$ - und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -produzierender CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtlymphozytenpopulation bei den MPO-Ko-Mäusen identifiziert werden. Dieses lässt auf einen kausalen Zusammenhang zwischen einer verstärkten T-Zellantwort und der in den MPO-Ko-Mäusen beobachteten verminderten Parasitämie schließen. Davon abgesehen wurde in infizierten WT-Mäusen keine Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatationsfähigkeit gefunden. Jedoch konnte eine leichte Verminderung des Anteils der an dem Endothel adhären den parasitierten roten Blutzellen (pRBZ) in MPO-Ko-Mäusen festgestellt werden. Dieses deutet auf eine Involvierung der MPO bei der pRBZ-Endothel-Interaktion hin, welche ein entscheidender Faktor für die Entstehung der Pathologie in der Malaria darstellt.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass MPO die pRBZ-Adhäsion an das Endothel zu fördern scheint. Darüber hinaus vermindert MPO die proinflammatorische T-Zellantwort. Es wird daher davon ausgegangen, dass diese Faktoren für eine beeinträchtigte Parasiteneliminierung verantwortlich sind.

## 7. Abstract

Myeloperoxidase (MPO) is a leukocyte-derived enzyme produced by activated neutrophils during infection and inflammatory diseases. Its ability to generate reactive oxygen species (ROS) as well as the involvement in neutrophil extracellular trap formation enables MPO to participate directly in pathogen defense. Besides these well-established antimicrobial properties, the proinflammatory features of MPO have recently gained increasing attention. MPO activates neutrophils and promotes their recruitment. It also binds to the endothelium, provokes endothelial dysfunction and endothelial activation via the generation of ROS. So far, it is not known which impact MPO has on parasite clearance and endothelial function in malaria infection. Initially, MPO plasma levels in patients with imported *P. falciparum* infection were measured. In this study high MPO levels could be observed. To further investigate this observation a mouse model was used to study the role of MPO in malaria infection. Similarly to human infection increased MPO plasma levels were found in infected mice. Furthermore, it could be shown that MPO is not required for an effective parasite control. In contrast MPO knockout (ko) mice could clear the infection much earlier than wildtype (WT) control mice. Moreover, neither the engagement of NADPH oxidase nor nitric oxide (NO) produced by the endothelial or inducible NO synthase are responsible for the enhanced parasite clearance, although ROS together with NO have been discussed to possess antiplasmodial function. Instead, an increased proportion of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of the population of lymphocytes could be identified in MPO ko mice, suggesting this to be the causal mechanism for the observed enhancement of parasite clearance. Apart from this no impaired endothelium-dependent vascular relaxation was found in infected WT mice. However, a slightly diminished frequency of adherent parasitized red blood cells (pRBC) to the endothelium could be detected in infected MPO ko mice. This finding could indicate an involvement of MPO in the interaction between pRBC and the endothelium, which is a crucial factor for the development of pathology in malaria infection. Taking together the results of this thesis show that MPO could possibly promote pRBC adhesion to the endothelium. Additionally, MPO diminishes the proinflammatory response of T cells. Therefore it is proposed that these mechanisms are responsible for an impaired parasite clearance.

## 8. Literaturverzeichnis

1. WHO World Malaria Report 2013.
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, et al. (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2095-2128.
3. Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM (2006) The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat Rev Microbiol* 4: 849-856.
4. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH (2010) Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of clinical investigation* 120: 4168-4178.
5. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673-679.
6. Hisaeda H, Yasutomo K, Himeno K (2005) Malaria: immune evasion by parasites. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37: 700-706.
7. Maitland K, Marsh K (2004) Pathophysiology of severe malaria in children. *Acta tropica* 90: 131-140.
8. Olupot-Olupot P, Maitland K (2013) Management of severe malaria: results from recent trials. *Advances in experimental medicine and biology* 764: 241-250.
9. Sherman IW, Eda S, Winograd E (2003) Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind. *Microbes Infect* 5: 897-909.
10. Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M (2009) Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* 11: e16.
11. Rasti N, Wahlgren M, Chen Q (2004) Molecular aspects of malaria pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41: 9-26.
12. Rogerson SJ, Grau GE, Hunt NH (2004) The microcirculation in severe malaria. *Microcirculation* 11: 559-576.
13. Dondorp AM, Pongponratn E, White NJ (2004) Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Trop* 89: 309-317.
14. Herricks T, Antia M, Rathod PK (2009) Deformability limits of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Cell Microbiol* 11: 1340-1353.
15. Griffiths MJ, Ndungu F, Baird KL, Muller DP, Marsh K, et al. (2001) Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe Plasmodium falciparum malaria. *British journal of haematology* 113: 486-491.
16. Del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, et al. (2012) The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol* 14: 343-355.
17. Newton PN, Chotivanich K, Chierakul W, Ruangveerayuth R, Teerapong P, et al. (2001) A comparison of the in vivo kinetics of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen-positive and -negative erythrocytes. *Blood* 98: 450-457.
18. Suwanarusk R, Cooke BM, Dondorp AM, Silamut K, Sattabongkot J, et al. (2004) The deformability of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and P. vivax. *J Infect Dis* 189: 190-194.
19. Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343: 37-49.
20. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819-826.

21. Abbas AK, A. H. Lichtman, and S. Pillai. (2012) Cellular and Molecular Immunology: Saunders.
22. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS (1992) V(D)J recombination: molecular biology and regulation. Annual review of immunology 10: 359-383.
23. Jones JM, Gellert M (2004) The taming of a transposon: V(D)J recombination and the immune system. Immunol Rev 200: 233-248.
24. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, et al. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. Cell 68: 869-877.
25. Reinhardt RL, Kang SJ, Liang HE, Locksley RM (2006) T helper cell effector fates--who, how and where? Current opinion in immunology 18: 271-277.
26. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 299: 1057-1061.
27. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. Cellular & molecular immunology 6: 15-25.
28. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, 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: 8606-8616.
29. Schofield L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, et al. (1996) Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. J Immunol 156: 1886-1896.
30. Kumar S, Gowda NM, Wu X, Gowda RN, Gowda DC (2012) CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells. Parasite Immunol 34: 372-382.
31. Patel SN, Lu Z, Ayi K, Serghides L, Gowda DC, et al. (2007) Disruption of CD36 impairs cytokine response to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo. J Immunol 178: 3954-3961.
32. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH (2005) The importance of the spleen in malaria. Trends Parasitol 21: 75-80.
33. Couper KN, Blount DG, Hafalla JC, van Rooijen N, de Souza JB, et al. (2007) Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of Plasmodium yoelii parasitemia. Infect Immun 75: 5806-5818.
34. Stevenson MM, Riley EM (2004) Innate immunity to malaria. Nat Rev Immunol 4: 169-180.
35. Bull PC, Marsh K (2002) The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. Trends in microbiology 10: 55-58.
36. Cohen S, Mc GI, Carrington S (1961) Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature 192: 733-737.
37. Chakravarty S, Cockburn IA, Kuk S, Overstreet MG, Sacci JB, et al. (2007) CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. Nature medicine 13: 1035-1041.

38. Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR, de Souza JB (2000) Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infection and immunity* 68: 5364-5376.
39. Hermsen C, van de Wiel T, Mommers E, Sauerwein R, Eling W (1997) Depletion of CD4+ or CD8+ T-cells prevents Plasmodium berghei induced cerebral malaria in end-stage disease. *Parasitology* 114 ( Pt 1): 7-12.
40. Villegas-Mendez A, Greig R, Shaw TN, de Souza JB, Gwyer Findlay E, et al. (2012) IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *Journal of immunology* 189: 968-979.
41. Haque A, Best SE, Unosson K, Amante FH, de Labastida F, et al. (2011) Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *Journal of immunology* 186: 6148-6156.
42. Steeg C, Adler G, Sparwasser T, Fleischer B, Jacobs T (2009) Limited role of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 183: 7014-7022.
43. Gimenez F, Barraud de Lagerie S, Fernandez C, Pino P, Mazier D (2003) Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60: 1623-1635.
44. van der Heyde HC, Gramaglia I, Sun G, Woods C (2005) Platelet depletion by anti-CD41 (alphaIIb) mAb injection early but not late in the course of disease protects against Plasmodium berghei pathogenesis by altering the levels of pathogenic cytokines. *Blood* 105: 1956-1963.
45. Chen L, Zhang Z, Sendo F (2000) Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clinical and experimental immunology* 120: 125-133.
46. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30: 459-489.
47. Smith JA (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of leukocyte biology* 56: 672-686.
48. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-689.
49. Murdoch C, Finn A (2000) Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95: 3032-3043.
50. Zhelev DV, Alteraifi A (2002) Signaling in the motility responses of the human neutrophil. *Annals of biomedical engineering* 30: 356-370.
51. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80: 617-653.
52. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017.
53. Babior BM, Curnutte JT, Kipnes RS (1975) Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 85: 235-244.
54. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, et al. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
55. Mathy-Hartert M, Bourgeois E, Grulke S, Deby-Dupont G, Caudron I, et al. (1998) Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes.

- Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire 62: 127-132.
56. Lau D, Baldus S (2006) Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* 111: 16-26.
  57. Tiden AK, Sjogren T, Svensson M, Bernlind A, Senthilmohan R, et al. (2011) 2-thioxanthines are mechanism-based inactivators of myeloperoxidase that block oxidative stress during inflammation. *The Journal of biological chemistry* 286: 37578-37589.
  58. Moreland JL, Gramada A, Buzko OV, Zhang Q, Bourne PE (2005) The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC bioinformatics* 6: 21.
  59. Allen RC, Stephens JT, Jr. (2011) Myeloperoxidase selectively binds and selectively kills microbes. *Infect Immun* 79: 474-485.
  60. Davies MJ (2011) Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr* 48: 8-19.
  61. Eiserich JP, Baldus S, Brennan M-L, Ma W, Zhang C, et al. (2002) Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 296: 2391-2394.
  62. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, et al. (2011) Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 117: 953-959.
  63. Baldus S, Rudolph V, Roiss M, Ito WD, Rudolph TK, et al. (2006) Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase. *Circulation* 113: 1871-1878.
  64. Pawlus J, Ho?ub M, Kozuch M, Dabrowska M, Dobrzycki S (2010) Serum myeloperoxidase levels and platelet activation parameters as diagnostic and prognostic markers in the course of coronary disease. *Int J Lab Hematol* 32: 320-328.
  65. Malle E, Waeg G, Schreiber R, Grone EF, Sattler W, et al. (2000) Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 267: 4495-4503.
  66. Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, et al. (2001) Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* 108: 1759-1770.
  67. Burgner D, Rockett K, Kwiatkowski D (1999) Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child* 81: 185-188.
  68. Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph TK, et al. (2011) Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* 117: 1350-1358.
  69. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, et al. (2005) Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 431-436.
  70. Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG (1982) Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 243: H941-947.
  71. Goldmann BU, Rudolph V, Rudolph TK, Holle A-K, Hillebrandt M, et al. (2009) Neutrophil activation precedes myocardial injury in patients with acute myocardial infarction. *Free Radic Biol Med* 47: 79-83.

72. Tischendorf FW, Brattig NW, Büttner DW, Pieper A, Lintzel M (1996) Serum levels of eosinophil cationic protein, eosinophil-derived neurotoxin and myeloperoxidase in infections with filariae and schistosomes. *Acta Trop* 62: 171-182.
73. Mohammed AO, Elghazali G, Mohammed HB, Elbashir MI, Xu S, et al. (2003) Human neutrophil lipocalin: a specific marker for neutrophil activation in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop* 87: 279-285.
74. Berkley J, Mwarumba S, Bramham K, Lowe B, Marsh K (1999) Bacteraemia complicating severe malaria in children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 283-286.
75. Stauga S, Hahn A, Brattig NW, Fischer-Herr J, Baldus S, et al. (2013) Clinical relevance of different biomarkers in imported *Plasmodium falciparum* malaria in adults: a case control study. *Malar J* 12: 246.
76. Rudolph V, Keller T, Schulz A, Ojeda F, Rudolph TK, et al. (2012) Diagnostic and prognostic performance of myeloperoxidase plasma levels compared with sensitive troponins in patients admitted with acute onset chest pain. *Circ Cardiovasc Genet* 5: 561-568.
77. Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K, Newton CR (2002) Changes in white blood cells and platelets in children with *falciparum* malaria: relationship to disease outcome. *British journal of haematology* 119: 839-847.
78. Lima-Junior JC, Rodrigues-da-Silva RN, Pereira VA, Storer FL, Perce-da-Silva DS, et al. (2012) Cells and mediators of inflammation (C-reactive protein, nitric oxide, platelets and neutrophils) in the acute and convalescent phases of uncomplicated *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 1035-1041.
79. Kumaratilake LM, Ferrante A, Rzepczyk CM (1990) Tumor necrosis factor enhances neutrophil-mediated killing of *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity* 58: 788-793.
80. Huy NT, Trang DTX, Kariu T, Sasai M, Saida K, et al. (2006) Leukocyte activation by malarial pigment. *Parasitol Int* 55: 75-81.
81. Clark IA, Cowden WB (2003) The pathophysiology of *falciparum* malaria. *Pharmacology & therapeutics* 99: 221-260.
82. Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos JA, Intaglietta M, van der Heyde H (2005) *Plasmodium berghei* resists killing by reactive oxygen species. *Infection and immunity* 73: 6704-6710.
83. Kharazmi A, Jepsen S (1984) Enhanced inhibition of in vitro multiplication of *Plasmodium falciparum* by stimulated human polymorphonuclear leucocytes. *Clin Exp Immunol* 57: 287-292.
84. Vigarío AM, Belnoue E, Cumano A, Marussig M, Miltgen F, et al. (2001) Inhibition of *Plasmodium yoelii* blood-stage malaria by interferon alpha through the inhibition of the production of its target cell, the reticulocyte. *Blood* 97: 3966-3971.
85. Barnish G, Maude GH, Bockarie MJ, Erunkulu OA, Dumbuya MS, et al. (1993) Malaria in a rural area of Sierra Leone. II. Parasitological and related results from pre- and post-rains clinical surveys. *Ann Trop Med Parasitol* 87: 137-148.
86. Prommano O, Chaisri U, Turner GD, Wilairatana P, Ferguson DJ, et al. (2005) A quantitative ultrastructural study of the liver and the spleen in fatal *falciparum* malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 1359-1370.
87. Chen L, Zhang Z, Sendo F (2000) Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin Exp Immunol* 120: 125-133.
88. Fujioka H, Aikawa M (1996) The molecular basis of pathogenesis of cerebral malaria. *Microb Pathog* 20: 63-72.

89. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, et al. (2005) Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 431-436.
90. Ullen A, Singewald E, Konya V, Fauler G, Reicher H, et al. (2013) Myeloperoxidase-derived oxidants induce blood-brain barrier dysfunction in vitro and in vivo. *PLoS One* 8: e64034.
91. Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, Seguin MC, Klotz FW, et al. (1994) Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology letters* 43: 87-94.
92. Forstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* 33: 829-837, 837a-837d.
93. Wang JG, Mahmud SA, Nguyen J, Slungaard A (2006) Thiocyanate-dependent induction of endothelial cell adhesion molecule expression by phagocyte peroxidases: a novel HOSCN-specific oxidant mechanism to amplify inflammation. *J Immunol* 177: 8714-8722.
94. Isbister JP (1997) Physiology and pathophysiology of blood volume regulation. *Transfusion science* 18: 409-423.
95. Kaul DK, Nagel RL, Llena JF, Shear HL (1994) Cerebral malaria in mice: demonstration of cytoadherence of infected red blood cells and microrheologic correlates. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 50: 512-521.
96. Cabrales P, Zanini GM, Meays D, Frangos JA, Carvalho LJ (2010) Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *The American journal of pathology* 176: 1306-1315.
97. Ho M, Hickey MJ, Murray AG, Andonegui G, Kubes P (2000) Visualization of Plasmodium falciparum-endothelium interactions in human microvasculature: mimicry of leukocyte recruitment. *The Journal of experimental medicine* 192: 1205-1211.
98. Gelhaus C, Jacobs T, Andra J, Leippe M (2008) The antimicrobial peptide NK-2, the core region of mammalian NK-lysin, kills intraerythrocytic Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1713-1720.
99. Franke-Fayard B, Fonager J, Braks A, Khan SM, Janse CJ (2010) Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog* 6.
100. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE (2008) Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of leukocyte biology* 83: 64-70.
101. Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology* 23: 197-223.
102. Kumaratilake LM, Ferrante A (2000) Opsonization and phagocytosis of Plasmodium falciparum merozoites measured by flow cytometry. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 7: 9-13.
103. Baker VS, Imade GE, Molta NB, Tawde P, Pam SD, et al. (2008) Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age. *Malar J* 7: 41.
104. Chua CL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P (2013) Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends in parasitology* 29: 26-34.
105. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, et al. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656-661.

106. Hemmer CJ, Lehr HA, Westphal K, Unverricht M, Kratzius M, et al. (2005) Plasmodium falciparum Malaria: reduction of endothelial cell apoptosis in vitro. Infect Immun 73: 1764-1770.
107. Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB, Clark IA (1991) Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infection and immunity 59: 3280-3283.
108. Cramer JP, Nüssler AK, Ehrhardt S, Burkhardt J, Otchwemah RN, et al. (2005) Age-dependent effect of plasma nitric oxide on parasite density in Ghanaian children with severe malaria. Trop Med Int Health 10: 672-680.
109. Weiss G, Thuma PE, Biemba G, Mabeza G, Werner ER, et al. (1998) Cerebrospinal fluid levels of biopterin, nitric oxide metabolites, and immune activation markers and the clinical course of human cerebral malaria. The Journal of infectious diseases 177: 1064-1068.
110. Serghides L, Kim H, Lu Z, Kain DC, Miller C, et al. (2011) Inhaled nitric oxide reduces endothelial activation and parasite accumulation in the brain, and enhances survival in experimental cerebral malaria. PLoS One 6: e27714.
111. Galijasevic S, Saed GM, Diamond MP, Abu-Soud HM (2003) Myeloperoxidase up-regulates the catalytic activity of inducible nitric oxide synthase by preventing nitric oxide feedback inhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 14766-14771.
112. Gillman BM, Batchelder J, Flaherty P, Weidanz WP (2004) Suppression of Plasmodium chabaudi parasitemia is independent of the action of reactive oxygen intermediates and/or nitric oxide. Infect Immun 72: 6359-6366.
113. Ostanin DV, Barlow S, Shukla D, Grisham MB (2007) NADPH oxidase but not myeloperoxidase protects lymphopenic mice from spontaneous infections. Biochem Biophys Res Commun 355: 801-806.
114. Potter SM, Mitchell AJ, Cowden WB, Sanni LA, Dinauer M, et al. (2005) Phagocyte-derived reactive oxygen species do not influence the progression of murine blood-stage malaria infections. Infect Immun 73: 4941-4947.
115. Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weir JP, Goodbary M, et al. (1994) Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells. The Journal of experimental medicine 180: 353-358.
116. Butler NS, Schmidt NW, Harty JT (2010) Differential effector pathways regulate memory CD8 T cell immunity against Plasmodium berghei versus P. yoelii sporozoites. Journal of immunology 184: 2528-2538.
117. Depinay N, Franetich JF, Gruner AC, Mauduit M, Chavatte JM, et al. (2011) Inhibitory effect of TNF-alpha on malaria pre-erythrocytic stage development: influence of host hepatocyte/parasite combinations. PLoS One 6: e17464.
118. Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, van Rooijen N, et al. (2002) On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. Journal of immunology 169: 6369-6375.
119. Imai T, Shen J, Chou B, Duan X, Tu L, et al. (2010) Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with Plasmodium yoelii 17XL strain. European journal of immunology 40: 1053-1061.
120. Vinetz JM, Kumar S, Good MF, Fowlkes BJ, Berzofsky JA, et al. (1990) Adoptive transfer of CD8+ T cells from immune animals does not transfer immunity to blood stage Plasmodium yoelii malaria. Journal of immunology 144: 1069-1074.

121. Chandele A, Mukerjee P, Das G, Ahmed R, Chauhan VS (2011) Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with *Plasmodium yoelii*. *Immunology* 132: 273-286.
122. Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K (2011) Cell biology and immunology of malaria. *Immunological reviews* 240: 297-316.
123. Adler G, Steeg C, Pfeffer K, Murphy TL, Murphy KM, et al. (2011) B and T lymphocyte attenuator restricts the protective immune response against experimental malaria. *J Immunol* 187: 5310-5319.
124. Soulard V, Roland J, Gorgette O, Barbier E, Cazenave PA, et al. (2009) An early burst of IFN-gamma induced by the pre-erythrocytic stage favours *Plasmodium yoelii* parasitaemia in B6 mice. *Malaria journal* 8: 128.
125. Kronenberg M (2005) Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annual review of immunology* 23: 877-900.
126. Abbitt KB, Cotter MJ, Ridger VC, Crossman DC, Hellewell PG, et al. (2009) Antibody ligation of murine Ly-6G induces neutropenia, blood flow cessation, and death via complement-dependent and independent mechanisms. *Journal of leukocyte biology* 85: 55-63.
127. Resch U, Semlitsch M, Hammer A, Susani-Etzerodt H, Walczak H, et al. (2011) Hypochlorite-modified low-density lipoprotein induces the apoptotic machinery in Jurkat T-cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 410: 895-900.
128. Samstag Y, John I, Wabnitz GH (2013) Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunol Rev* 256: 30-47.
129. Reiter TA, Rusnak F (2002) Is calcineurin a peroxide-specific sensor in T-lymphocytes? *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 7: 823-834.
130. Day N, Dondorp AM (2007) The management of patients with severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 77: 29-35.
131. Arnold L, Tyagi RK, Meija P, Swetman C, Gleeson J, et al. (2011) Further improvements of the *P. falciparum* humanized mouse model. *PLoS One* 6: e18045.
132. Leitgeb AM, Blomqvist K, Cho-Ngwa F, Samje M, Nde P, et al. (2011) Low anticoagulant heparin disrupts *Plasmodium falciparum* rosettes in fresh clinical isolates. *Am J Trop Med Hyg* 84: 390-396.

## 9. Anhang

### Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	GHS-Hinweis	H-Sätze	P-Sätze
Acetylcholin	Achtung	H315, H319, H335	P261, P305+351+338
Chloroform	Achtung	H302, H332, H336, H373, H315, H319, H351, H361	P260, P281, P305+P351+P338, P308+P313
Ethanol	Gefahr	H225	P210, P233, P370+P378, P403+P235, P501
Gentamicin	Gefahr	H317, H334	P261, P280, P342+P311
Giemsa	Gefahr	H225 H301,H311,H331, H370	P210 P243 P280 P302+P352, P304+P340, P309+P310
Glycerol-trinitrat	Gefahr	H201, H330, H310, H300, H373, H411	
Indometacin	Gefahr	H300	P264, P270, P301+P310
Ionomycin	Achtung	H302	
Isofluran	Achtung	H315, H319, H335, H336	P261, P305+P351+P338, P302+P352, P321, P405, P501
Isopropanol	Gefahr	H225, H319, H336	P210, P303+P361+P353, P305+P351+P338
Kalziumchlorid	Achtung	H 319	P280, P305+351+338
Ketamin	Achtung	H302, H315, H319, H335	P261,P305+P351+P338
Kohlenstoff-dioxid	Achtung	H280	P410, P403
May-Grünwald	Gefahr	H225, H301, H311, H331 H370	P210 P243 P280 P302+P352 P304+P340, P309+P310
Methanol	Gefahr	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P233, P280, P302+P352, P307+P310
Natriumazid	Gefahr	H300, H410	P273, P270, P309+ P310, P405

<b>Substanz</b>	<b>GHS-Hinweis</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>
Oxalsäure	Gefahr	H302+H312, H318	P280, P264, P301+P312, P305+P351+P338
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Achtung	H315	
Probenecid	Achtung	H302	
Rompun (Xylazin)	Gefahr	H301	P301+P310
Tetramethylbenzidine	Achtung	H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
Trizol	Gefahr	H301, H311, H314, H330, H341, H373, H412	P260, P273, P280, P284, P301+P310, P305+P351+P338
Stickstoff	Achtung	H280	P403
Sauerstoff	Gefahr	H270, H280	P244, P220, P370+P376, P403
Wright's stain	Achtung	H302, H318	P280, P305 + P351 + P338

### **H200-Physikalische Gefahren:**

H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.

H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.

H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.

### **H300-Reihe: Gesundheitsgefahren:**

H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.

H301 Giftig bei Verschlucken.

H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.

H302+H312 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt.

H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.

H311 Giftig bei Hautkontakt.

H315 Verursacht Hautreizungen.

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

H318 Verursacht schwere Augenschäden.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H330 Lebensgefahr bei Einatmen.

H331 Giftig bei Einatmen.

H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.

H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

H335 Kann die Atemwege reizen.

H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.

H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen.

H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

H370 Schädigt die Organe.

H373 Kann die Organe schädigen.

#### **H400-Reihe: Umweltgefahren**

H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

#### **P200-Reihe: Prävention**

P210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.

P220 Von Kleidung /.../ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren

P233 Behälter dicht verschlossen halten.

P235 Kühl halten.

P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.

P244 Druckminderer frei von Fett und Öl halten.

P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.

P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.

P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.

P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P284 Atemschutz tragen.

### **P300-Reihe: Reaktion**

P301 + P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P302 + P352 Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P303 + P361 + P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.

P304 + P340 Bei Einatmen: Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P305 + P351 + P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P307 + P310 Bei Exposition: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P308 + P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P309 + P310 Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett)

P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.

P370 + P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.

### **P400-Reihe: Aufbewahrung**

P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren

P403+P235 Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P405 Unter Verschluss aufbewahren

P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.

### **P500-Reihe: Entsorgung**

P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.

## **Curriculum Vitae**

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen



## Publikationen

Diese Dissertation soll als Originalarbeit veröffentlicht werden.

### Akzeptierte *Abstracts*:

- Protective effect of Myeloperoxidase-deficiency in *Plasmodium yoelii* infection, Wiebke Theeß, Anna Klinke, Stefan Baldus, Thomas Jacobs & Jakob Cramer ; 8<sup>th</sup> European Congress on Tropical Medicine and International Health, Copenhagen, Denmark, September 2013
- Protective effect of Myeloperoxidase-deficiency in *Plasmodium yoelii* infection, Wiebke Theeß, Anna Klinke, Stefan Baldus, Thomas Jacobs & Jakob Cramer; 36<sup>th</sup> Symposium of the North German Immunologists, Borstel, November 2013

### Andere Publikationen:

- Vinnemeier CD, Fischer-Herr J, Meyer S, Liebig K, Theeß W, Burchard GD, Cramer JP. "Immunogenicity and safety of an inactivated 2012/2013 trivalent influenza vaccine produced in mammalian cell culture (Optaflu®): An open label, uncontrolled study" Hum Vaccin Immunother., 2013 Nov 15;10(2). [Epub ahead of print]

**Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den 14.02.2014

---

Wiebke Theeß

## **Danksagung**

Bei Herrn PD Dr. Jakob Cramer und Herrn PD Dr. Thomas Jacobs möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung, die unermüdliche Unterstützung sowie für das Vertrauen in meine Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Burchard danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin durchführen zu können.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Heisig für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Stephan Baldus und Dr. Anna Klinke für den wissenschaftlichen Austausch, das Einbringen vieler Ideen und die Bereitstellung der MPO-Ko-Maus.

Ein besonderer Dank geht an Christiane Steeg, Dr. Markus Heine, Dr. Denise Lau und Hartwig Wiebold für die freundliche technische Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe Jacobs für das wundervolle Arbeitsklima, viele Gespräche und die Hilfsbereitschaft. Insbesondere gilt mein Dank dabei Julie Sellau, Dr. Nina Lapke und Dr. Anja Heins ohne die ich nicht so viel Spaß bei der Arbeit gehabt hätte.

Für die seelische Unterstützung möchte ich mich von Herzen bei Christina König und Carlos Garzon Coral bedanken, die immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte für mich hatten.

Zuletzt gilt mein besonderer und herzlicher Dank meinen Eltern. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen. Danke, dass ihr immer für mich da seid!