

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Prof. Dr. med. Egbert Tannich

**Die zelltypspezifische Rolle von TNF-*Signalling* bei der
experimentellen zerebralen Malaria**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Moritz Berker
aus Gelnhausen

Hamburg 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.06.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Thomas Jacobs

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Friedrich Haag

Vorbemerkung

Die Bezeichnung „Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin“ ist nicht unproblematisch. Zum einen kann eingewandt werden, dass Bernhard Nocht (1857-1945) zu den Unterzeichnern des „Bekennnis[ses] der Professoren an den deutschen Universitäten und Hochschulen zu Adolf Hitler und dem nationalsozialistischen Staat“¹ von 1933 gehörte und somit zu dem Teil der deutschen Gesellschaft, der den Nationalsozialismus aktiv unterstützte, weshalb die mit der gegenwärtigen Institutsbenennung verbundene Ehrung seines Andenkens kritisch betrachtet werden muss. Zum anderen handelt es sich bei dem Wort „Tropen“ um einen problematischen Begriff, da er aufgrund seines Entstehungskontextes über eine geographisch-klimatische Beschreibung hinaus eng mit rassistischen und kolonialistischen Ideologiekonzepten verbunden ist.² Ferner implizieren Worte wie „Tropenmedizin“, entsprechende Erkrankungen beruhten in erster Linie auf einem „warmen Klima“, wobei eine wichtige Dimension ausgeblendet wird: Die Assoziation vieler „Tropenkrankheiten“ mit Armut bzw. sozioökonomischer Verteilungsungerechtigkeit.

In der vorliegenden Arbeit wird diese Bezeichnung im Bewusstsein der genannten Implikationen verwendet. Der Autor hat das Anliegen, über die Offenlegung problematischer Aspekte zu einer „Kultur des Hinschauens“ in der Wissenschaft beizutragen.

-
- 1 Vgl.: Bekenntnis der Professoren an den deutschen Universitäten und Hochschulen zu Adolf Hitler und dem nationalsozialistischen Staat. Überreicht vom Nationalsozialistischen Lehrerbund Deutschland / Sachsen, Dresden-A. 1, Zinzendorfstraße 2 [ohne Jahresangabe], Druckvermerk: Wilhelm Limpert, Dresden. Online-Scan abgerufen von <https://www.archive.org/stream/bekennnisderpro00natiuoft> am 05.04.15.
 - 2 Vgl.: Arndt S, Ofuately-Alazard N (2011). Wie Rassismus aus Wörtern spricht. (K)Erben des Kolonialismus im Wissensarchiv deutscher Sprache. Ein kritisches Nachschlagewerk. Unrast, Münster, 670-671.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einordnung.....	1
1.2	Lebenszyklus der Plasmodien.....	3
1.3	Krankheitsverlauf.....	8
1.4	Zerebrale Malaria.....	9
1.4.1	Pathogenese der zerebralen Malaria.....	10
1.5	Malaria und das Immunsystem.....	11
1.6	TNF-Signalling und Malaria.....	14
1.6.1	TNF.....	14
1.6.2	LT α	14
1.6.3	Rezeptoren.....	15
1.6.4	TNF-Signalling bei Malaria.....	17
1.6.5	TNF-Signalling bei zerebraler Malaria.....	17
1.7	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	Material.....	19
2.1	Laborgeräte.....	19
2.2	Glas- und Plastikwaren.....	20
2.3	Chemikalien.....	21
2.4	Puffer und Stammlösungen.....	21
2.5	Material für molekularbiologische Arbeiten.....	21
2.6	Material für tierversuchsbezogene Arbeiten.....	22
2.7	Mauslinien.....	22
2.8	Plasmodien.....	23
2.9	Software.....	23
3	Methoden.....	24
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	24
3.1.1	Probennahme und Aufreinigung der genomischen DNA.....	24
3.1.1.1	Methode 1 (Arbeitsgruppe Dr. Ehlken, UKE).....	24
3.1.1.2	Methode 2 (Arbeitsgruppe PD Dr. Jacobs, BNITM).....	24
3.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
3.1.2.1	Methode 1 (Arbeitsgruppe Dr. Ehlken, UKE).....	25
3.1.2.2	Methode 2 (Arbeitsgruppe PD Dr. Jacobs, BNITM).....	26
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
3.1.3.1	Methode 1 (Arbeitsgruppe Dr. Ehlken, UKE).....	28
3.1.3.2	Methode 2 (Arbeitsgruppe PD Dr. Jacobs, BNITM).....	28
3.1.4	Screening.....	28

3.2	Mikrobiologische Methoden.....	31
3.2.1	Gewinnung von Blutausstrichen.....	31
3.2.2	Färbung von Blutausstrichen.....	31
3.2.3	Manuelle Parasitämiebestimmung.....	31
3.2.4	Computergestützte Parasitämiebestimmung.....	32
3.3	Tierversuche.....	33
3.3.1	Mäuse.....	33
3.3.2	Gentechnisch veränderte Mäuse.....	34
3.3.3	Infektion mit <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	35
3.3.4	Beurteilung des Auftretens von experimenteller zerebraler Malaria.....	36
3.4	Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse.....	37
3.4.1	Erläuterungen zur Cox-Regression.....	37
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Neutralisierung von TNFR-Liganden.....	40
4.1.1	Applikation 1 Stunde vor der Infektion.....	40
4.1.2	Applikation 5 Tage nach Infektion.....	44
4.1.3	Applikation 1 Stunde vor und 5 Tage nach Infektion.....	45
4.1.4	Interventionsart versus Zeitpunkt der Intervention.....	46
4.2	Zelltypspezifischer Knockout von TNFR1.....	47
4.2.1	Konditionaler TNFR1-Knockout auf T-Zellen.....	47
4.2.2	Konditionaler TNFR1-Knockout auf Leberzellen.....	49
4.2.3	Konditionaler TNFR1-Knockout auf myeloiden Zellen.....	53
4.2.4	Konditionaler TNFR1-Knockout auf Endothelzellen.....	57
5	Diskussion.....	61
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	61
5.2	Verwendetes Mausmodell.....	61
5.3	Vergleichbarkeit der Pathogenese von HZM und EZM.....	62
5.4	TNF-Signalling und zerebrale Malaria.....	62
5.4.1	TNFR-Liganden bei zerebraler Malaria.....	63
5.4.1.1	Neutralisierung von TNF durch Infliximab <i>in vivo</i>	64
5.4.1.2	Neutralisierung von LT α und TNF durch Etanercept <i>in vivo</i>	65
5.4.2	TNFR bei zerebraler Malaria.....	66
5.4.2.1	Zelltypspezifische TNFR1-Knockouts.....	66
5.4.3	Limitationen.....	67
5.4.3.1	Statistik.....	67
5.4.3.2	Versuchsdesign.....	67
5.4.3.3	Nicht kontrollierte Variablen.....	68
5.5	Ausblick.....	68
6	Zusammenfassung.....	70
7	Abstract.....	71

8 摘要 (abstract in Chinese / traditional characters).....	72
9 摘要 (abstract in Chinese / simplified characters).....	73
10 Abkürzungsverzeichnis.....	74
11 Abbildungsverzeichnis.....	78
12 Tabellenverzeichnis.....	79
13 Literaturverzeichnis.....	80
14 Veröffentlichte eigene wissenschaftliche Arbeiten.....	91
15 Danksagung und Widmung.....	92
16 Lebenslauf.....	93
17 Eidesstattliche Erklärung.....	94

1 Einleitung

1.1 Einordnung

Malaria ist eine Infektionskrankheit, welche die Menschheit schon seit langem begleitet. Der Erreger *Plasmodium falciparum* konnte bereits in ägyptischen Mumien nachgewiesen werden, deren Alter auf 2500 bis 3500 Jahre datiert wurde (Nerlich *et al.*, 2008). Aus der griechischen und römischen Antike wurden zahlreiche Krankheitsfälle überliefert, die aus heutiger Sicht als Malariaerkrankungen identifiziert werden, ebenso waren schon Strategien zu Vermeidung der Infektion bekannt. Von einigen Autoren¹ wurde diskutiert, ob Malaria ein wesentlicher Faktor war, der zum Niedergang der antiken griechischen Hochkultur sowie zum Verfall des römischen Reiches führte (Retief & Cilliers, 2004).

Die Bezeichnung „Malaria“ (aus dem Italienischen von „mal' aria“: schlechte Luft) tauchte im 15. Jahrhundert in Italien auf und setzte sich in der Folgezeit als Krankheitsname durch (Hempelmann *et al.*, 2009).

Es dauerte jedoch bis zum Ende des 19. Jahrhunderts, bis Ursache und Übertragungsweg der Malaria aufgeklärt wurden. Im Jahre 1880 entdeckte Alphonse Laveran Malariaparasiten im Blut erkrankter Patienten. 1897 identifizierte Ronald Ross Mücken als Überträger von Malariaparasiten bei Vögeln. Schließlich gelang Bignami und Grassi 1898 der Nachweis, dass Malariainfektionen durch Stiche von Anophelesmücken zwischen Menschen übertragen werden können (Cox, 2010).

Auch die Geschichte der Malaria-Chemotherapie reicht weit zurück. Um 1630 entdeckten spanische Missionare in Südamerika, dass die Rinde des Cinchona-Baumes von peruanischen Heilkundigen mit Erfolg zur Behandlung von Malariainfektionen eingesetzt wurde. Sie begannen, die Rinde in gemahlener Form als „Jesuitenpulver“ nach Europa zu exportieren (Bruce-Chwatt, 1988; Hempelmann *et al.*, 2009). Ein gewaltiger Fortschritt erfolgte 1820, als es Pelletier und Caventou gelang, mit Chinin den wirksamen Bestandteil der Cinchonarinde zu extrahieren, sodass in der Folge eine höhere und genauere Dosierung des Arzneistoffes möglich wurde (Kaufman & Rúveda, 2005).

1 In dieser Arbeit wird stets die männliche Pluralform verwendet. Diese soll unabhängig von ihrem grammatikalischen Genus alle Kategorien von Geschlecht einschließen.

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden erstmals synthetische Malariamedikamente entwickelt. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang die von Chinin abgeleiteten Substanzen Atebrin, Resochin sowie Sontochin. Resochin wurde zunächst durch das vermeintlich wirksamere Sontochin verdrängt, später jedoch wiedereingeführt und ist bis heute unter dem Namen Chloroquin als Therapeutikum gebräuchlich (Hempelmann *et al.*, 2009).

Neben der Entwicklung weiterer Chininderivate in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts ist die jüngere Geschichte der Malaria-Chemotherapie geprägt von der Entdeckung des Artemisinin durch chinesische Forscher im Jahre 1971. Sie isolierten die Verbindung aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*), einer Pflanze, die in der Traditionellen Chinesischen Medizin seit etwa 2000 Jahren zur Behandlung fieberhafter Erkrankungen eingesetzt wird, und synthetisierten in den Folgejahren weitere Derivate. Im Jahr 2006 empfahl die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die sogenannte artemisininbasierte Kombinationstherapie (ACT) als First-Line-Therapie (Faurant, 2011). 2012 hatten 79 von 88 Ländern, in denen *Plasmodium falciparum* endemisch ist, diese Empfehlung in ihren nationalen Behandlungsrichtlinien implementiert (World Health Organization, 2013). Ein ernstzunehmendes Problem der letzten Jahre ist jedoch die Verbreitung von artemisininresistenten Plasmodien (World Health Organization, 2014).

Trotz der großen Fortschritte bei der Behandlung bleibt Malaria global eine bedrohliche Erkrankung, die viele Leben kostet. Die WHO schätzt, dass derzeit weltweit für 3,2 Milliarden Menschen ein Risiko besteht, sich zu infizieren. Die Zahl der aufgetretenen Infektionen wird für das Jahr 2013 auf 198 Millionen Fälle beziffert, von denen 584.000 zum Tode führten. 78% der Menschen, die der Krankheit erlagen, waren Kinder unter 5 Jahren (World Health Organization, 2014). Der bei weitem größte Teil der komplizierten und fatalen Verläufe geht dabei auf Infektionen mit dem Erreger *P. falciparum* zurück. Bei etwa 1% dieser Infektionen kommt es zur Entwicklung von zerebraler Malaria, einer schweren Verlaufsform (De Souza *et al.*, 2010). Es wird geschätzt, dass aus dieser bis zu 80% der Todesfälle resultieren (Lucas, Suter, *et al.*, 1997). Dabei handelt es sich um eine neurologische Komplikation, die unbehandelt in 100% der Fälle (Postels & Birbeck, 2013) und bei Behandlung noch immer in 20% der Fälle zum Tode bzw. trotz Genesung bei 10% der Patienten zu neurologischen Folgeschäden (Newton & Krishna, 1998; Idro *et al.*, 2010) führt.

Diese Eckdaten zeigen, dass die Erforschung neuer Strategien gegen die Erkrankung dringend erforderlich ist. Besondere Bedeutung wird dabei der Entwicklung von Impfstoffen beigemessen (Hafalla *et al.*, 2011). Des Weiteren ist ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen bei zerebraler Malaria essenziell, um eine wirksamere Therapie der Erkrankten zu ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit widmet sich einem Teilbereich in der Erforschung der Pathogenese von zerebraler Malaria. Sie untersucht in einem etablierten Mausmodell, inwiefern das Vorhandensein von Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) auf bestimmten Zelltypen kritisch für die Entwicklung der Komplikation ist und ob sich die pathologischen Prozesse durch bestimmte Medikamente beeinflussen lassen, welche Tumornekrosefaktor (TNF) neutralisieren.

1.2 Lebenszyklus der Plasmodien

Malaria wird verursacht durch einzellige Organismen der Gattung *Plasmodium*, die phylogenetisch wie folgt eingeordnet werden: Eukaryota > Sar > Alveolata > Apicomplexa > Aconoidasida > Haemospororida > *Plasmodium* (Adl *et al.*, 2012). Es gibt fünf Arten, die humanpathogen sind: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* und *P. knowlesi*. Malariaerreger durchlaufen bei der Infektion von Säugetieren und Menschen einen bemerkenswerten Lebenszyklus, der im Folgenden skizziert werden soll.

Sticht eine infizierte weibliche Anophelesmücke eine Maus, injiziert sie dabei mit ihrem Speichel etwa 10 bis 100 Sporozoiten in die Haut, welche sich aktiv auf scheinbar zufälligen Bahnen bewegen und zum Teil in Blut- (35%) oder Lymphgefäße (15%) eindringen, zum Teil in der Dermis (50%) verbleiben (Amino *et al.*, 2006; Hafalla *et al.*, 2011). Nach einer Zeitspanne von 5 Minuten bis zu wenigen Stunden haben einige Sporozoiten die Umgebung der Bissstelle verlassen und die Leber erreicht (Sidjanski & Vanderberg, 1997; Yamauchi *et al.*, 2007). Um den Weg von der Inokulationsstelle zur Leber zurückzulegen, benötigen die Sporozoiten die Fähigkeit zur transzellulären Migration, wobei diese eher für die Evasion phagozytierender Zellen in der Haut als für die Überwindung endothelialer Barrieren notwendig ist (Amino *et al.*, 2008).

Die gerichtete Wanderung der Sporozoiten in die Leber geschieht durch die Wechselwirkung der parasitären Proteine CSP („circumsporozoite protein“) und TRAP („thrombospondin-related anonymous protein“) mit HSPGs („highly sulfated heparan sulfate proteoglycans“). Diese leberspezifischen Proteoglykane werden vor allem von

Ito-Zellen („hepatic stellate cells“) produziert und sind Bestandteil der extrazellulären Matrix, die den Disse-Raum ausfüllt und durch Fenestrationsen im Endothel Kontakt zum Blutstrom hat. Es wird vermutet, dass die initiale Sequestration der Sporoziten vor allem auf der Bindung von CSP an HSPGs beruht und zur Oberflächenlokalisation von in Mikronemen, Speicherorganellen der Plasmodien, gespeicherten TRAP führt, die ebenfalls an HSPGs binden und für den weiteren Invasionvorgang mitverantwortlich sind, in dessen Rahmen die Plasmodien sich zum Teil gegen den Blutstrom bewegen, bevor sie die sinusoidale Barriere passieren und in den Disse-Raum gelangen (Pradel *et al.*, 2002; Frevert *et al.*, 2005; Prudencio *et al.*, 2006).

Zur Überwindung der sinusoidalen Barriere, bestehend aus einer einzelligen Schicht LSECs („liver sinusoidal endothelial cells“), die von einzelnen Kupffer-Zellen, leberspezifischen Makrophagen, durchsetzt ist, benötigen die Sporoziten abermals die Fähigkeit der transzellulären Migration (Ishino *et al.*, 2004). Vermutlich stellen dabei die Kupffer-Zellen die Eintrittspforte für die Sporoziten dar (Baer, Roosevelt, *et al.*, 2007).

Anschließend durchqueren sie den Disse-Raum und gelangen ins Parenchym. Sie transmigrieren durch einige Hepatozyten und hinterlassen dabei eine Spur nekrotischer Zellen (Frevert *et al.*, 2005). Schließlich infizieren sie eine Leberzelle, indem sie durch Einstülpung der Membran ins Zellinnere vordringen und in Kernnähe eine parasitophore Vakuole bilden, die dem endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle assoziiert und durch Poren für benötigte Nährstoffe durchlässig ist (Bano *et al.*, 2007).

Nun tritt der Sporozit in eine Phase der asexuellen Replikation ein. Zunächst finden vielfache Teilungen des Zellkerns statt, die die parasitophore Vakuole in eine Art Synzytium verwandeln. In einem nachgelagerten Schritt erfolgt die eigentliche Zellteilung, bei der das Zytoplasma durch Einschnürungen der Zellmembran auf die einzelnen Tochterzellen verteilt wird. Diese Art der Vermehrung wird als Schizogonie bezeichnet und resultiert nach 2 bis 7 Tagen in einem Leberschizonten, der tausende Merozoiten enthält (Mikolajczak & Kappe, 2006; Prudencio *et al.*, 2006; Bano *et al.*, 2007).

Ist der Schizont vollständig gereift, geht zuerst die Membran der parasitophoren Vakuole verloren, sodass die Merozoiten frei im Zytoplasma der Wirtszelle vorliegen (Meis *et al.*, 1985). Der Hepatozyt stirbt ab und löst sich vom umliegenden Gewebe. Aus der Zelle schnüren sich mit Merozoiten gefüllte Vesikel, sogenannte Merosomen,

ab, die auf ungeklärte Weise in das sinusoidale Lumen gelangen. Durch Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma der Wirtszelle verhindern die Merozoiten aktiv einen Apoptose-typischen Prozess, durch den Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran akkumuliert, was als Fresssignal für phagozytierende Kupffer-Zellen in der Umgebung wirken würde (Sturm *et al.*, 2006). Die auf diese Weise vor dem Immunsystem getarnten Merosomen verlassen die Leber und gelangen in die Lungenkapillaren, wo sie rupturieren und die Merozoiten freisetzen (Baer, Klotz, *et al.*, 2007; Frevert *et al.*, 2014).

Merozoiten sind im Gegensatz zu Sporozoiten unbeweglich und entwickeln keine aktiven Bewegungsvorgänge, während sie frei im Blutstrom schwimmen (Glushakova *et al.*, 2005). Wenn sie durch Zufall Kontakt zur Oberfläche eines Erythrozyten bekommen, findet eine niedrigaffine Wechselwirkung zwischen Abkömmlingen des parasitären Oberflächenmoleküls MSP-1 („merozoite surface protein 1“) und dem Bande-3-Protein, einem Anionen-Austauscher in der erythrozytären Membran, statt, wodurch es zur reversiblen Anhaftung des Merozoiten kommt (Bannister & Dluzewski, 1990; Goel *et al.*, 2003). Nun richtet sich der Merozoit so aus, dass sein Apikalkomplex Kontakt zur Oberfläche des Erythrozyten hat und eine *tight junction* ausgebildet werden kann. Eine wichtige Rolle spielt dabei vermutlich das parasitäre Transmembranprotein AMA-1 („apical membrane antigen 1“). Es kommt zur Freisetzung von zusätzlichen Proteinen, sogenannten Adhäsinen, aus Mikronemen und Rhoptrien, parasitären Organellen, die zu hochaffinen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen führen und den Vorgang irreversibel machen (Bannister & Dluzewski, 1990; Mitchell *et al.*, 2004; Cowman & Crabb, 2006; Tyler *et al.*, 2011).

Bemerkenswert ist hierbei die Anzahl verschiedener Kombinationen erythrozytärer Rezeptoren mit parasitären Liganden, die den Merozoiten unabhängig voneinander den Eintritt in die Zelle ermöglichen können. Bei *P. falciparum* lassen sich zwei Klassen dieser Liganden unterscheiden. Zum einen gibt es die Gruppe der EBA-Proteine („erythrocyte-binding antigens“), zum anderen die der PfRh-Proteine („*Plasmodium falciparum* reticulocyte-binding homolog“), beide mit jeweils etwa 5 Vertretern. Die Redundanz im Mechanismus der Erythrozyteninvasion stellt eine Strategie dar, mit der die Parasiten humorale Immunantworten in Form von Antikörpern gegen einzelne Liganden wirksam unterlaufen können (Baum *et al.*, 2005; Persson *et al.*, 2008).

Nun beginnt die Invasion des Merozoiten. Die *tight junction* wandert, angetrieben vom Aktin-Myosin-Motor des Parasiten, vom apikalen zum entgegengesetzten Pol und schiebt den Merozoiten dabei vollständig in eine erythrozytäre Membraninvagination, wodurch eine parasitophore Vakuole entsteht. Während dieses Vorgangs findet gleichzeitig ein durch Serin-Proteasen vermitteltes *shedding* (Abspaltung) der Oberflächenstrukturen des Merozoiten statt, am Ende wird die *tight junction* durch Proteolyse der Adhäsine aufgelöst, sodass es nach Eintritt des Merozoiten zur vollständigen Rekonstitution der Zellmembran des Erythrozyten kommt (Cowman & Crabb, 2006).

Innerhalb der parasitophoren Vakuole nimmt der Merozoit zunächst eine tassenartige Form an, die aufgrund des Aussehens ihrer zweidimensionalen Projektion im Lichtmikroskop als Ringstadium bezeichnet wird. Im Prinzip handelt es sich dabei bereits um einen frühen Trophozoiten. Dieser beginnt zu wachsen, wodurch die (lichtmikroskopisch sichtbare) Ringform verloren geht, sodass nun ein (später) Trophozoit vorliegt. Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt vor allem durch Glykolyse und den Abbau von Hämoglobin, wobei ein toxisches Hämderivat (Ferriprotoporphyrin IX) entsteht, welches als kristallines Hämozoïn (sogenanntes Malariapigment) entgiftet und in einer Vakuole gespeichert wird. Schließlich beginnt eine erneute asexuelle Replikation, abermals durch Schizogonie, bei der sich zuerst die Kerne teilen, bevor sich im nächsten Schritt die Tochterzellen mit eigenen Zellmembranen abschnüren. Während dieser dritten Phase wird der Parasit als Schizont bezeichnet. Aus einem infizierten Erythrozyten gehen dadurch etwa 20 neue Merozoiten hervor (Bannister *et al.*, 2000). Die gesamte erythrozytäre Phase dauert bei *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale* etwa 48 Stunden, bei *P. malariae* 72 Stunden und bei *P. knowlesi* 24 Stunden (Lang *et al.*, 2010).

Während der Entwicklung im Erythrozyten etabliert *P. falciparum* (wie alle Plasmodien) einen komplexen Apparat, mit dem zahlreiche Proteine über die parasitäre Membran sowie die Membran der parasitophoren Vakuole hinweg in das Zytoplasma des Erythrozyten und darüber hinaus auf dessen Oberfläche transportiert werden können. Ein wichtiges Beispiel dafür ist die Proteinfamilie PfEMP-1 („*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane proteins 1“). Ihre Vertreter werden auf der Außenseite der Erythrozyten auf sogenannten *knobs*, parasitär bedingten knopfartigen Ausstülpungen der Membran, präsentiert und stellen einen wesentlichen Grund für die Gefährlichkeit von *P. falciparum* dar. Indem einzelne PfEMP-1-Varianten an endothelial

exprimierte Proteine wie CD-36, ICAM-1 und EPCR („endothelial protein C receptor“) oder das im intervillösen Raum vorhandene Glykosaminoglykan Chondroitinsulfat A binden, führen sie zur Sequestration infizierter Erythrozyten und damit zu schweren Komplikationen wie zerebraler und plazentarer Malaria. Über diese Mechanismen vermeidet *P. falciparum* die Erkennung und den Abbau befallener Zellen in der Milz. Durch Bindung an CR-1 („complement receptor 1“) und die AB-Blutgruppenantigene ermöglichen *PfEMP-1* außerdem die Adhäsion an nicht infizierte Erythrozyten, auch als Rosettenbildung bezeichnet, was die Pathologie weiter verstärken kann (Smith *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014; Spillman *et al.*, 2015).

Es gibt im Genom des Parasiten ca. 60 Varianten der *PfEMP-1*, die von der *var*-Genfamilie kodiert werden. Interessanterweise exprimiert ein infizierter Erythrozyt zu einem gegebenen Zeitpunkt jeweils nur eine einzige *PfEMP-1*-Variante auf seiner Oberfläche, sodass vorhandene Wirtsantikörper gegen andere *PfEMP-1*-Varianten wirkungslos sind. Das Umschalten zwischen den Varianten erfolgt auf epigenetischer Ebene. Des Weiteren finden in den *var*-Genloci Rekombinationen auf DNA-Ebene statt, die das Repertoire an *PfEMP-1* ständig verändern. Damit besitzt der Parasit eine effektive Strategie zur Evasion des Immunsystems (Scherf *et al.*, 1998, 2008; Freitas-Junior *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2000). Neben *PfEMP-1* wurden noch weitere polymorphe Oberflächenproteine identifiziert, darunter STEVOR („subtelomeric variable open reading frame proteins“), RIFIN („repetitive interspersed family proteins“), SURFIN („surface-associated interspersed gene family proteins“) und *PfMC-2TM* („*Plasmodium falciparum* Maurer's clefts two transmembrane protein“) (Chan *et al.*, 2014; Spillman *et al.*, 2015).

Nach vollständiger Reifung des Schizonten schwillt in einem ersten Schritt die parasitophore Vakuole durch Aufnahme von Wasser aus dem Zytoplasma des Erythrozyten an und platzt schließlich, wobei sie die neu gebildeten Merozoiten im Zytoplasma des Erythrozyten freisetzt. Das erythrozytäre Zytoskelett wird ab- und Poren werden in die Membran eingebaut, kurze Zeit später rupturiert der Erythrozyt und entlässt die Merozoiten in den Blutstrom, der Zyklus beginnt von vorn (Glushakova *et al.*, 2010; Wirth & Pradel, 2012).

Ein kleiner Teil der Merozoiten entwickelt sich nach Eindringen in die Erythrozyten zu weiblichen und männlichen Geschlechtszellen, den Gametozyten. Während einer Blutmahlzeit können diese Zellen von einer weiteren weiblichen Anophelesmücke aufgenommen werden. Durch den Abfall der Temperatur und die Anwesenheit von

Xanthurensäure im Darm der Mücke verlassen die Gametozyten die Erythrozyten und werden zu Gameten. Aus einem männlichen Mikrogametozyten entstehen acht sich schnell bewegende, begeißelte Mikrogameten. Dieser Prozess wird Exflagellation genannt. Durch Befruchtung einer weiblichen Makrogamete entsteht eine Zygote, die sich zu einer Ookinete weiterentwickelt, welche in der Lage ist, die Darmwand zu durchdringen und sich unter der Basallamina als Oozyste einnistet. Dort beginnt sie mit der Replikation und setzt Sporozoiten frei, die über das Hämolympsystem der Mücke in die Speicheldrüsen gelangen und bei einer erneuten Blutmahlzeit wieder einen Menschen infizieren können (Kuehn & Pradel, 2010).

1.3 Krankheitsverlauf

Die Leberphase verläuft für die Erkrankten vollkommen asymptomatisch. Erst nach der Freisetzung von Merozoiten und einer ersten Replikationsphase kommt es zu den pathognomonischen Fieberschüben, wenn die Erythrozyten rupturieren und Entzündungsmediatoren freigesetzt werden. Die genauen Mechanismen sind ungeklärt, wichtige Rollen werden Glykosyl-Phosphatidyl-Inositolphosphat (GPI) und Hämozoin, einem Abfallprodukt des parasitären Hämoglobinabbaus, zugeschrieben. *Downstream* im Entzündungsgeschehen scheint TNF eine wichtige Funktion zu haben, da seine Serumkonzentration eng mit der Körpertemperatur korreliert (Lang *et al.*, 2010).

Charakteristisch für eine Malariainfektion ist rekurrendes Fieber, das in regelmäßigen Abständen auftreten kann, die durch die Dauer der intraerythrozytären Vermehrungsphase bestimmt werden. Bei Infektionen mit *P. vivax* oder *P. ovale* ist ein 48-stündiger Rhythmus der Fieberschübe typisch („Malaria tertiana“), bei *P. malariae* beträgt die fieberfreie Zeit eher 72 Stunden („Malaria quartana“). Im Falle von *P. falciparum* vermehren sich die Merozoiten weniger synchron, sodass sich meist kein typischer Fieberrhythmus erkennen lässt („Malaria tropica“). Dies trifft auch auf Infektionen mit *P. knowlesi* zu, die eher im Abstand von 24 Stunden oder ebenfalls asynchron zu Fieber führen (Lang *et al.*, 2010).

Daneben kommt es im Zuge einer Malariainfektion zu einer Milzvergrößerung. Grund hierfür ist der Abbau (sogenannte Maserung) von infizierten Erythrozyten, die aufgrund der parasitär bedingten Veränderungen in ihrer Morphologie und der Zusammensetzung ihrer Oberflächenmoleküle verstärkt durch die Milz aus dem Blutstrom herausgefiltert werden (Lang *et al.*, 2010).

Ein weiterer charakteristischer Befund ist die Entstehung einer Anämie, deren Ausmaß über den bloßen Verlust durch parasitären Befall rupturierter Erythrozyten hinausgeht. Ein Grund scheint eine zugunsten der Leukopoese heruntergefahrte Erythropoese im Knochenmark zu sein. Daneben werden Kreuzreaktionen des humoralen Immunsystems vermutet, die zur Zerstörung nicht infizierter Erythrozyten führen. Hier beginnt der Übergang zu komplizierten Krankheitsverläufen, die neben der zerebralen Malaria (siehe Kap. 1.4) auch Nierenversagen und die Ausbildung eines Lungenödems mit respiratorischer Insuffizienz umfassen und akut lebensbedrohlich sein können. Die Mechanismen der Beteiligung von Nieren und Lungen sind noch weitgehend ungeklärt (Lang *et al.*, 2010).

1.4 Zerebrale Malaria

Die zerebrale Malaria ist eine schwere Komplikation, die im Verlauf einer Infektion mit *P. falciparum* auftreten kann. Sie äußert sich als unerweckbares Koma und geht oft mit Krampfanfällen einher (Lang *et al.*, 2010). Die ursächlichen pathologischen Mechanismen sind nicht vollständig geklärt (Frevort & Nacer, 2014). Bislang ist keine gezielte Therapie verfügbar. Möglich sind derzeit nur die Behandlung der zugrunde liegenden Malariainfektion sowie die Linderung auftretender Symptome, ohne zufriedenstellende Erfolgsquote (trotz Therapie 20% Mortalität und in 10% Folgeschäden (Newton & Krishna, 1998; Idro *et al.*, 2010)).

Bei der experimentellen Erforschung der Pathogenese dieser Komplikation kommen in erster Linie Mausmodelle zum Einsatz, meist unter Verwendung von *P. berghei* ANKA (*PbA*). Im *PbA*-C57BL/6-Modell treten bei den Tieren ca. eine Woche nach der Infektion mit parasitierten Erythrozyten neurologische Symptome auf, die innerhalb weniger Stunden bis Tage zum Tode führen. Untersuchungen haben ergeben, dass die pathologischen Vorgänge in diesem Modell in einigen Charakteristika von denen im Menschen abweichen (De Souza *et al.*, 2010; White *et al.*, 2010). Daher ist es sinnvoll, zwischen der humanen zerebralen Malaria (HZM) und der experimentellen (murinen) zerebralen Malaria (EZM) zu unterscheiden. Zusätzlich wird innerhalb der humanen zerebralen Malaria von einigen Autoren die pädiatrische HZM von der adulten HZM abgegrenzt, wobei die erstere den Vorgängen bei EZM näher kommt (Frevort & Nacer, 2014).

1.4.1 Pathogenese der zerebralen Malaria

Die Suche nach einer Erklärung für das Phänomen der zerebralen Malaria reicht zurück ins 19. Jahrhundert. Nach seiner Entdeckung der Plasmodien postulierte Alphonse Laveran 1884, dass neurologische Symptome im Rahmen einer Malariainfektion durch die Verstopfung zerebraler Gefäße hervorgerufen werden (Obstruktionshypothese) (Frevert & Nacer, 2014). Diese Theorie wurde 1894 durch Marchiafava und Bignami aufgrund der Beobachtung, dass sich parasitierte Erythrozyten am Gefäßrand ablagern und so den Blutfluss vermindern, zur Sequestrationshypothese verfeinert (Frevert & Nacer, 2014). 1985 wurde dieser Erklärungsansatz durch Befunde von MacPherson *et al.* bekräftigt, die die Gehirne von an HZM Verstorbenen elektronenmikroskopisch untersucht hatten (MacPherson *et al.*, 1985). Die Sequestrationshypothese war bereits 1974 durch Maegraith zur Inflammationshypothese weiterentwickelt worden, nach der die Anwesenheit infizierter Erythrozyten lokal zur Entzündung des Endothels führt, welche mit einer Erhöhung der Permeabilität für Wasser und Proteine einhergeht, die in der Folge zur Einengung des Gefäßes führt (Maegraith, 1974; Frevert & Nacer, 2014).

Sowohl die ursprüngliche Obstruktionshypothese wie auch die Sequestrations- und die Inflammationshypothese beruhen auf der Annahme, dass die neurologischen Symptome durch eine lokale Minderperfusion zerebraler Gefäße und dadurch bedingter Unterversorgung umliegender Gewebes verursacht werden. Dieses Dogma zweifelten Clark und Rockett 1994 mit ihrer Zytokintheorie der HZM an. Darin machen sie die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF und Interleukin-1 (IL-1) unabhängig von mechanischer Obstruktion für die Symptome verantwortlich und postulieren, dass ihre Wirkung *downstream* über Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt wird (Clark & Rockett, 1994). Dieser Theorie widersprachen im selben Jahr Grau und de Kossodo, indem sie NO in Bezug auf zerebrale Malaria eine eher protektive Wirkung zuweisen und die unterschiedlichen Hypothesen (Obstruktion/Sequestration und Inflammation/Zytokine) in einem integrierten Ansatz nebeneinanderstellen (Grau & de Kossodo, 1994).

Ein neues Fragment in dem Mosaik der pathologischen Prozesse bei zerebraler Malaria stellte 1999 die Erkenntnis dar, dass bei HZM eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS) vorliegt (Brown *et al.*, 1999). Die BHS ist die regulierte Schnittstelle zwischen dem peripheren Blutkreislauf und dem zentralen Nervensystem (ZNS). Sie ist in erster Linie eine durch fenestrationslose zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen (*microvascular endothelial cells*, MVEC) und *tight junctions*, den Verbindungen

zwischen diesen Zellen, gebildete selektive Diffusionsbarriere (Hawkins & Davis, 2005). Im Mausmodell wird die Schädigung der BHS zum Teil auf CD8⁺ T-Zellen zurückgeführt, die in Endothelzellen Perforin-vermittelt Apoptose induzieren (Yañez *et al.*, 1996; Potter *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus im Menschen keine Rolle spielt (Frevert & Nacer, 2014). Der Zusammenbruch der BHS erlaubt in pathologischer Weise die Diffusion von Wasser, Zytokinen, Malariaantigenen und weiteren Stoffen ins Hirnparenchym (wobei die Plasmodien selbst das Lumen der Blutgefäße nicht verlassen) (Hunt *et al.*, 2006; Medana & Turner, 2007). Über diesen Mechanismus lassen sich die Entwicklung einer Hirnschwellung und eines dadurch erhöhten intrakraniellen Drucks (IKD) erklären, zwei Befunde, die bereits zu Beginn der 1990er Jahre mit HZM assoziiert wurden (Newton *et al.*, 1991, 1994). Hirnödeme und erhöhter IKD haben mehrere Folgen. Zum einen führen sie zur Kompression zerebraler Gefäße und damit sekundär zu Gefäßverschlüssen und dadurch bedingten ischämischen Läsionen, die (zumindest im Falle der EZM) mit den primären nicht-obstruktiven inflammatorischen Läsionen koexistieren können (Penet *et al.*, 2005). Zum anderen führen sie zu einer Verschiebung von Hirnmasse in das *foramen magnum* und einer dadurch bedingten *unteren Einklemmung*, im Rahmen derer das im Hirnstamm befindliche Atemzentrum komprimiert wird und daher seine Funktion nicht mehr erfüllen kann. Es resultiert der Tod durch Atemstillstand (Frevert & Nacer, 2014).

Aktuelle Ansätze zur Erklärung der Pathogenese von HZM und EZM kombinieren die Konzepte von Sequestration und lokaler Minderperfusion, Inflammation, Zytokinsekretion und Permeabilitätssteigerung der BHS sowie intrakranieller Hypertension, Hirnstammkompression und Atemstillstand als gemeinsamer Endstrecke, wobei sie noch immer kein komplettes Verständnis des Phänomens ermöglichen (Dorovini-Zis *et al.*, 2011; Postels *et al.*, 2013; Frevert & Nacer, 2014).

1.5 Malaria und das Immunsystem

Die Interaktion zwischen Plasmodien und den Abwehrmechanismen des Körpers ist Gegenstand intensiver Forschung. Tatsächlich wird der Krankheitszustand „Malaria“ auch als Immunpathologie im Sinne überschießender Immunantworten beschrieben, gleichzeitig werden Zustände von Immunität gegen die Krankheit beobachtet (Ademolue & Awandare, 2017). Dabei spielen T-Zellen und deren Regulation eine wichtige Rolle.

Nach der Infektion mit Sporozoiten kommt es zur Produktion von B-Gedächtniszellen („memory B cells“ / MBCs) und Antikörpern gegen Oberflächenproteine wie CSP und *liver-stage antigen 1* (LSA-1), die nur auf Sporozoiten und nicht in der erythrozytären Phase der Infektion vorkommen (Nahrendorf *et al.*, 2014). Ebenso wurden CSP-spezifische CD4⁺ T-Zellen (Reece *et al.*, 2004) und CD8⁺ T-Zellen (Chakravarty *et al.*, 2007) nachgewiesen und im Mausmodell konnte durch Transfer epitopspezifischer CD8⁺ T-Zell-Klone der Progress zur Blutphase verhindert werden (Tsuji & Zavala, 2003). Eine sterile Immunität gegen die Plasmodien wird jedoch nur unter bestimmten Voraussetzungen erreicht. So sorgte die sogenannte RTS/S-Vakzine, ein Totimpfstoff basierend auf CSP und Adjuvanzien, nur bei ca. 50% der Geimpften für einen sterilen Impfschutz (Kester *et al.*, 2009; Malaria Vaccine Initiative, 2011). Eine größer angelegte Studie, welche den Schutz vor klinischen Episoden einer Malariaerkrankung untersuchte, zeigte in der Gruppe der 6 bis 12 Wochen alten Kinder allerdings lediglich bei 17,3% eine Schutzwirkung der Impfung, in der Gruppe der 5 bis 17 Monate alten Kinder waren es 36,3% (RTS/S Clinical Trials Partnership, 2015), wobei die Impfung bei Mädchen im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu einer höheren Mortalität führte (Klein *et al.*, 2016). Daher liegt mit der RTS/S-Vakzine kein zufriedenstellender Impfstoff gegen Malaria vor.

Werden lebende Sporozoiten injiziert, lassen sich höhere Schutzraten erzielen, auch dauert der Schutz möglicherweise länger an (Roestenberg *et al.*, 2011; Bijker *et al.*, 2013). Eine Methode ist die Verwendung von *irradiation-attenuated sporozoites* (RAS), welche die Entwicklung in der Leber nicht abschließen können. Ein anderer Ansatz ist die sogenannte CPS-Immunsierung (Gabe einer Chloroquin-Chemoprophylaxe und Infektion mit Wildtyp-Sporozoiten), die aufgrund der ausschließlichen Wirkung Chloroquins auf Plasmodien in der Blutphase die Induktion einer Immunantwort gegen Sporozoiten erlaubt. Diesen Ansätzen ist gemein, dass sie sich trotz guter Ergebnisse aufgrund technischer (Produktion und Lagerung lebender Sporozoiten) und ethischer (willentliche Infektion mit einem gefährlichen Erreger) Hürden bislang schwerlich im großen Maßstab realisieren lassen (Nahrendorf *et al.*, 2014).

In der Blutphase der Malaria kann, anders als in der präerythrozytären Phase (siehe oben), keine über CD8⁺ T-Zellen vermittelte zytotoxische Immunantwort erfolgen, da die kernlosen Erythrozyten keine MHC-I- (und auch keine MHC-II-) Moleküle („major histocompatibility complex“) exprimieren und somit keine juxtakrine Interaktion möglich ist. Dementsprechend spielen CD8⁺ T-Zellen hier eine untergeordnete Rolle

(Troye-Blomberg *et al.*, 1994). Große Bedeutung hat in dieser Krankheitsphase die Phagozytose der großen Zahl infizierter Erythrozyten durch Makrophagen, welche vorwiegend in Milz und Leber stattfindet (eine Splenomegalie zählt zu den klinischen Symptomen der Malaria), sowie die humorale Immunantwort. Dabei spielen $CD4^+$ T-Zellen eine wichtige Rolle: Im Sinne einer T_H1 -Immunantwort fördern Sie durch Sekretion von $IFN\gamma$, IL-2 und TNF die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen. Außerdem vermitteln sie als T_H2 -Immunantwort u.a. über IL-4 und IL-10 die Antikörperproduktion der B-Zellen. Obgleich die genannten Mechanismen protektive Wirkung entfalten können, sind schwere Verlaufsformen der Malaria mit T_H1 -Reaktionen wie der übermäßigen Sekretion von TNF, IL- 1β und IL-6 vergesellschaftet, die als sogenannter Zytokinsturm für die Krankheitspathologie verantwortlich sind (Ademolue & Awandare, 2017). Folge sind eine unzureichende Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) in den Mitochondrien, die durch gesteigerte (anaerobe) Glykolyse kompensiert wird, wodurch eine Hyperlaktatämie und eine metabolische Azidose entstehen. Außerdem resultiert eine gesteigerte Zytoadhärenz der Blutbestandteile (Thrombozyten, Leukozyten, parasitierte Erythrozyten). Der Tod tritt ein durch eine „funktionelle Gewebshypoxie, welche eine nicht tragfähige Abhängigkeit von anaerobem Metabolismus erzwingt“ (Clark *et al.*, 2006).

Vor diesem Hintergrund wird zur Bekämpfung der Malaria als globales Gesundheitsproblem über zwei Formen von Immunität diskutiert: Zum einen die Immunität gegen die Parasiten (antiparasitäre Immunität), zum anderen die Immunität gegen die resultierende Erkrankung (Erkrankungsimmunität). Aufgrund der Probleme bei der Erzeugung einer antiparasitären Immunität (siehe oben) stellt sich die Frage, welches Potenzial die Erkrankungsimmunität birgt (Ademolue & Awandare, 2017). Nach wiederholter, langjähriger Exposition entwickeln Individuen eine Erkrankungsimmunität (Schofield & Mueller, 2006), welche jedoch bei fehlender Exposition wieder nachlässt. Dabei entwickelt sich in Gebieten mit hoher Endemie charakteristischerweise zunächst eine Immunität gegen schwere Verlaufsformen, typischerweise im Kindesalter. Deutlich langsamer entwickelt sich ein Schutz gegen hohe Parasitämien und schließlich gegen jegliche klinische Symptomatik. Dabei wird jedoch nie eine sterile Immunität erreicht, die sämtliche Plasmodien eliminieren würde (Doolan *et al.*, 2009). Die Erkrankungsimmunität geht mit einem *shift* zu T_H2 -Immunantworten einher (Moncunill *et al.*, 2013; Ademolue & Awandare, 2017). Damit

bewegt sich die Abwehr gegen Malaria wie bei anderen Infektionserkrankungen im Spannungsfeld zwischen Toleranz und Immunität (Soares *et al.*, 2017).

1.6 TNF-*Signalling*² und Malaria

1.6.1 TNF

Tumornekrosefaktor (TNF)³ ist ein Zytokin mit pleiotroper Wirkung, das akute Entzündungsreaktionen als Antwort des Immunsystems auf Bestandteile von Pathogenen, z.B. von Bakterien oder Plasmodien, vermittelt. Es wird vor allem von Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) produziert und kann löslich (*soluble TNF*, sTNF) oder membrangebunden (*membrane-bound TNF*, mTNF) vorliegen, wobei es jeweils TNF-Homotrimere (im weiteren auch als „TNF₃“ bezeichnet) bildet. Dabei wird es zunächst als Typ-2-Transmembranprotein synthetisiert und auf der Zellaußenseite präsentiert (Abbas *et al.*, 2012; Al-Lamki & Mayadas, 2015). Die Metalloproteinase TACE (TNF- α -converting enzyme), auch ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase 17) genannt, bewirkt ein *shedding* der TNF-Moleküle und überführt sie so in ihre lösliche Form (Black *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2008). TNF hat eine Molekülmasse von 17kDa (Nedwin *et al.*, 1985). Das Postulat eines „Tumornekrosefaktors“, der im Serum mit bakteriellen Polysacchariden behandelte Mäuse vorliegt und Sarkomzellen nekrotisch werden lässt, geht zurück ins Jahr 1962 (O'Malley *et al.*, 1962). 1975 wurde TNF aufgrund seiner Eigenschaft, bei in Mäuse transplantierten Sarkomen hämorrhagische Nekrosen auch ohne Einwirkung von Lipopolysacchariden entstehen zu lassen, identifiziert und 1984 zum ersten Mal rekombinant hergestellt (Carswell *et al.*, 1975; Wajant *et al.*, 2003).

1.6.2 LT α

Lymphotoxin- α (LT α)³ wurde 1968 als Mediator zytotoxischer Effekte von stimulierten Lymphozyten auf Fibroblasten entdeckt, seine rekombinante Herstellung gelang ebenfalls 1984 (Ruddle & Waksman, 1967; Gray *et al.*, 1984). Es hat ein Molekulargewicht von 25kDa, etwa 30% der Aminosäuresequenz sind mit der von TNF

2 Neben TNF als prominentestem Vertreter einer Gruppe von Signalmolekülen und deren Rezeptoren gibt es weitere Proteine, die in diesem System von Bedeutung sind. Der Begriff „TNF-*Signalling*“ bezeichnet in dieser Arbeit die Gesamtheit der Liganden und Rezeptoren dieses Systems und bezieht sich daher nicht nur auf das Zytokin TNF.

3 In der Fachliteratur wird keine einheitliche Nomenklatur für TNF und LT α eingehalten. TNF firmiert mitunter als TNF α oder Kachektin, LT α wird z.T. als Lymphotoxin oder TNF β bezeichnet. Diese Arbeit verwendet, orientiert an den Vorschlägen von Clark (Clark, 2007), durchgehend die Begriffe TNF und LT α .

homolog (Aggarwal *et al.*, 1985; Nedwin *et al.*, 1985). Die Gene der beiden Zytokine liegen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus in unmittelbarer Nachbarschaft auf dem gleichen Chromosom (Remouchamps *et al.*, 2011), im Gegensatz zu TNF wird LT α jedoch von Lymphozyten produziert (Aggarwal *et al.*, 2011). LT α spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion lymphatischer Organe (z.B. Lymphknoten, Peyer'sche Plaques, Thymus, Milz), aber auch bei der adaptiven Immunantwort, indem es auf die „Programmierung“ von DCs und CD4⁺ T-Zellen Einfluss nimmt. Außerdem reguliert es Abwehrmechanismen auf mukosalen Epithelien und ist damit an der Kontrolle der Darmflora beteiligt (Upadhyay & Fu, 2013).

LT α besitzt keine Transmembrandomäne und wird als lösliches Protein synthetisiert. Es lagert sich wie TNF zu Trimeren zusammen. Neben LT α_3 -Homotrimeren bildet es mit Lymphotoxin- β (LT β) die Heterotrimere LT $\alpha_1\beta_2$ und, in geringerem Umfang, LT $\alpha_2\beta_1$. LT β ist ein Transmembranprotein, sodass die gebildeten Heterotrimere membranständig sind (Remouchamps *et al.*, 2011).

1.6.3 Rezeptoren

TNF und LT α wirken auf mehrere Rezeptoren. Beide Zytokine interagieren sowohl mit TNF-Rezeptor Typ 1 (TNFR1, auch als p55-TNFR oder CD120a bezeichnet) als auch mit TNF-Rezeptor Typ 2 (TNFR2, auch p75-TNFR oder CD120b genannt). TNFR1 wird ubiquitär konstitutiv exprimiert. Dagegen befindet sich TNFR2 vor allem auf Zellen des Immunsystems, z.B. T- und B-Lymphozyten und Makrophagen, aber auch auf der Darmmukosa und auf Neuronen, und seine Expression wird stärker reguliert. mTNF bindet an TNFR2 mit höherer Affinität als an TNFR1, dagegen ist die Affinität von sTNF für TNFR1 höher als für TNFR2 (Wajant *et al.*, 2003; Remouchamps *et al.*, 2011). Zusätzlich gibt es den Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT β R), der in Wechselwirkung mit dem membranständigen Heterotrimer LT $\alpha_1\beta_2$ tritt. Daneben spielen die Rezeptoren *TNFR superfamily member 19* (Troy) und *herpes virus entry mediator* (HVEM) eine Rolle, indem sie LT α_3 binden (Hashimoto *et al.*, 2008; Remouchamps *et al.*, 2011; Upadhyay & Fu, 2013). Ein weiterer Ligand des Systems ist *homologous to LT, inducible expression, competes with herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D for HSV entry mediator (HVEM), a receptor expressed on T lymphocytes* (LIGHT) (Schneider *et al.*, 2004). Die bekannten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen sind in Tab. 1.1 zusammengefasst.

Tab. 1.1: Liganden und Rezeptoren des TNF-Signalling-Systems

+, Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung vorhanden; -, Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung nicht vorhanden; a, (Remouchamps *et al.*, 2011); b, (Bossen *et al.*, 2006); c, (Schneider *et al.*, 2004); d, (Hashimoto *et al.*, 2008); es ist jeweils der Buchstabe für die neueste Publikation angegeben; I, keine Angabe ob membrangebundenes oder lösliches TNF₃ getestet wurde; II, unklar ob von biologischer Bedeutung; III, keine Angabe welches Heterotrimer getestet wurde; human, wurde für humane Proteine getestet; murin, wurde für murine Proteine getestet; keine Angabe für human/murin, es wurde nicht angegeben für welche Proteine getestet wurde; leeres Feld, keine Informationen.

	mTNF ₃	sTNF ₃	LTα ₃	LTα ₁ β ₂	LTα ₂ β ₁	LIGHT
TNFR1	+ ^a	+ ^a	+ ^a		+ ^c , II	human ^{-b}
TNFR2	+ ^a	+ ^a	+ ^a		+ ^c , II	human ^{-b}
LTβR	human, murin ^{-b} , I		human, murin ^{-b}	+ ^a		+ ^a
Troy			+ ^a	_ ^d , III		
HVEM	human, murin ^{-b} , I		human ^{+b} /murin ^{-b}	human, murin ^{-b} , III		+ ^a

Sowohl TNFR1 als auch TNFR2 liegen in der Zellmembran bereits vor Interaktion mit einem Liganden als trimere Komplexe vor. Diese werden durch bestimmte Domänen der Rezeptoren, die sogenannten *pre-ligand-binding assembly domains* (PLAD), gebildet (Chan *et al.*, 2000). Auch die Rezeptoren können durch TACE-vermitteltes *shedding* von der Zelloberfläche entfernt werden. In löslicher Form haben sie potentiell eine neutralisierende Wirkung auf ihre Liganden. Da die Rezeptoren löslich jedoch als Monomere vorliegen, ist die Affinität dieser Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung geringer. Künstliche TNF-neutralisierende Agenzien auf Rezeptorbasis (z.B. Etanercept, ein TNFR2-IgG₁-Fusionsprotein) werden daher bevorzugt als Multimere entwickelt (Wajant *et al.*, 2003).

Die Signaltransduktion nach Bindung eines Liganden an TNFR1 oder TNFR2 ist äußerst komplex und involviert verschiedene Signalkaskaden mit unterschiedlichen, teils gegensätzlichen, Effektormechanismen, die jedoch auch miteinander interagieren können. Hinzu kommt, dass TNF-Signalling über in der Zielzelle induzierte Prozesse, z.B. autokrine Schleifen proinflammatorischer Zytokine, die Wirkung der TNFR-Liganden auf dieselbe Zelle modifiziert, sodass eine „biphasische“ Wirkungsart resultiert. Das bedeutet, die durch Ligandenbindung ausgelösten Prozesse verändern sich über die Zeit und sind daher ohne Einbeziehung der zeitlichen Dimension nicht direkt miteinander vergleichbar. Daher ist zum Verständnis ein systembiologischer Ansatz erforderlich (Janes *et al.*, 2006; Sabio & Davis, 2014), der jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit ist.

Zusammengefasst kann die Aktivierung von TNFR1/2 zu Apoptose und Nekroptose, aber auch zum Überleben und zur Proliferation der Zelle sowie zur Produktion proinflammatorischer Zytokine führen. Wichtige Signalwege betreffen unter anderem die Aktivierung von Caspasen, NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinases*) (Sabio & Davis, 2014; Al-Lamki & Mayadas, 2015).

1.6.4 TNF-Signalling bei Malaria

In der Mitte der 1970er Jahre stellte sich ein Zusammenhang zwischen der Infektion von Mäusen mit bestimmten Bakterien/Parasiten (z.B. *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)) und einer erhöhten Empfindlichkeit der Tiere gegenüber injizierten Lipopolysacchariden (LPS) heraus. Damit einher gingen tumorizide Effekte sowie eine protektive Wirkung auf den Verlauf einer späteren Infektion mit Plasmodien oder Babesien (mit *Plasmodium* verwandte Apicomplexa). Bei der Suche nach einem gemeinsamen Mediator dieser Effekte geriet das 1975 identifizierte Zytokin TNF in den Fokus (Clark, 2007). 1978 wurde es zum ersten Mal mit der Immunantwort gegen Plasmodien in Verbindung gebracht (Clark, 1978), im Jahr 1981 wurde postuliert, dass TNF-vermittelte Effekte auch ursächlich für pathologische Prozesse im Rahmen einer Malariainfektion verantwortlich sein könnten (Clark *et al.*, 1981). Diese Hypothese wurde 1988 durch Experimente mit rekombinantem TNF bestätigt, welches seit 1984 verfügbar war (Clark & Chaudhri, 1988). 1990 zeigten Experimente von van der Poll *et al.*, dass beim Menschen nach der Injektion von rekombinantem TNF Krankheitssymptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Fieber auftreten, die alle auch typisch für eine Malariainfektion sind (van der Poll *et al.*, 1990; Lang *et al.*, 2010), und 1993 konnte in einer Studie mit 41 an zerebraler Malaria erkrankten Kindern in Gambia gezeigt werden, dass die Gabe eines Antikörpers gegen TNF in dosisabhängiger Weise die Fiebertemperatur senkt (Kwiatkowski *et al.*, 1993).

Diese Beobachtungen zeigen, dass TNF bei der Malariainfektion eine wichtige Rolle spielt. Es hat zum einen eine Funktion bei der Immunantwort gegen die Parasiten, zum anderen ist es auch für die Pathologie der Krankheit mitverantwortlich.

1.6.5 TNF-Signalling bei zerebraler Malaria

Auch bei der Entstehung von zerebraler Malaria scheint TNF eine wichtige Rolle zu spielen. So beobachteten Grau *et al.* 1987, dass die Gabe von Antikörpern gegen TNF im Mausmodell die Entwicklung von EZM verhindern konnte (Grau *et al.*, 1987). Mit

ihrer Zytokintheorie der HZM rückten Clark & Rockett im Jahr 1994 proinflammatorische Zytokine, darunter TNF, in den Fokus der Erforschung der Pathogenese der Komplikation (Clark & Rockett, 1994). Im Jahr 2002 zeigten Engwerda *et al.*, dass das Vorhandensein von LT α (und nicht das von TNF) kritisch für das Auftreten von EZM ist (Engwerda *et al.*, 2002). Jedoch konnten Jacobs *et al.* später scheinbar im Widerspruch dazu zeigen, dass die Gabe eines Antikörpers gegen TNF die Entwicklung von EZM verhinderte (Jacobs *et al.*, unveröffentlicht). Zusammenfassend scheint TNF-*Signalling* bei der Entstehung zerebraler Malaria involviert zu sein, wobei seine genaue Rolle in der Pathogenese bis heute unklar ist.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Pathogenese der zerebralen Malaria ist bis heute nicht genau verstanden, aufgrund der epidemiologischen Situation ist ein besseres Verständnis jedoch dringend notwendig. TNF-*Signalling* spielt offenbar eine wichtige Rolle, deren genauer Charakter aber unklar ist, wobei sich scheinbar widersprechende Forschungsergebnisse in der Literatur finden. In dieser Arbeit sollten daher neue, bislang nicht erforschte Eingriffe in das TNF-*Signalling*-System im etablierten *PbA-C57BL/6*-Mausmodell auf ihre Auswirkungen hinsichtlich der Entwicklung von EZM hin untersucht werden. Zum einen sollte dafür der Effekt einer Neutralisierung von TNFR-Liganden durch die klinisch gebräuchlichen TNF-Blocker Etanercept und Infliximab getestet werden. Zum anderen sollte anhand von vier verschiedenen Mauslinien mit zelltypspezifischem Knockout von TNFR1 das Wissen über die Rolle dieses Rezeptors im EZM-Mausmodell erweitert werden.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Gefrierschrank -20°C	<i>Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß</i>
Gefrierschrank -70°C	<i>Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß</i>
Gefrierschrank -80°C	<i>Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß</i>
Geldokumentationsapparat	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell</i>
Gelelektrophoresekammer	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen</i>
Kühlschrank	<i>Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß</i>
Mikropipetten (10µl, 20µl, 50µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	<i>Gilson Inc., Middleton, USA Eppendorf AG, Hamburg</i>
Mikroskop „Axiostar plus“	<i>Carl Zeiss AG, Oberkochen</i>
Mikroskop „EVOS FL Cell Imaging System“	<i>Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
Mikroskop „TMS“	<i>Nikon GmbH, Düsseldorf</i>
Mikroskop „Wilovert 30“	<i>Helmut Hund GmbH, Wetzlar</i>
Mikrowelle	<i>Clatronic International GmbH, Kempen Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München</i>
Pipettierhilfe „CellMate II“	<i>Matrix Technologies Corporation, Hudson, USA</i>
Pipettierhilfe „pipetus standard“	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt</i>
Pipettierhilfe „SWIFTPET+“	<i>PZ HTL S.A., Warschau, Polen</i>
Sicherheitswerkbank „B-[MaxPro] ³ -130“	<i>Berner International GmbH, Elmshorn</i>
Sicherheitswerkbank „Interactive SafeChange Station“	<i>Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg</i>
Sicherheitswerkbank „LaminAir HB 2448“	<i>Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau</i>
Stickstofftank „XLC 230“	<i>Escher Cryotechnik, Duisburg</i>
Stromzufuhr für Gelelektrophorese	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Thermocycler „peqstar 2x Gradient“	<i>PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen</i>
Thermocycler „Primus 96 plus“	<i>MWG-Biotech AG, Ebersberg</i>

UV-Transilluminator	<i>Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell</i>
Vortex „Bio Vortex V1“	<i>Biotechnology Lab4you GmbH, Berlin</i>
Vortex „MS1 Minishaker“	<i>IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen</i>
Zentrifuge „5415 C“	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Zentrifuge „5415 D“	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Zentrifuge „5415 R“	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Zentrifuge „5424 R“	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Zentrifuge „Megafuge 1.0R“	<i>Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau</i>

2.2 Glas- und Plastikwaren

Blutlanzette „NDXU 40“	<i>ASID BONZ GmbH, Herrenberg</i>
Glaspipetten (2ml, 5ml, 10ml, 20ml)	<i>Brand, Wertheim</i>
Injektionskanüle „Sterican“ (Gr. 20 / 0,40 x B. Braun Melsungen AG, Melsungen 20mm BL/LB 27G x ¾")	
Neubauer-Zählkammer	<i>Brand, Wertheim</i>
Objektträger	<i>Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde</i>
PCR-Reagiergefäße „Multiply -µStrip Pro 8er Kette“	<i>Sarstedt AG & Co, Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen „Biosphere Filter Tips“ (20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	<i>Sarstedt AG & Co, Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	<i>Sarstedt AG & Co, Nümbrecht</i>
Reagiergefäß „Eppendorf Tube 5,0ml“	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Reagiergefäße „Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5ml“	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Reagiergefäße „Sarstedt SafeSeal Tubes 1,5ml“	<i>Sarstedt AG & Co, Nümbrecht</i>
Spritze „Injekt-F“ (1ml)	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen</i>
Spritze „Injekt“ (2ml, 5ml, 10ml)	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen</i>
Spritze „Omnifix-F“ (1ml)	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen</i>
Zentrifugiergefäße (15ml, 50ml)	<i>Sarstedt AG & Co, Nümbrecht</i>

2.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen *Merck KGaA* (Darmstadt), *Carl Roth GmbH + Co. KG* (Karlsruhe) und *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Steinheim) bezogen.

2.4 Puffer und Stammlösungen

Ethidiumbromid-Stammlösung	10mg/ml	
TAE-Puffer (50x)	Tris Base	242g
	Essigsäure	57,1ml
	0,5M EDTA	100ml
	destilliertes Wasser	ad 1l
	pH 8,0	
Tail-Lysis-Puffer (1x)	Tris-HCl, pH 8,5	100mM
	EDTA	5mM
	NaCl	200mM
	SDS	0,2%
TBE-Puffer (10x)	Tris-HCl	0,9M
	H ₃ BO ₃	0,9M
	EDTA	20mM
Wright's stain	Wright's stain	500mg
	Methanol	ad 500ml

2.5 Material für molekularbiologische Arbeiten

2mM dNTP Mix	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i> , Waltham, USA
2X Terra PCR Direct Buffer (mit Mg ²⁺ , dNTP)	<i>Clontech Laboratories Inc.</i> , Mountain View, USA
6X DNA Loading Dye	<i>Fermentas GmbH</i> , St. Leon-Rot
Biozym LE Agarose	<i>Biozym Scientific GmbH</i> , Hessisch Oldendorf
DreamTaq DNA Polymerase	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i> , Waltham, USA

DreamTaq Green Buffer	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA</i>
Ethidiumbromid	<i>Fluka Chemie, Neu-Ulm</i>
FastRuler Low Range DNA Ladder	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA</i>
GelRed Nucleic Acid Stain	<i>Phenix Research Products, Candler, USA</i>
Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
Gereinigtes Wasser „Ampuwa“ (10ml)	<i>Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.</i>
peqGREEN DNA/RNA Dye	<i>PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen</i>
Primer	<i>Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg</i>
Proteinase K	<i>Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA</i>
Terra PCR Direct Polymerase Mix	<i>Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA</i>
UltraPure Agarose	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA</i>

2.6 Material für tierversuchsbezogene Arbeiten

Desinfektionsmittel „Incidin Liquid“	<i>Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein</i>
Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium)	<i>PAN-Biotech GmbH, Aidenbach</i>
Etanercept	<i>Pfizer Pharma GmbH, Berlin</i>
Immersionsöl „Immersol 518 F“ für Mikroskop „EVOS FL Cell Imaging System“	<i>Carl Zeiss AG, Oberkochen</i>
Immersionsöl für Mikroskop „Axiostar plus“	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Infliximab	<i>MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar</i>
Wright's stain	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>

2.7 Mauslinien

<i>Mus musculus</i> C57BL/6 (Wildtyp)	<i>Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, USA</i>
<i>Mus musculus</i> C57BL/6 TNFR1 ^{fl/fl} AFP-Cre	Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
<i>Mus musculus</i> C57BL/6 TNFR1 ^{fl/fl} CD4-Cre	Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

<i>Mus musculus</i> C57BL/6 TNFR1 ^{fl/fl} Cdh5-Cre	Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
<i>Mus musculus</i> C57BL/6 TNFR1 ^{fl/fl} LysM-Cre	Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

2.8 Plasmodien

<i>Plasmodium berghei</i> ANKA (<i>PbA</i>)	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
---	---

2.9 Software

Bezeichnung	Verwendung	Herausgeber
EVOS FL Software	Mikroskopsteuerung	<i>Life Technologies GmbH</i> , Darmstadt
FusionCapt Advance 16.07	Geldokumentationssoftware	<i>Vilber Lourmat Deutschland GmbH</i> , Eberhardzell
GIMP 2.8.4	Bildbearbeitung	Spencer Kimball, Peter Mattis <i>et al.</i> (freie Software, bezogen von http://www.gimp.org/ , zuletzt geprüft am 13.03.2018)
GraphPad Prism 6.01	Datenanalyse und graphische Auswertung	<i>GraphPad Software Inc.</i> , La Jolla, USA
ImageJ 1.48v	Auswertung und Bearbeitung von Bildern	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA
Mendeley Desktop 1.13.3	Literaturverwaltung	<i>Mendeley Ltd.</i> , London, United Kingdom
Quantity One 4.6	Geldokumentationssoftware	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> , München
SPSS 22.0.0.0	Datenanalyse und statistische Auswertung	<i>IBM Deutschland GmbH</i> , Ehningen

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Diese Arbeit entstand in einem Kooperationsprojekt zwischen zwei Arbeitsgruppen an verschiedenen Standorten, die über jeweils eigene Tierhaltungen und Arbeitsroutinen verfügen. Daher wurde ein Teil der Genotypisierungen am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg (UKE), der andere am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg (BNITM), durchgeführt. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Verfahren wurde durch eine übergangsweise Doppelbestimmung der DNA einiger Tiere, die unabhängig voneinander an beiden Standorten durchgeführt wurde, sichergestellt.

Die verwendeten konditionalen TNFR1-Knockoutmäuse basieren auf dem Cre-LoxP-Verfahren (siehe unten) und mussten daher alle hinsichtlich des Genotyps für Cre gescreent werden. Die im Folgenden erläuterte Vorgehensweise bezieht sich auf dieses Screening. Daneben wurden zu Kontrollzwecken zum Teil auch weitere Genloci adressiert, mit jeweils eigenen Primerpaaren und PCR-Programmen. Hierauf wird im Folgenden jedoch nicht weiter eingegangen.

3.1.1 Probennahme und Aufreinigung der genomischen DNA

Zunächst wurden Biopsien aller zu screenenden Mäuse genommen. Die Biopsienahme erfolgte durch Mitarbeiter der Versuchstierhaltung.

3.1.1.1 Methode 1 (Arbeitsgruppe Dr. Ehlken, UKE)

Von der Schwanzspitze der Mäuse wurde ein ca. 3mm großes Gewebestück entfernt, bei -20°C aufbewahrt und der weiteren Analyse zugeführt. Die Biopsie wurde dafür zunächst über Nacht in Tail-Lysis-Puffer mit Proteinase K bei 55°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte zunächst eine Fällung mit 70%igen Ethanol, anschließend wurde die DNA in Isopropanol präzipitiert, abzentrifugiert und getrocknet. Dann wurde sie in 200µl Wasser gelöst.

3.1.1.2 Methode 2 (Arbeitsgruppe PD Dr. Jacobs, BNITM)

Im Rahmen der vor Ort gängigen Markierung der Mäuse durch Stanzung von kreisrunden Ohrlöchern (Durchmesser ca. 1,5mm) wurde das ausgestanzte Gewebestück bei -20°C aufbewahrt und für die spätere Analyse verwendet. Aufgrund der Verwendung des Terra PCR Direct Polymerase Mix war keine Aufreinigung erforderlich.

3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann DNA *in vitro* spezifisch amplifiziert werden (Mullis *et al.*, 1986). Dafür werden die zu vervielfältigende Original-DNA, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) sowie ein entsprechendes Primerpaar benötigt, die in einem passenden Milieu vorliegen müssen.

In einem ersten Schritt, der Denaturierung (1), werden die gepaarten DNA-Stränge durch Erhöhung der Temperatur getrennt, sodass sie frei zugänglich sind. Beim darauffolgenden Annealing (2) wird eine niedrigere Temperatur hergestellt, bei der sich die Primer spezifisch an die entsprechenden Gegenstücke der Kopiervorlage anlagern können. Schließlich kommt es in einem dritten Schritt durch Einstellen der optimalen Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase zur Elongation (3), d.h. zum Auffüllen der fehlenden Stränge von den Primern aus. Durch vielfache Wiederholung dieser Schritte wird der „zwischen den Primern“ liegende Teil der Original-DNA sehr stark amplifiziert und kann dadurch gut analysiert werden.

Einige Parameter (z.B. Anzahl der PCR-Zyklen) wurden zur Optimierung des Verfahrens zwischen der Analyse verschiedener Mausgenerationen variiert. Im Folgenden werden exemplarische Werte angegeben.

An beiden Standorten wurden die folgenden Primer verwendet:

Cre vorwärts	5' - GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C - 3'
Cre rückwärts	5' - CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC - 3'

3.1.2.1 Methode 1 (Arbeitsgruppe Dr. Ehlken, UKE)

Folgende Zutaten wurden zusammenpipettiert:

Bezeichnung	Volumen
10x Puffer	3µl
dNTP-Mix (2mM)	3µl
Primer „Cre vorwärts“ (33µM)	3µl
Primer „Cre rückwärts“ (33µM)	3µl
aufgereinigte DNA	2µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl)	0,5µl
doppelt destilliertes, autoklaviertes Wasser	15,5µl

Anschließend wurde die PCR mit folgendem Programm im *Thermocycler* „peqstar 2x Gradient“ durchgeführt:

	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	finale Elongation	Aufbewahrung
Temperatur [°C]	94	94	61	72	72	8
Dauer [s]	180	30	30	30	180	∞
	⌞ ===== 30 Zyklen ===== ⌋					

3.1.2.2 Methode 2 (Arbeitsgruppe PD Dr. Jacobs, BNITM)

Diese PCR wurde hier als Duplex-PCR mit zwei Primerpaaren durchgeführt. Neben den oben erwähnten Cre-Primern kam folgendes Primerpaar zum Einsatz:

TNFR1fl vorwärts	5' - CAA GTG CTT GGG GTT CAG GG - 3'
TNFR1fl rückwärts	5' - CGT CCT GGA GAA AGG GAA AG - 3'

Folgende Zutaten wurden gemischt und dann zu den Ohrbiopsien gegeben:

Bezeichnung	Volumen
2x Terra PCR Direct Buffer (enthält Mg ²⁺ , dNTP-Mix)	25µl
Primer „Cre vorwärts“ (10pmol/µl)	1,5µl
Primer „Cre rückwärts“ (10pmol/µl)	1,5µl
Primer „TNFR1fl vorwärts“ (10pmol/µl)	1,5µl
Primer „TNFR1fl rückwärts“ (10pmol/µl)	1,5µl
Terra PCR Direct Polymerase Mix	1µl
gereinigtes Wasser („Ampuwa“)	18µl

Anschließend wurde die PCR mit folgendem Programm im *Thermocycler* „Primus 96 plus“ durchgeführt:

	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	finale Elongation	Aufbewahrung
Temperatur [°C]	98	98	60	68	entfällt	8
Dauer [s]	120	10	15	30	entfällt	∞
		===== 30 Zyklen =====				

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Bestandteile des DNA-Amplifikats nach ihrer Fragmentlänge. Dazu werden Agarosepolymere in einer Pufferlösung erhitzt und in eine Form gegossen. Nach Erkalten bildet sich ein Gel, in dem die Polymere nichtkovalent vernetzt sind. Es hat die Eigenschaft, „wandernden“ DNA-Molekülen einen Widerstand entgegenzusetzen, der umso größer ist, je größer das DNA-Molekül ist. Wird DNA in eine Vertiefung im Gel pipettiert und anschließend eine Spannung angelegt, so wandert die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zum Pluspol. Bei passender Zusammensetzung des Gels trennt sie sich dabei nach Molekülgröße auf und ergibt ein charakteristisches Bandenmuster, das mit dem Laufverhalten von DNA-Fragmenten bekannter Länge (sogenannte DNA-Leitern) verglichen werden kann, um Rückschlüsse auf die Fragmentlänge zu ziehen. Um die Bandenmuster sichtbar zu machen, ist ein DNA-Farbstoff erforderlich, der mit in das Gel gegossen werden kann und meist unter UV-Licht betrachtet werden muss.

Bei einer entsprechend designten PCR genügen die Fragmentlängen (und damit das Bandenmuster im Gel) um eine qualitative Aussage über den Genotyp der Maus treffen zu können.

Die Länge der Cre-Bande, auf deren An- oder Abwesenheit hin gescreent wurde, liegt bei etwa 350bp.

3.1.3.1 Methode 1 (Arbeitsgruppe Dr. Ehlken, UKE)

Es wurde ein 1%iges Gel in TBE-Puffer verwendet. Als DNA-Farbstoff kamen entweder *GelRed Nucleic Acid Stain* oder *peqGREEN DNA/RNA Dye* zum Einsatz. Es wurde kein separater Ladepuffer benötigt, da der verwendete PCR-Puffer die direkte Auftragung auf das Gel erlaubt. Als DNA-Leiter wurde *FastRuler Low Range DNA Ladder* verwendet. Ein elektisches Feld wurde angelegt, nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel in einem Geldokumentationsapparat fotografiert.

3.1.3.2 Methode 2 (Arbeitsgruppe PD Dr. Jacobs, BNITM)

Es wurde ein 1,5%iges Gel in TAE-Puffer verwendet, zu dem 0,002% vol. Ethidiumbromid-Stammlösung (Konzentration 10mg/ml) hinzugefügt wurden. Jeweils 10µl DNA-Probe wurden mit 1,8µl Loading Dye und 0,2µl Proteinase K vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als DNA-Leiter wurde „Gene Ruler 100bp“ verwendet. Typischerweise wurde eine elektrische Spannung von 80V für etwa 60min angelegt. Die Gele wurden in einem Geldokumentationsapparat unter UV-Licht fotografiert.

3.1.4 Screening

Die Proben im Gel wurden auf das Vorliegen der Cre-Bande (ca. 350bp) hin untersucht (Beispiel siehe Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Dafür wurde anhand der DNA-Leiter der Bereich zwischen 300 und 400bp aufgesucht und jede Probe auf das Vorliegen einer entsprechenden Bande gescreent. Jeweils eine vorher bekannte Cre-positive sowie Cre-negative Probe wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle in jedem Gel mitbestimmt, ebenso eine sogenannte *No template control*, d.h. der verwendete Mastermix ohne Zugabe von DNA.

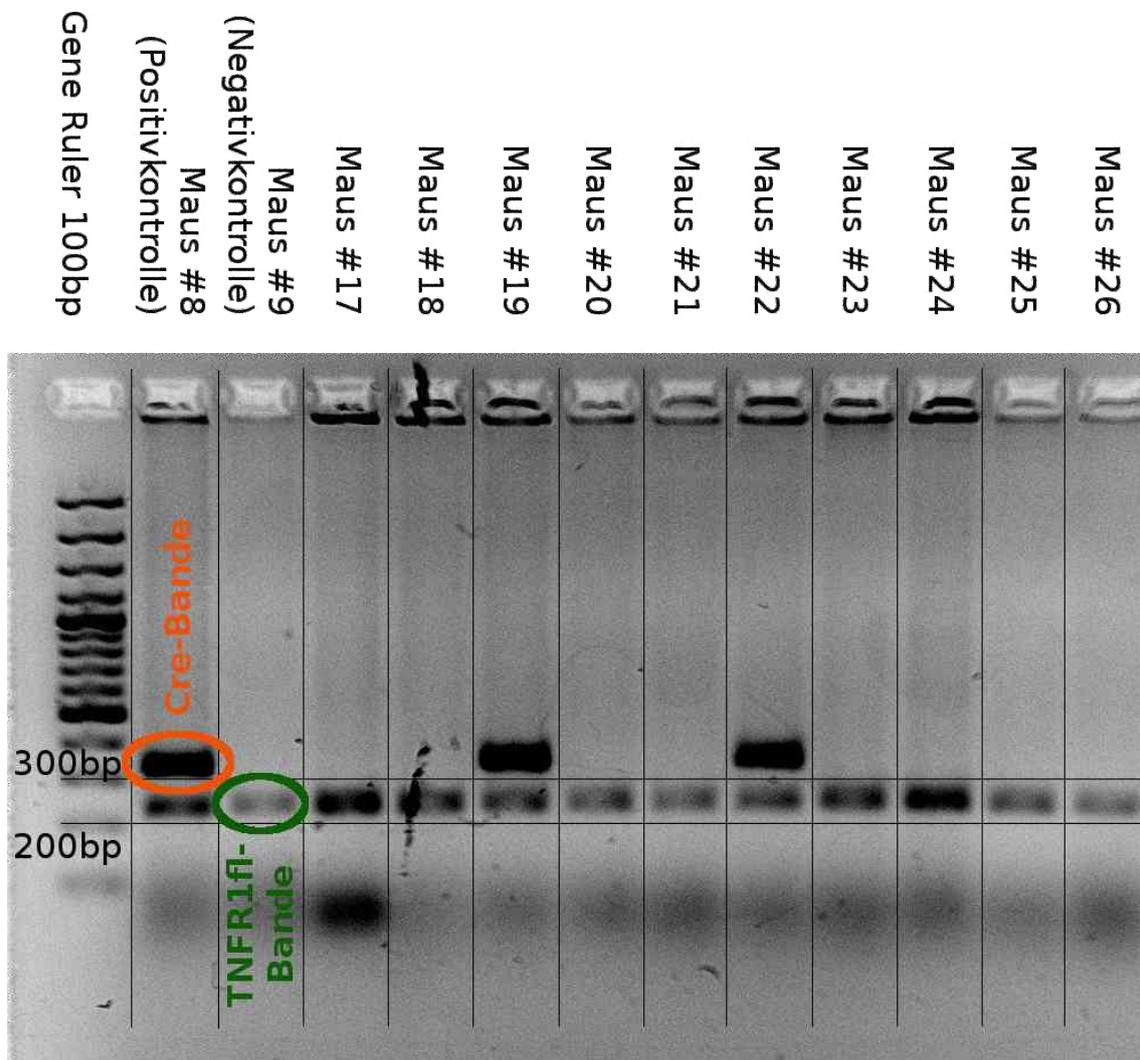


Abb. 3.1: Exemplarisches Bild eines Gels nach Elektrophorese

Obere Reihe des Gels mit Positiv- und Negativkontrolle, selbes Gel wie in Abb. 3.2. Eingezeichnet sind die Cre-Bande (orange) sowie die TNFR1fl-Bande (grün).

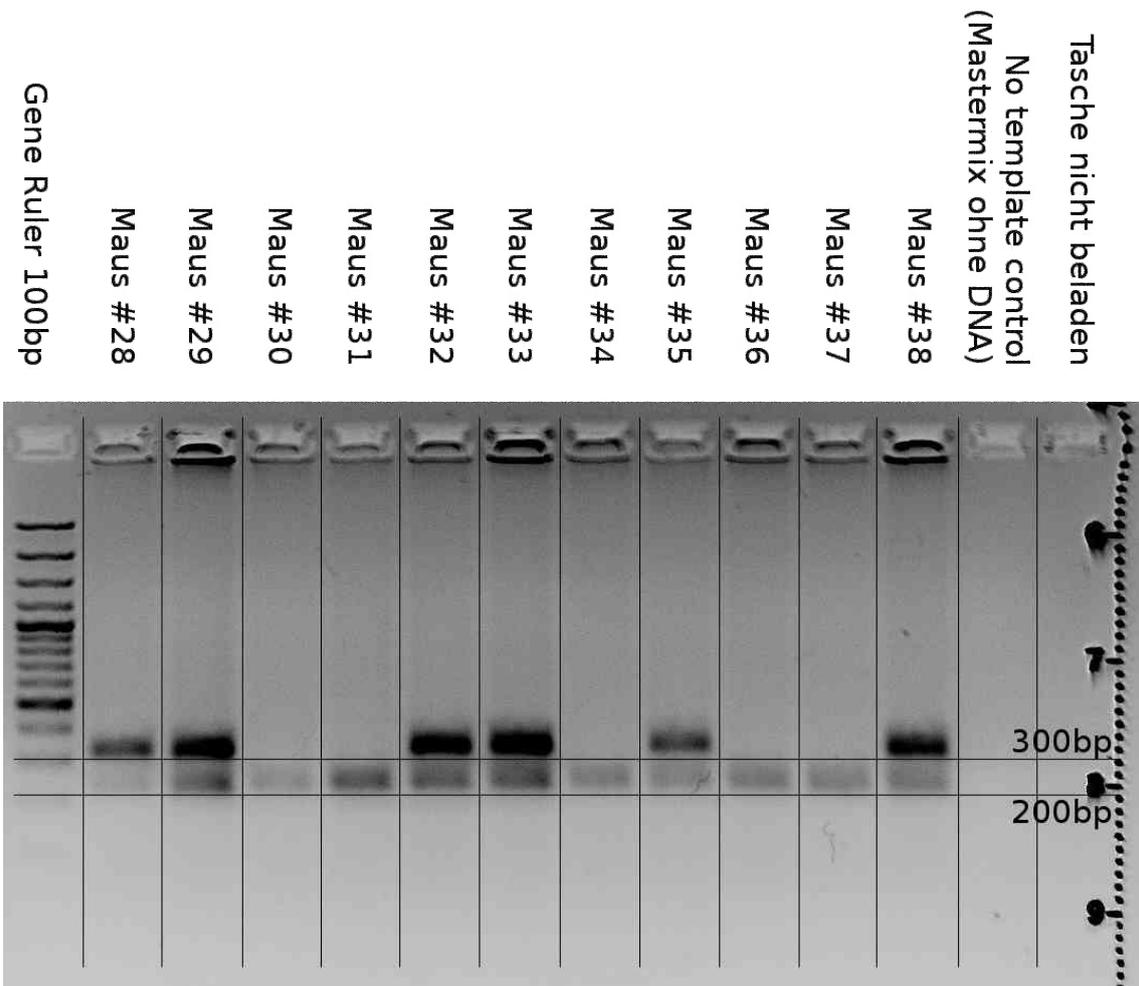


Abb. 3.2: Exemplarisches Bild eines Gels nach Elektrophorese

Untere Reihe des Gels mit *No template control*, selbes Gel wie in Abb. 3.1

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Gewinnung von Blutausstrichen

Um beurteilen zu können, ob eine Maus einige Zeit (üblicherweise etwa eine Woche) nach der Injektion von mit *PbA* infiziertem Stabilat bzw. Frischblut tatsächlich infiziert war, wurden Blutausstriche angefertigt. Dafür wurde die Schwanzvene der Maus mit einer Lanzette punktiert und durch vorsichtiges Ausstreichen ein Tropfen Blut gewonnen, der auf einen bereitgehaltenen Objektträger befördert wurde. Dort wurde ein zweiter Objektträger in einem Winkel von ca. 45° aufgesetzt und zunächst „rückwärts“ gezogen, bis die berührende Kante Kontakt zum Blut hatte und dadurch in die Breite gehend mit Flüssigkeit benetzt wurde. Anschließend wurde der aufgesetzte Objektträger in einer gleichmäßigen Bewegung „vorwärts“ über den unteren Objektträger geschoben, auf dem dadurch der Ausstrich entstand. Nach kurzer Trocknung an der Luft konnte der Ausstrich gefärbt werden.

3.2.2 Färbung von Blutausstrichen

Um die Plasmodien unter dem Mikroskop erkennen zu können, müssen die Ausstriche zuvor gefärbt werden. Für diese Arbeit wurde „Wright's stain“ verwendet. Dafür wurde der Ausstrich zunächst bis zur kompletten Benetzung mit der Lösung beträufelt. Nach zwei Minuten wurden einige Tropfen destilliertes Wasser hinzugeträufelt, um ein Antrocknen zu verhindern. Nach weiteren zwei Minuten wurde der Objektträger mit dem Ausstrich mit destilliertem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet.

3.2.3 Manuelle Parasitämiebestimmung

Zur klassischen manuellen Bestimmung der Parasitämie wurde ein Phasenkontrastmikroskop „Axiostar plus“ mit Zählraster in einem der Okulare verwendet. Die Auszählung fand mit der Einstellung „Phase 3“ unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs mit 60-facher Vergrößerung (Gesamtvergrößerung inklusive Okular: 600-fach) statt.

Zur qualitativen Beantwortung der Frage, ob eine Maus mit *PbA* infiziert war, wurden mindestens 200 Erythrozyten gezählt und anschließend der Anteil parasitierter Erythrozyten bestimmt. Betrug dieser mehr als 0%, wurde die Maus als infiziert eingestuft.

Zur quantitativen Beurteilung der Infektion, wie sie z.B. zur Herstellung einer Infektionslösung aus dem Blut einer Vorversuchsmaus erforderlich war, wurden mindestens 1000 Erythrozyten ausgezählt.

3.2.4 Computergestützte Parasitämiebestimmung

Um bei der Auswertung eines Experiments Unterschiede in der Parasitämie mit höherer Genauigkeit untersuchen zu können, mussten in einigen Fällen größere Zahlen an Erythrozyten ausgezählt werden. Zu diesem Zwecke wurde ein computergestütztes Verfahren entwickelt und eingesetzt, das eine teilautomatisierte Auszählung ermöglicht.

Zunächst wurden die Ausstriche mit dem digitalen Mikroskop EVOS FL unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs mit 60-facher Vergrößerung (Gesamtvergrößerung 600-fach) jeweils an vier verschiedenen geeigneten Stellen fotografiert.

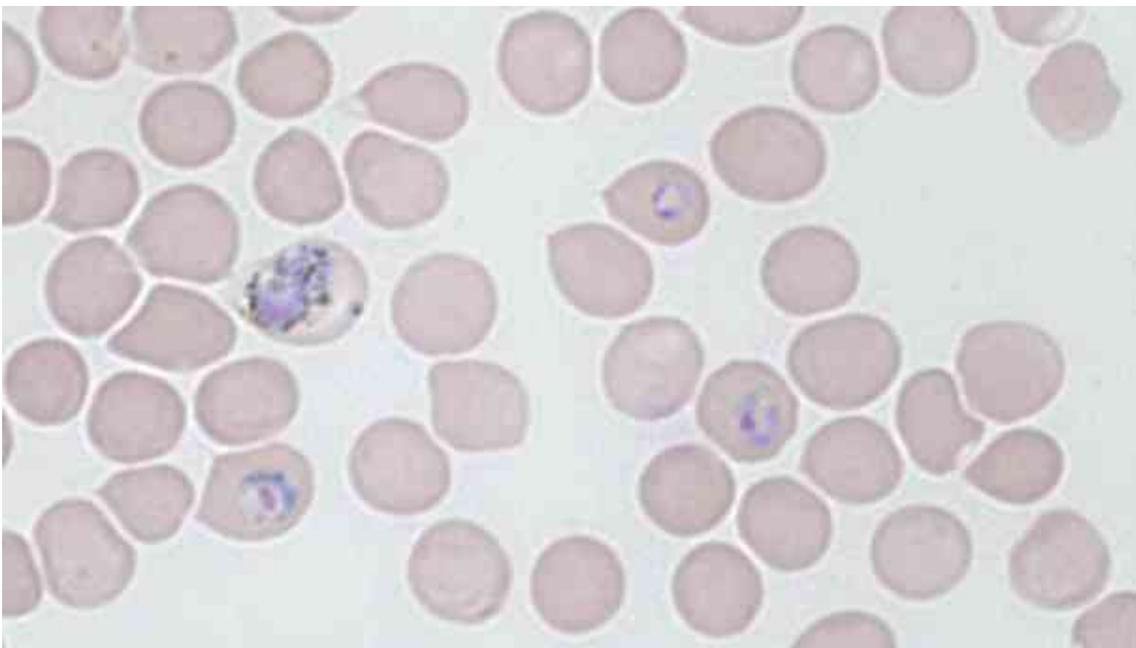


Abb. 3.3: Digitalisierter Blutausstrich einer mit *PbA* infizierten Maus

Die entstandenen Bilddateien (Beispiel siehe Abb. 3.3) wurden anschließend mit dem Programm ImageJ (Version 1.48v) unter Einbeziehung eines selbst erstellten Makros (siehe Abb. 3.4) analysiert.

Dieses Makro erkennt die Erythrozyten und zählt sie. Damit muss nur noch die wesentlich geringere Zahl der infizierten Erythrozyten von Hand bestimmt werden. Typischerweise wurden mit diesem Verfahren mehr als 2000 Erythrozyten pro Ausstrich gezählt.

```
filename = getTitle();
rename("original");
run("Duplicate...", "title=duplicate");
selectWindow("original");
run("Set Scale...", "distance=416 known=50 pixel=1 unit=µm global");
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=18-50 circularity=0.50-1.00
show=Outlines display clear");
selectWindow("duplicate");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.4");
selectWindow("Drawing of original");
run("Add Image...", "image=duplicate x=0 y=0 opacity=65");
selectWindow("original");
close();
selectWindow("duplicate");
close();
selectWindow("Drawing of original");
run("Flatten");
selectWindow("Drawing of original-1");
rename("prepared_for_counting");
selectWindow("Drawing of original");
close();
selectWindow("prepared_for_counting");
run("Grid ", "grid=Lines area=2000 color=White");
rename(""+filename+"_prepared_for_counting");
selectWindow("Results");
run("Distribution...", "parameter=Area or=50 and=18-50");
```

Abb. 3.4: Quelltext des Makros zur Auszählung digitalisierter Blutausstriche

3.3 Tierversuche

3.3.1 Mäuse

Nach Möglichkeit wurden Mäuse im Alter von 7 bis 9 Wochen verwendet. In einigen Fällen wurden aus Verfügbarkeitsgründen auch jüngere (min. 6 Wochen alt) und ältere Mäuse (bis zu 17 Wochen alt) verwendet. Das Alter bezieht sich immer auf den Zeitpunkt der Infektion mit *PbA*. Es wurden stets weibliche Mäuse verwendet, da EZM-Inzidenzexperimente mit männlichen Mäusen aufgrund von starkem Hierarchieverhalten der Tiere, einhergehend mit individuell erheblich unterschiedlichem Gewicht und Stresslevel, weniger gut funktionieren. Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Einleiten von CO₂ in die Käfige oder durch zervikale Dislokation.

Die Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigungen Nr. 64/11 und Nr. 56/13 (Hamburg) durchgeführt.

3.3.2 Gentechnisch veränderte Mäuse

Zur Untersuchung der zelltypspezifischen Rollen von TNFR1 wurden konditionale TNFR1-Knockoutmäuse verwendet, die auf dem Cre/loxP-System (Sauer & Henderson, 1988) basieren.

In diesen Tieren wurde das Gen, das für TNFR1 kodiert, von sogenannten loxP-Sides, 34bp langen DNA-Sequenzen, flankiert („*gefloxt*“). Diese Bereiche dienen als Angriffsstelle für das ursprünglich aus Bakteriophagen stammende Enzym Cre-Rekombinase, welches den zwischen den loxP-Sides gelegenen DNA-Abschnitt herausschneidet und je nach Orientierung der loxP-Sides invertiert wieder einfügt („Inversion“) oder als plasmidartigen Ring freigibt, wobei die beiden äußeren DNA-Abschnitte wieder miteinander verbunden werden („Exzision“, diese Variante wurde bei den verwendeten Mäusen angewandt). Da die Deletion des TNFR1-Gens nur in gewissen Zellen erfolgen sollte, wurde die Cre-Rekombinase hinter einem gewebsspezifischen Promotor ins Genom eingefügt. Dies geschah durch Kreuzung der TNFR1^{fl/fl}-Mauslinie mit den jeweiligen gewebsspezifischen Cre-Mauslinien (sogenannte *Deletermäuse*). Durch diese Vorgehensweise wurde ein zelltypspezifischer Knockout von TNFR1 erreicht. Bei allen verwendeten Knockoutmäusen war das Gen für TNFR1 homozygot *gefloxt* (TNFR1^{fl/fl}). In Bezug auf Cre waren sie entweder heterozygot (Cre^{+/-}, Knockout, Interventionsgruppe) oder homozygot negativ (Cre^{-/-}, kein Knockout, Kontrollgruppe), mit jeweils 50%iger Wahrscheinlichkeit für eine der Varianten. Auf diese Weise konnten Wurfgeschwister (sogenannte *littermates*) miteinander verglichen werden, die sich nur im Genotyp für Cre unterschieden.

Die eingekreuzte TNFR1^{fl/fl}-Mauslinie (*Mus musculus* C57BL/6 TNFR1^{fl/fl}) wurde generiert von Van Hauwermeiren *et al.* (Van Hauwermeiren *et al.*, 2013).

Die folgenden konditionalen TNFR1-Knockoutmauslinien kamen in dieser Arbeit zum Einsatz:

- *Mus musculus* C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} AFP-Cre: Zugrunde liegende Cre-*Deletermauslinie* zuerst beschrieben von Kellendonk *et al.* (Kellendonk *et al.*, 2000). Deletiert TNFR1 in Hepatozyten und Cholangiozyten.

- *Mus musculus* C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} CD4-Cre: Zugrunde liegende Cre-Deletermauslinie zuerst beschrieben von Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2001). Deletiert TNFR1 in T-Zellen. Da alle T-Zellen während der Reifung im Thymus doppelt positiv (CD4⁺CD8⁺) werden (Koch & Radtke, 2011), sind auch (spätere) CD8 positive T-Zellen von dem Knockout betroffen.
- *Mus musculus* C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} Cdh5-Cre: Zugrunde liegende Cre-Deletermauslinie zuerst beschrieben von Alva *et al.* (Alva *et al.*, 2006). Deletiert TNFR1 in Endothelzellen.
- *Mus musculus* C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} LysM-Cre: Zugrunde liegende Cre-Deletermauslinie zuerst beschrieben von Clausen *et al.* (Clausen *et al.*, 1999). Deletiert TNFR1 in Makrophagen und möglicherweise auch in anderen, von Myeloblasten abstammenden Zelltypen wie Granulozyten, worauf Expressionsstudien zu Lysozym M hinweisen (Cross *et al.*, 1988).

3.3.3 Infektion mit *Plasmodium berghei* ANKA

Bei der Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *Plasmodium berghei* ANKA handelt es sich um ein etabliertes Mausmodell für zerebrale Malaria (De Souza *et al.*, 2010). Es wird, in Abgrenzung zur humanen zerebralen Malaria (HZM), auch als experimentelle zerebrale Malaria (EZM) bezeichnet.

Die Infektion mit *PbA* wurde jeweils mit Stabilaten, die bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, gestartet. Um eine möglichst vergleichbare Virulenz der Plasmodien über verschiedene Experimente hinweg zu erhalten, wurden zunächst stets Vorversuchsmäuse i.p. mit ca. 200µl Gemisch aus Stabilat und PBS infiziert. Nach ca. einer Woche wurde ein Blutausschlag der Vorversuchsmaus gewonnen, gefärbt und ausgezählt. Lag eine Infektion vor, wurde der Maus Blut abgenommen, das im Anschluss mit Heparin versetzt und in PBS verdünnt wurde. Dann wurde die Erythrozytenkonzentration dieses Gemisches in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit der Parasitämie verrechnet, um eine Infektionslösung mit definierter Konzentration infizierter Erythrozyten herstellen zu können. Den Versuchsmäusen wurden dann 10⁵ (in einem Fall 5x10⁵) infizierte Erythrozyten aus der Vorversuchsmaus in 200µl PBS i.p. gespritzt. Die Zeitspanne zwischen der Blutabnahme bei der Vorversuchsmaus und der Infektion der Versuchsmäuse betrug etwa eine Stunde. Durch Anfertigen eines Blutausschlags an Tag 6 nach der Infektion bei allen Versuchsmäusen konnte im Nachhinein überprüft werden, ob diese tatsächlich infiziert waren.

3.3.4 Beurteilung des Auftretens von experimenteller zerebraler Malaria

Die Beurteilung des Auftretens von EZM wurde anhand eines etablierten neurologischen Scores vorgenommen (EZM-Score, siehe Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Score zur Beurteilung des Auftretens experimenteller zerebraler Malaria

Score	Merkmale
0	gesund
1	Tier zeigt Auffälligkeiten, langsamere Bewegung, zerzaustes Fell
2	Tier zieht sich nicht mehr hoch, wenn am Schwanz gegriffen
3	Tier sitzt regungslos in die Ecke gekauert, Bewegung nur nach Anstupsen
4	Tier liegt auf der Seite und lediglich die Atmung ist erkennbar
5	Tier ist tot

Aufgrund eigener Beobachtungen, dass die Trennschärfe zwischen den Scores 0, 1 und 2 relativ niedrig ist, wurde entschieden, das Ergebnis zu dichotomisieren und für die spätere Auswertung nur zu berücksichtigen, ob der Score <3 („keine EZM aufgetreten“) oder ≥ 3 („EZM aufgetreten“) betrug. Mäuse, die mit einem Score ≥ 3 aufgefunden wurden, wurden zur Vermeidung unnötigen Leidens getötet.

Abb. 3.5 zeigt den Ablauf der Versuche.

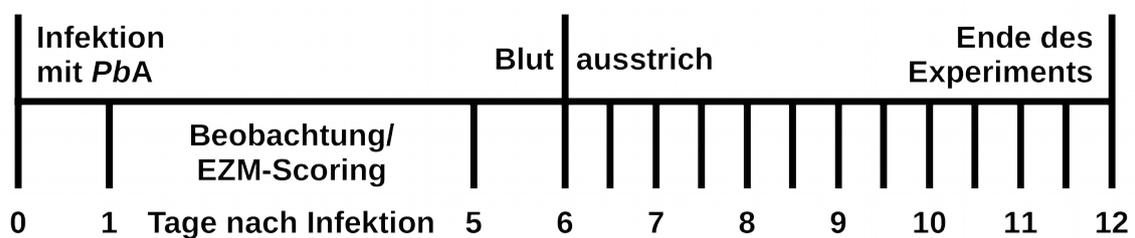


Abb. 3.5: Versuchsschema

Jeder senkrechte Strich steht für einen Beobachtungszeitpunkt der Versuchsmäuse. Die genauen Uhrzeiten der Beobachtung waren aus Gründen der Praktikabilität nicht immer gleich, es wurde jedoch darauf geachtet, dass der zeitliche Abstand zwischen zwei Beobachtungszeitpunkten an einem Tag möglichst groß war.

3.4 Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte als Time-to-Event-Analyse unter Anwendung der Kaplan-Meier-Methode, des Log-Rang-Tests sowie der Cox-Regression. Parasitämien wurden unter Anwendung des T-Tests (bei angenommener Normalverteilung) auf signifikante Unterschiede untersucht. Dazu wurde SPSS 22 unter Verwendung der Syntaxfunktion zur nachvollziehbaren Dokumentation der durchgeführten Prozeduren verwendet. Es wurde ein exploratives Vorgehen ohne Adjustierung für multiple Analysen gewählt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ festgelegt. Zur Veranschaulichung statistischer Signifikanz wurde die folgende Symbolzuordnung zugrundegelegt: $p<0,05 \rightarrow *$; $p<0,01 \rightarrow **$; $p<0,001 \rightarrow ***$. Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 6 eingesetzt. Der Begriff „EZM-Inzidenz“ bezeichnet das Auftreten von EZM mit einem *Score* ≥ 3 .

3.4.1 Erläuterungen zur Cox-Regression

Als Regression werden allgemein Verfahren bezeichnet, welche den Zusammenhang zwischen einer oder mehreren unabhängigen Variablen (Einflussgrößen) sowie einer abhängigen Variable (Zielgröße) modellieren (Lange & Bender, 2007). Die Cox-Regression wird eingesetzt, „wenn gleichzeitig der Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable untersucht werden soll“ (Ziegler *et al.*, 2007) und es sich bei der Zielvariable „um zensierte Überlebenszeiten [handelt]“ (ebenda). „Ganz allgemein liefert das Cox-Modell eine Schätzung des Therapieeffekts auf die Überlebenszeit, adjustiert für die anderen Einflussgrößen des Regressionsmodells. Das Modell erlaubt es, den *Hazard* – salopp gesprochen das unmittelbare Risiko – für eine Person im Hinblick auf den Tod oder ein anderes interessierendes Ereignis zu schätzen“ (ebenda). Eine wichtige Voraussetzung ist, „dass die Effekte verschiedener Variablen auf das Überleben über die Zeit konstant sind“ (ebenda). In dieser Arbeit war das interessierende Ereignis das Auftreten von EZM (*Score* ≥ 3), anders formuliert wurde die Zeit bis zum Auftreten von EZM untersucht.

Die Cox-Regression liefert als Ergebnis sogenannte *Hazard Ratios* (HR), die den Einfluss der unabhängigen Variablen auf die abhängige Variable quantifizieren. Die HRs geben für kategoriale Einflussvariablen an, wie hoch das unmittelbare Risiko für das Eintreten des interessierenden Ereignisses in Bezug auf die Vergleichsgruppe ist, und zwar bei Adjustierung für die anderen Modellvariablen. Für stetige Einflussvariablen

gibt das *Hazard Ratio* an, wie sich das unmittelbare Risiko bei Erhöhung der Einflussvariable um 1 verändert, ebenfalls bei Adjustierung für die weiteren Modellvariablen (Ziegler *et al.*, 2007).

Des Weiteren kann ein Konfidenzintervall für das *Hazard Ratio* berechnet werden, welches angibt, welcher Bereich das tatsächliche (unbekannte) *Hazard Ratio* mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit (z.B. 95%) überdeckt (Ziegler *et al.*, 2007). Zusätzlich wird ein p-Wert angegeben, der „die Wahrscheinlichkeit dafür [beschreibt], dass sich die Daten wie beobachtet (oder extremer) realisieren, falls in Wirklichkeit die Nullhypothese zutrifft“ (Bender & Lange, 2007), wobei als Nullhypothese die Abwesenheit eines Effekts der Intervention (kein Effekt / HR=1), und als Alternativhypothese ein Unterschied, d.h. das Vorhandensein eines Effekts der Intervention, festgelegt wurde.

Tab. 3.2: Beispiel für das Ergebnis einer Cox-Regression

	<i>Hazard Ratio</i>	95% Konfidenzintervall für <i>Hazard Ratio</i>		p-Wert
		Unterer Wert	Oberer Wert	
Genotyp (Cre-positiv gegen Cre-negativ) → kategoriale Variable	0,463	0,132	1,626	0,229
Alter bei Infektion [Wochen] → stetige Variable	1,188	0,947	1,491	0,136

Tab. 3.2 zeigt exemplarisch, wie das Ergebnis einer Cox-Regression aussehen könnte. Das *Hazard Ratio* von 0,463 für die kategoriale Variable „Genotyp“ bedeutet, dass das unmittelbare Risiko für das Auftreten von EZM für Tiere mit Cre-positivem Genotyp auf 46,3% des Risikos der Cre-negativen Kontrollgruppe verringert ist. Das Konfidenzintervall gibt an, dass mit 95%iger Wahrscheinlichkeit der Bereich zwischen 0,132 und 1,626 das tatsächliche (unbekannte) HR überdeckt. Der p-Wert von 0,229 sagt aus, dass für den Fall, dass der Genotyp der Tiere keinerlei Einfluss auf die EZM-Inzidenz hat, mit einer Wahrscheinlichkeit von 22,9% die vorliegenden (oder noch „extremere“) Daten als Ergebnis eines Zufallsexperiments entstehen würden.

Das *Hazard Ratio* von 1,188 für die stetige Variable „Alter bei Infektion“ bedeutet, dass das unmittelbare Risiko für das Auftreten von EZM bei einer Erhöhung des Alters zum Zeitpunkt der Infektion mit *PbA* um 18.8% je Woche steigt. Konfidenzintervall und p-Wert für diese Variable lassen sich analog zur beschriebenen Vorgehensweise bei kategorialen Variablen interpretieren.

4 Ergebnisse

4.1 Neutralisierung von TNFR-Liganden

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkung die Neutralisierung der TNFR-Liganden TNF und $LT\alpha$ auf die Entwicklung von EZM hat. Zu diesem Zweck wurden das Fusionsprotein Etanercept und der Antikörper Infliximab zu verschiedenen Zeitpunkten in Bezug auf die Infektion mit *PbA* i.p. verabreicht.

4.1.1 Applikation 1 Stunde vor der Infektion

C57BL/6-Mäusen wurden eine Stunde vor der Infektion mit *PbA* 500 μ g Etanercept ad 200 μ l PBS (bzw. 200 μ l reines PBS als Kontrolle) i.p. gespritzt. Das Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Bei der zweiten und dritten Durchführung gab es zusätzlich zu den beiden beschriebenen Interventionsgruppen eine weitere Gruppe, die 500 μ g Infliximab ad 200 μ l PBS i.p. erhielt.

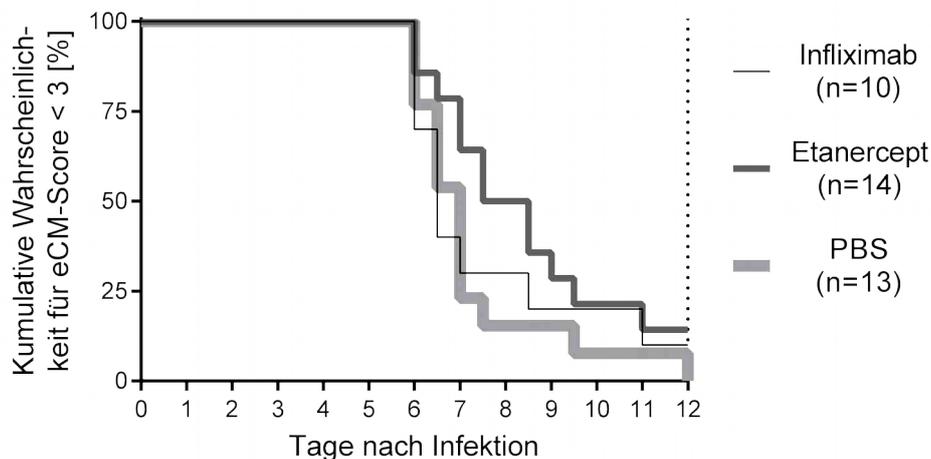


Abb. 4.1: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept oder Infliximab 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgänge 1,2,3 gepoolt

Weiblichen C57BL/6-Mäusen (Alter 7-9 Wochen) wurden 1 Stunde vor Infektion 500 μ g Etanercept / 500 μ g Infliximab ad 200 μ l PBS bzw. in der Kontrollgruppe 200 μ l PBS i.p. gespritzt, wobei die Gruppenteilung zufällig und über die verschiedenen Käfige möglichst gleichmäßig vorgenommen wurde. Die Infektion erfolgte mit 10^5 *PbA*-infizierten Erythrozyten aus dem Blut einer Vorversuchsmaus ad 200 μ l PBS i.p. Die Mäuse wurden bis Tag 12 nach Infektion anhand des EZM-Scores auf neurologische Symptome hin beobachtet, ein Score ≥ 3 wurde als EZM gewertet. Mäuse mit aufgetretener EZM wurden getötet. An Tag 6 nach Infektion wurde ein Blutausschrieb zur Parasitämiebestimmung gewonnen. Nicht infizierte Mäuse wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Gezeigt sind die gepoolten Daten dreier unabhängiger Durchführungen des Versuchs. Für die einzelnen Versuchsdurchgänge siehe Abb. 4.2-4.5.

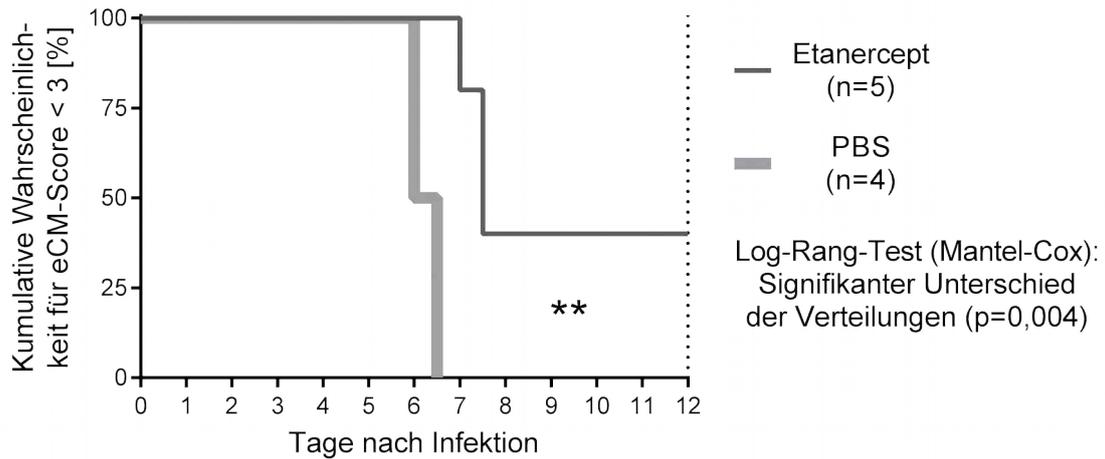


Abb. 4.2: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgang 1/3

Details siehe Abb. 4.1

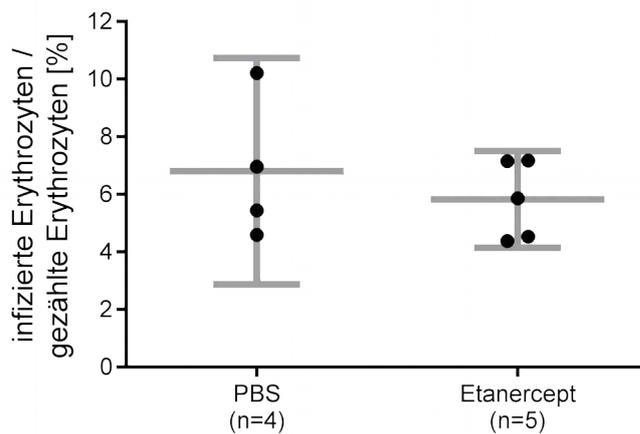


Abb. 4.3: Parasitämie nach Gabe von Etanercept 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgang 1/3

Es handelt sich um die Parasitämie an Tag 6 nach Infektion mit *PbA*. Die Ausstriche wurden computergestützt ausgewertet. Es wurden mindestens 2000 Erythrozyten pro Maus ausgezählt. Dargestellt sind der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall. Details zum Versuchssetting siehe Abb. 4.1

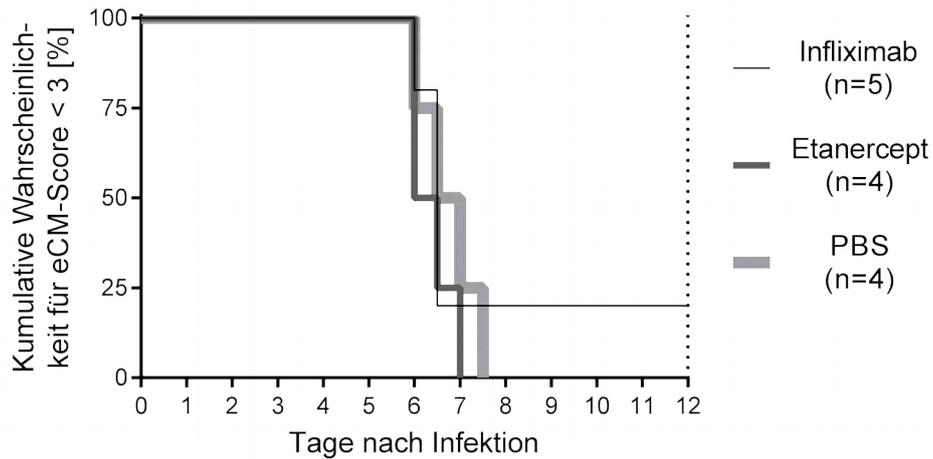


Abb. 4.4: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept oder Infliximab 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgang 2/3

Details siehe Abb. 4.1

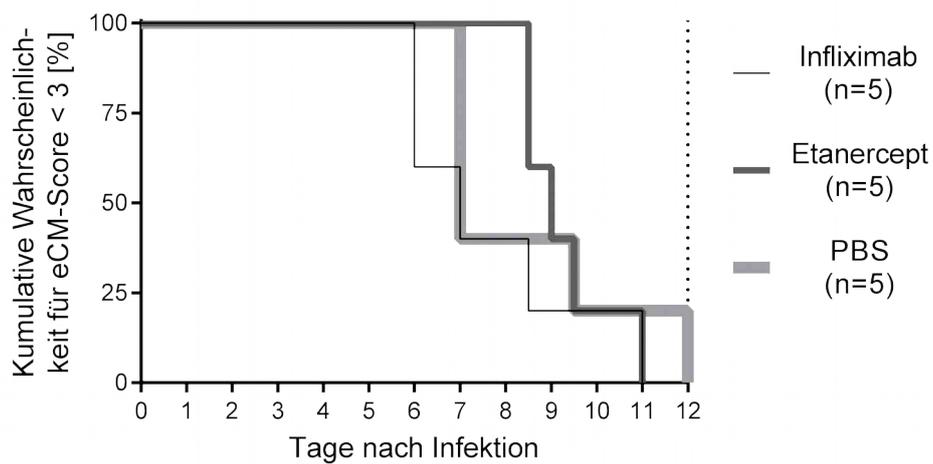


Abb. 4.5: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept oder Infliximab 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgang 3/3

Details siehe Abb. 4.1

Insgesamt zeigte sich ein protektiver Effekt von Etanercept gegenüber der Entwicklung von EZM, der jedoch nicht signifikant war (siehe Abb. 4.1). Betrachtet man die drei unabhängigen Durchgänge des Experiments separat, ist erkennbar, dass die Gabe von Etanercept in Durchgang 1 signifikant protektiv war (siehe Abb. 4.2), wohingegen sie in Durchgang 2 eher schädlich war (siehe Abb. 4.4). Durchgang 3 lässt keine klare Tendenz erkennen, da Etanercept bis Tag 9 nach Infektion protektiv, danach jedoch eher schädlich war (siehe Abb. 4.5).

Die Bestimmung der Parasitämien aus Versuchsdurchgang 1/3 (siehe Abb. 4.3) ergab keine signifikanten Unterschiede und damit keine Hinweise darauf, dass der signifikant protektive Effekt von Etanercept aus Versuchsdurchgang 1/3 (siehe Abb. 4.2) über Änderungen in der Parasitämie vermittelt wurde.

Infliximab zeigte in der Gesamtbetrachtung einen nur marginal, nicht signifikant schützenden Effekt (siehe Abb. 4.1). Im zweiten Versuchsdurchgang führte es zu einem verbesserten *Outcome* (siehe Abb. 4.4), dagegen war es in Durchgang 3 der Kontrollgruppe in Bezug auf die Vermeidung von EZM unterlegen (siehe Abb. 4.5).

Tab. 4.1: Cox-Regression für Intervention 1 Stunde vor Infektion

	<i>Hazard Ratio</i>	95% Konfidenzintervall für <i>Hazard Ratio</i>		p-Wert
		Unterer Wert	Oberer Wert	
Intervention				0,429
Intervention (Etanercept gegen PBS)	0,581	0,245	1,378	0,218
Intervention (Infliximab gegen PBS)	0,689	0,278	1,708	0,421
Versuchsdurchgang				0,467
Versuchsdurchgang (Nr. 2 gegen Nr. 1)	0,128	0,000	365,564	0,613
Versuchsdurchgang (Nr. 3 gegen Nr. 1)	0,214	0,003	18,148	0,496
Alter bei Infektion [Wochen]	3,557	0,065	195,292	0,535

Das Ergebnis der Cox-Regression (siehe Tab. 4.1) zeigt, dass die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Interventionsgruppen keinen signifikanten Effekt auf das *Outcome* hat, ebensowenig wie die Einflussfaktoren „Versuchsdurchgang“ und „Alter bei Infektion“. Damit kann der Interventionsart im vorliegenden Versuchssetting kein ausschlaggebender Effekt auf die Entwicklung von EZM zugeschrieben werden.

4.1.2 Applikation 5 Tage nach Infektion

Die Halbwertszeit von Etanercept beträgt im Menschen etwa 70 Stunden bzw. 3 Tage. Da sich EZM erst ca. 6 Tage nach Infektion manifestiert, besteht die Möglichkeit, dass zu diesem Zeitpunkt nur noch eine zu geringe Serumkonzentration in der Maus vorliegt, um einen etwaigen Effekt zu vermitteln. Aus diesem Grund wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die gleiche Dosis (500µg Etanercept ad 200µl PBS bzw. 200µl PBS in der Kontrollgruppe) an Tag 5 nach Infektion verabreicht wurde. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.6. Das *Outcome* der beiden Gruppen unterschied sich kaum, tendenziell war jedoch die Kontrollgruppe besser geschützt.

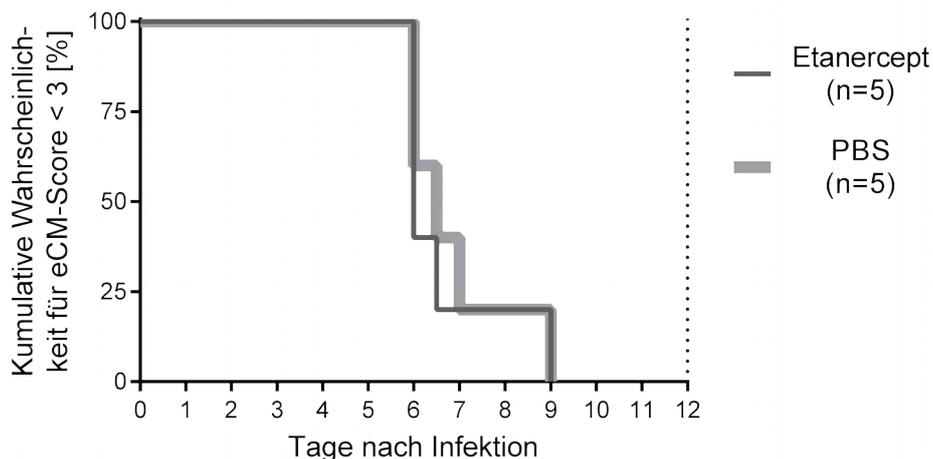


Abb. 4.6: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept 5 Tage nach Infektion

Weiblichen C57BL/6-Mäusen (Alter 7 Wochen) wurden 5 Tage nach Infektion 500µg Etanercept ad 200µl PBS bzw. in der Kontrollgruppe 200µl PBS i.p. gespritzt, wobei die Gruppenzuteilung zufällig und über die verschiedenen Käfige möglichst gleichmäßig vorgenommen wurde. Die Infektion erfolgte mit 10^5 *PbA*-infizierten Erythrozyten aus dem Blut einer Vorversuchsmaus ad 200µl PBS i.p. Die Mäuse wurden bis Tag 12 nach Infektion anhand des EZM-Scores auf neurologische Symptome hin beobachtet, ein Score ≥ 3 wurde als EZM gewertet. Mäuse mit aufgetretener EZM wurden getötet. An Tag 6 nach Infektion wurde ein Blutaussstrich zur Parasitämiebestimmung gewonnen. Nicht infizierte Mäuse wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Es wurde ein Versuch durchgeführt.

4.1.3 Applikation 1 Stunde vor und 5 Tage nach Infektion

Um zu überprüfen, ob die Neutralisation von TNF und $LT\alpha$, durchgeführt sowohl früh als auch spät während der Infektion, die Entwicklung von EZM verhindern kann, wurden die Anwendungszeitpunkte der vorherigen Experimente kombiniert und 500 μ g Etanercept ad 200 μ l PBS bzw. 200 μ l PBS in der Kontrollgruppe jeweils 1 Stunde vor sowie 5 Tage nach Infektion verabreicht. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.7. Es besteht nur ein sehr geringer Unterschied mit tendenziell protektivem Effekt von Etanercept. Damit führte die höchste Dosierung von Etanercept (2 x 500 μ g im Vergleich zu 1 x 500 μ g bei den anderen Experimenten) zur ausgeprägtesten EZM-Entwicklung, wobei diese Aussage nicht durch statistische Signifikanz belegt werden kann.

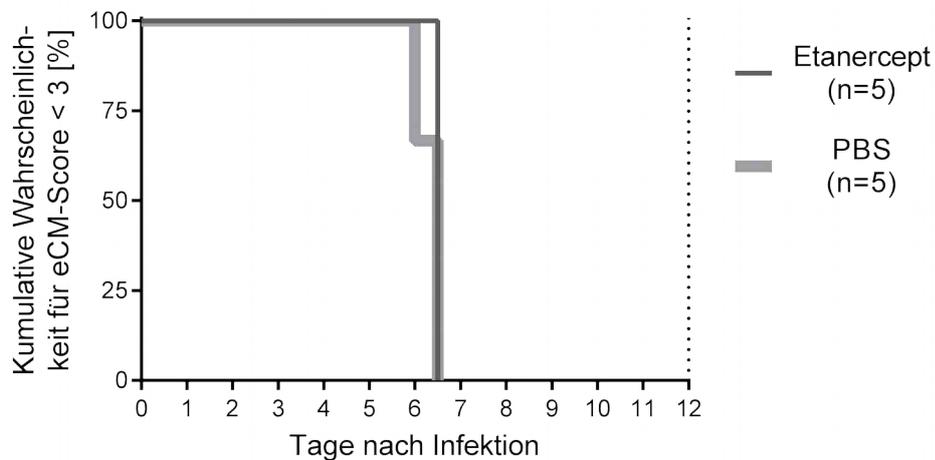


Abb. 4.7: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept 1 Stunde vor sowie 5 Tage nach Infektion

Weiblichen C57BL/6-Mäusen (Alter 8 Wochen) wurden 1 Stunde vor sowie 5 Tage nach Infektion 500 μ g Etanercept ad 200 μ l PBS bzw. in der Kontrollgruppe 200 μ l PBS i.p. gespritzt, wobei die Gruppenzuteilung zufällig und über die verschiedenen Käfige möglichst gleichmäßig vorgenommen wurde. Die Infektion erfolgte mit 10^5 *PbA*-infizierten Erythrozyten aus dem Blut einer Vorversuchsmaus ad 200 μ l PBS i.p. Die Mäuse wurden bis Tag 12 nach Infektion anhand des EZM-Scores auf neurologische Symptome hin beobachtet, ein $Score \geq 3$ wurde als EZM gewertet. Mäuse mit aufgetretener EZM wurden getötet. An Tag 6 nach Infektion wurde ein Blutausschick zur Parasitämiebestimmung gewonnen. Nicht infizierte Mäuse wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Es wurde ein Versuch durchgeführt.

4.1.4 Interventionsart versus Zeitpunkt der Intervention

Um zu untersuchen, welchen Einfluss auf die Entwicklung von EZM die Art der Intervention gegenüber dem Zeitpunkt der Intervention hat, wurde eine Cox-Regression durchgeführt (siehe Tab. 4.2).

Keine der untersuchten Variablen „Art der Intervention“, „Zeitpunkt der Intervention“ und „Alter der Maus“ hatte einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von EZM. Es fällt jedoch auf, dass der p-Wert für den Zeitpunkt der Intervention deutlich niedriger als derjenige für die Art der Intervention ist, bei *Hazard Ratios* von 2,2 bis 2,4. Dies deutet darauf hin, dass der durch die Injektion bedingte Stress zu einem späten Zeitpunkt (Tag 5 nach Infektion) stärker zur Entwicklung von EZM beiträgt als zu einem frühen (1 Stunde vor Infektion).

Tab. 4.2: Cox-Regression für Interventionsart gegen Zeitpunkt der Intervention

	<i>Hazard Ratio</i>	95% Konfidenzintervall für <i>Hazard Ratio</i>		p-Wert
		Unterer Wert	Oberer Wert	
Intervention				0,735
Intervention (Etanercept gegen PBS)	0,791	0,424	1,476	0,461
Intervention (Infliximab gegen PBS)	0,809	0,338	1,933	0,633
Zeitpunkt				0,057
Zeitpunkt (Tag 5 nach Infektion gegen 1 Stunde vor Infektion)	2,443	0,965	6,184	0,060
Zeitpunkt (1 Stunde vor und Tag 5 nach Infektion gegen 1 Stunde vor Infektion)	2,163	0,907	5,156	0,082
Alter bei Infektion [Wochen]	1,404	0,798	2,468	0,239

4.2 Zelltypspezifischer Knockout von TNFR1

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich eine Blockade der Wirkung von TNF / LT α *downstream* der in Kap. 4.1 untersuchten Neutralisierung im Serum auf die Entwicklung von EZM auswirkt. Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene Mauslinien mit konditionalem Knockout für TNFR1 infiziert und auf das Auftreten von EZM hin beobachtet.

4.2.1 Konditionaler TNFR1-Knockout auf T-Zellen

Geflochte CD4-Cre-Mäuse (C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} CD4-Cre) wurden mit *PbA* infiziert und anhand des EZM-Scores beobachtet. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt.

Die beiden Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant (siehe Abb. 4.8). Auch bei Betrachtung der einzelnen Versuchsdurchgänge gibt es keine signifikanten Abweichungen (siehe Abb. 4.9 und 4.10).

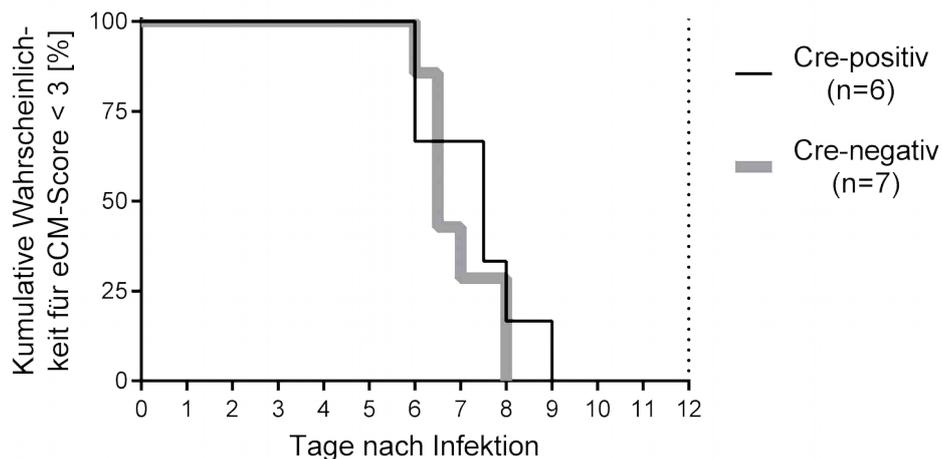


Abb. 4.8: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei T-Zell-spezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgänge 1,2 gepoolt

Weibliche Mäuse (C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} CD4-Cre^{+/-} mit aktivem Knockout und C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} CD4-Cre^{-/-} als Kontrollgruppe, es handelte sich um Wurfgeschwister) im Alter von 11-17 Wochen wurden mit 10⁵ *PbA*-infizierten Erythrozyten aus dem Blut einer Vorversuchsmaus ad 200 μ l PBS i.p. infiziert. Die Mäuse wurden bis Tag 12 nach Infektion anhand des EZM-Scores auf neurologische Symptome hin beobachtet, ein Score ≥ 3 wurde als EZM gewertet. Mäuse mit aufgetretener EZM wurden getötet. An Tag 6 nach Infektion wurde ein Blutausschick zur Parasitämiebestimmung gewonnen. Nicht infizierte Mäuse wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Gezeigt sind die gepoolten Daten zweier unabhängiger Durchführungen des Versuchs.

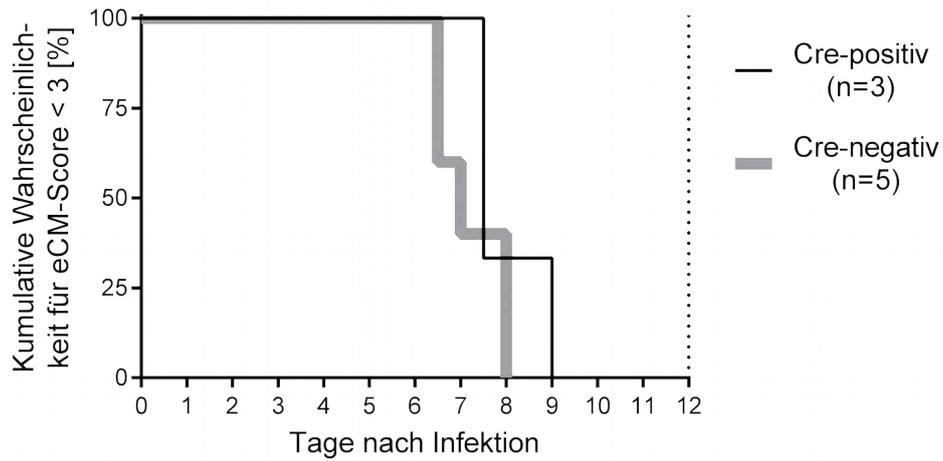


Abb. 4.9: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei T-Zell-spezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 1/2

Details siehe Abb. 4.8

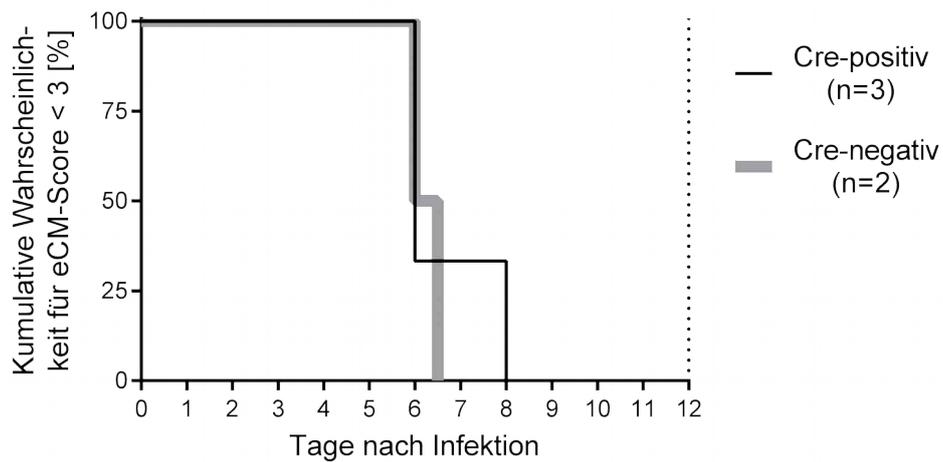


Abb. 4.10: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei T-Zell-spezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 2/2

Details siehe Abb. 4.8

Das Ergebnis der Cox-Regression (siehe Tab. 4.3) zeigt, dass keine der Variablen „Genotyp“, „Versuchsdurchgang“ und „Alter bei Infektion“ einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von EZM hatte. Die p-Werte bewegen sich auf ähnlichem Niveau, weshalb dem Genotyp und damit dem Knockout von TNFR1 auf T-Zellen in diesem Versuchssetting kein herausragender Effekt auf die Entwicklung von EZM zugeschrieben werden kann.

Tab. 4.3: Cox-Regression für CD4-Cre über alle Experimente

	<i>Hazard Ratio</i>	95% Konfidenzintervall für <i>Hazard Ratio</i>		p-Wert
		Unterer Wert	Oberer Wert	
Genotyp (Cre-positiv gegen Cre-negativ)	0,479	0,129	1,774	0,270
Versuchsdurchgang (Nr. 2 gegen Nr. 1)	0,000	0,000	37986,92	0,393
Alter bei Infektion [Wochen]	0,150	0,003	7,118	0,335

4.2.2 Konditionaler TNFR1-Knockout auf Leberzellen

Mäuse der AFP-Cre-Linie (C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} AFP-Cre) wurden mit *PbA* infiziert und das Auftreten von EZM beobachtet. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt.

Insgesamt entwickelten die Cre-positiven Tiere (d.h. die Tiere ohne TNFR1 auf Leberzellen) tendenziell weniger EZM und das eher zu einem späteren Zeitpunkt als die Cre-negativen, die Unterschiede sind jedoch gering und nicht signifikant (siehe Abb. 4.11). Bei Betrachtung der einzelnen Versuchsdurchgänge ist dieser Trend nicht durchgehend ausgeprägt: Im ersten und zweiten Durchgang hatten die Cre-positiven Tiere ein besseres *Outcome* an Tag 12 (siehe Abb. 4.12 und 4.13), dagegen galt dies im dritten Durchgang für die Cre-negativen Mäuse (siehe Abb. 4.14). Im vierten Durchgang war nur je eine Maus pro Gruppe verfügbar, keins der Tiere entwickelte EZM (siehe Abb. 4.15).

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Variablen „Genotyp“, „Versuchsdurchgang“ und „Alter bei Infektion“ auf das EZM-*Outcome* hatten, wurde eine Cox-Regression durchgeführt (siehe Tab. 4.4). Keine der Variablen hatte einen signifikanten Einfluss.

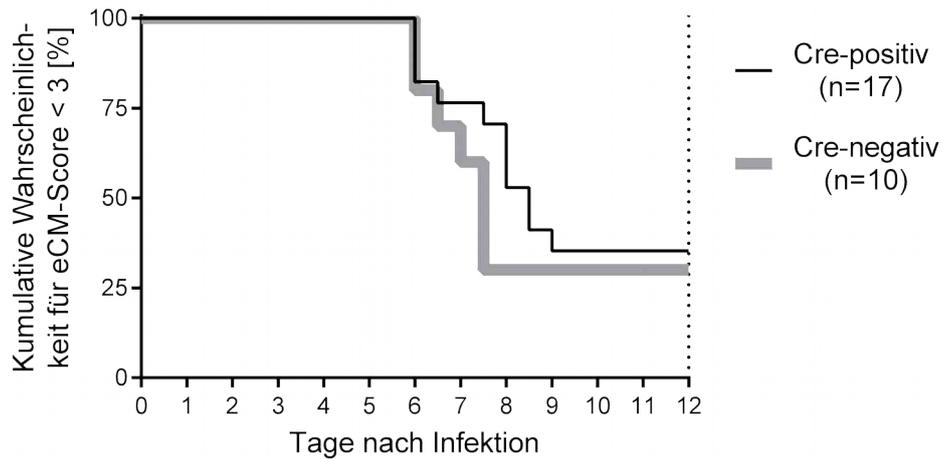


Abb. 4.11: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgänge 1,2,3,4 gepoolt

Weibliche Mäuse (C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} AFP-Cre^{+/-} (d.h. ohne TNFR1 auf Leberzellen) und C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} AFP-Cre^{-/-} als Kontrollgruppe, es handelte sich um Wurfgeschwister) im Alter von 6-13 Wochen wurden mit 10⁵ *PbA*-infizierten Erythrozyten aus dem Blut einer Vorversuchsmaus ad 200µl PBS i.p. infiziert. Die Mäuse wurden bis Tag 12 nach Infektion anhand des EZM-Scores auf neurologische Symptome hin beobachtet, ein Score ≥ 3 wurde als EZM gewertet. Mäuse mit aufgetretener EZM wurden getötet. An Tag 6 nach Infektion wurde ein Blutausstrich zur Parasitämiebestimmung gewonnen. Nicht infizierte Mäuse wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Gezeigt sind die gepoolten Daten von vier unabhängigen Durchführungen des Versuchs.

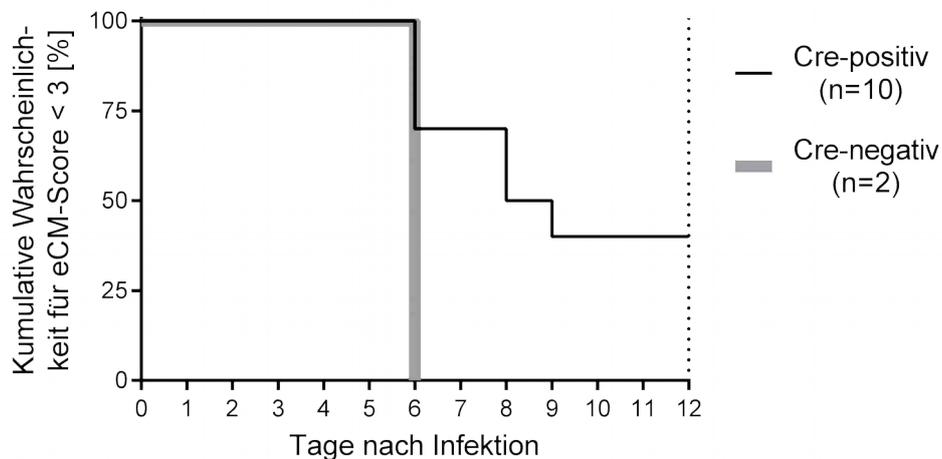


Abb. 4.12: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 1/4

Details siehe Abb. 4.11

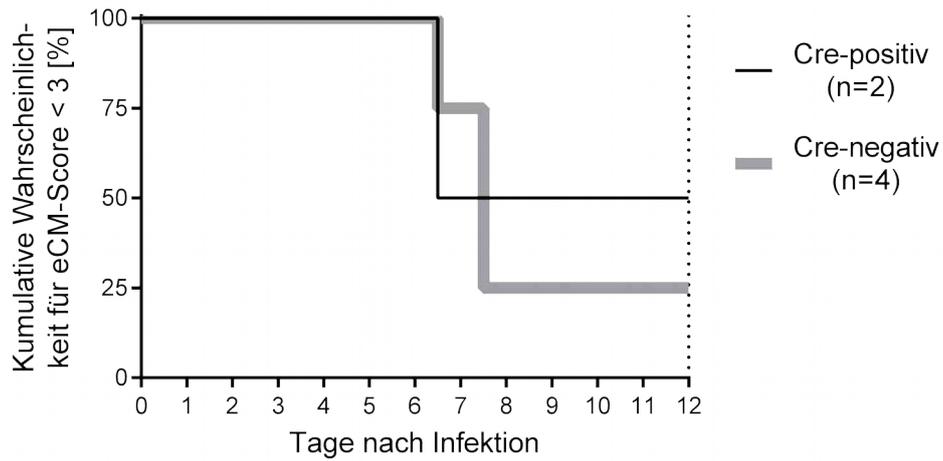


Abb. 4.13: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 2/4

Details siehe Abb. 4.11

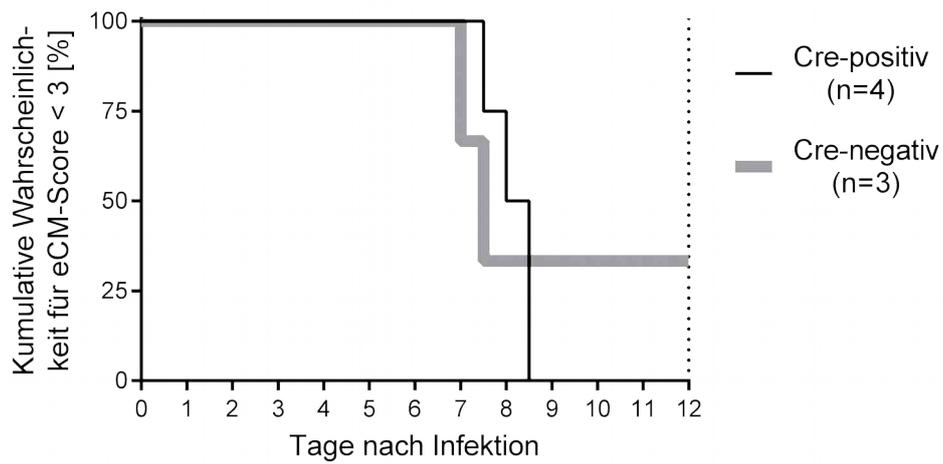


Abb. 4.14: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 3/4

Details siehe Abb. 4.11

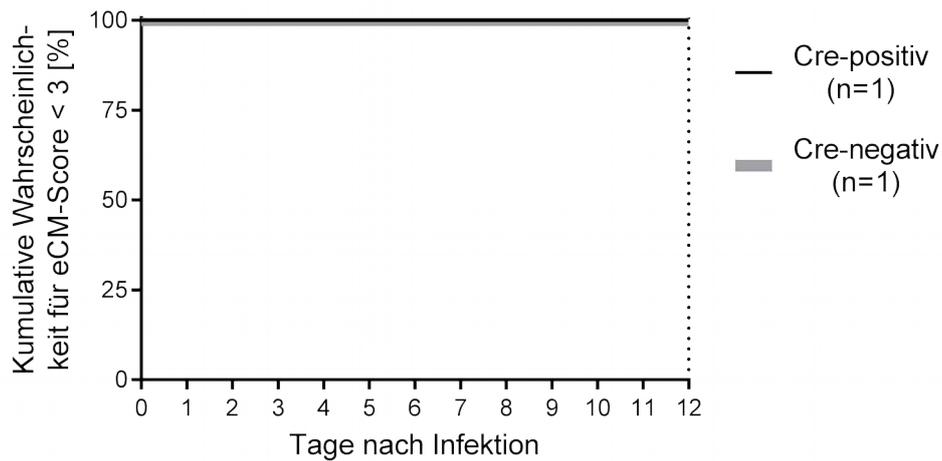


Abb. 4.15: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 4/4

Details siehe Abb. 4.11

Tab. 4.4: Cox-Regression für AFP-Cre über alle Experimente

	<i>Hazard Ratio</i>	95% Konfidenzintervall für <i>Hazard Ratio</i>		p-Wert
		Unterer Wert	Oberer Wert	
Genotyp (Cre-positiv gegen Cre-negativ)	0,463	0,132	1,626	0,229
Versuchsdurchgang				0,936
Versuchsdurchgang (Nr. 2 gegen Nr. 1)	0,749	0,159	3,526	0,715
Versuchsdurchgang (Nr. 3 gegen Nr. 1)	1,159	0,297	4,521	0,831
Versuchsdurchgang (Nr. 4 gegen Nr. 1)	0,000	0,000	.	0,986
Alter bei Infektion [Wochen]	1,188	0,947	1,491	0,136

4.2.3 Konditionaler TNFR1-Knockout auf myeloiden Zellen

Um zu untersuchen, ob TNFR1 auf Makrophagen und anderen myeloiden Zellen eine Rolle bei der Pathogenese von EZM spielt, wurden LysM-Cre-Mäuse (C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} LysM-Cre) mit *PbA* infiziert und auf das Auftreten von neurologischen Symptomen hin beobachtet. Insgesamt wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt.

Insgesamt unterschieden sich die Verläufe in den beiden Gruppen nicht signifikant (siehe Abb. 4.16). Das *Outcome* an Tag 12 war in der Cre-positiven Gruppe geringfügig besser. Bei Betrachtung der einzelnen Versuchsdurchgänge lässt sich kein eindeutiger Trend erkennen. Im ersten Durchgang entwickelten die Cre-positiven Tiere signifikant weniger EZM (siehe Abb. 4.17). Dagegen trat im zweiten und vierten Durchgang bei den Cre-negativen Tieren weniger EZM auf, dies war jedoch nicht signifikant (siehe Abb. 4.18 und 4.20). Im dritten Durchgang, der nur aus je einem Tier pro Gruppe bestand, entwickelten beide Tiere EZM (siehe Abb. 4.19).

Um zu untersuchen, welchen individuellen Einfluss die Variablen „Genotyp“, „Versuchsdurchgang“ und „Alter bei Infektion“ auf den EZM-Verlauf hatten, wurde eine Cox-Regression durchgeführt (siehe Tab. 4.5). Keine der Variablen hatte einen signifikanten Effekt auf das *Outcome*. Da der p-Wert für den Genotyp bei über 0,9 liegt, lässt sich für TNFR1 auf myeloiden Zellen im vorliegenden Versuchssetting keine kritische Rolle bei der Entwicklung von EZM feststellen.

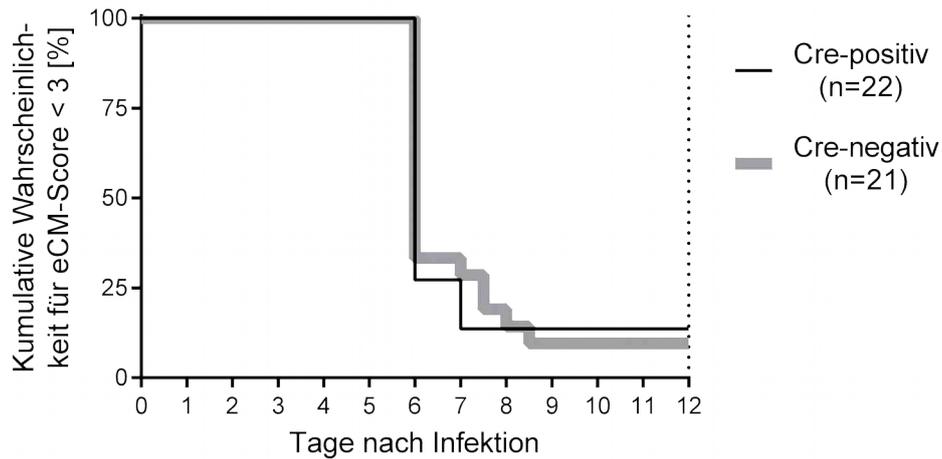


Abb. 4.16: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgänge 1,2,3,4 gepoolt

Weibliche Mäuse (C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} LysM-Cre^{+/-} mit aktivem Knockout und C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} LysM-Cre^{-/-} als Kontrollgruppe, es handelte sich um Wurfgeschwister) im Alter von 7-16 Wochen wurden mit 10⁵ (beim zweiten Durchgang mit 5x10⁵) *PbA*-infizierten Erythrozyten aus dem Blut einer Vorversuchsmaus ad 200µl PBS i.p. infiziert. Die Mäuse wurden bis Tag 12 nach Infektion anhand des EZM-Scores auf neurologische Symptome hin beobachtet, ein Score ≥ 3 wurde als EZM gewertet. Mäuse mit aufgetretener EZM wurden getötet. An Tag 6 nach Infektion wurde ein Blutausstrich zur Parasitämiebestimmung gewonnen. Nicht infizierte Mäuse wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Gezeigt sind die gepoolten Daten von vier unabhängigen Durchführungen des Versuchs.

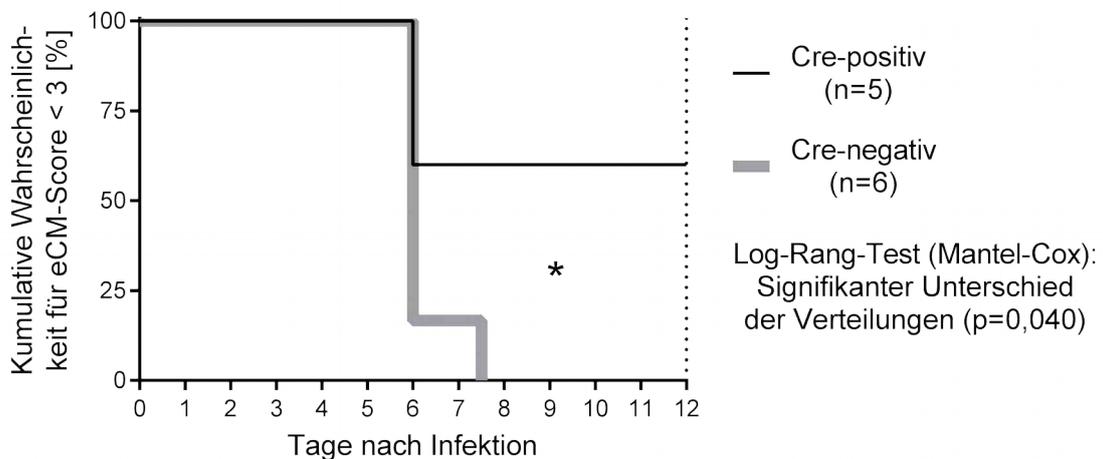


Abb. 4.17: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgang 1/4

Details siehe Abb. 4.16

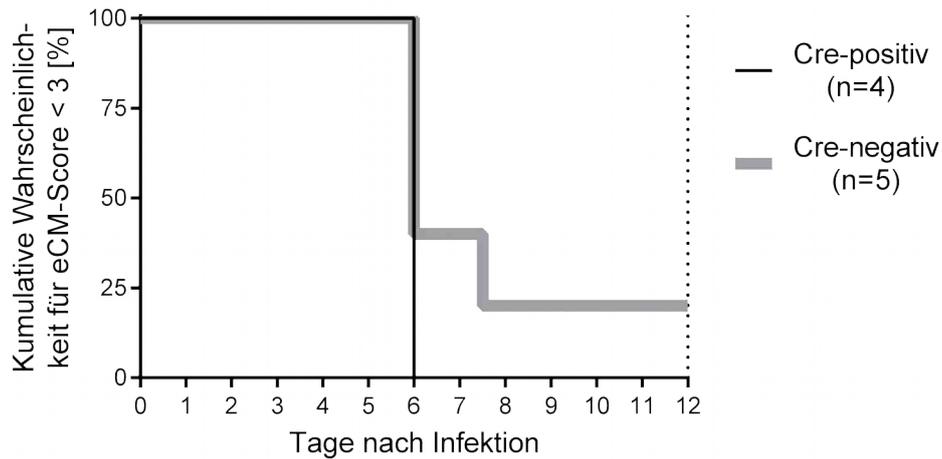


Abb. 4.18: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgang 2/4

Besonderheit: Bei diesem Durchgang wurden die Mäuse mit 5×10^5 (statt wie sonst mit 10^5) parasitierten Erythrozyten infiziert. Weitere Details siehe Abb. 4.16

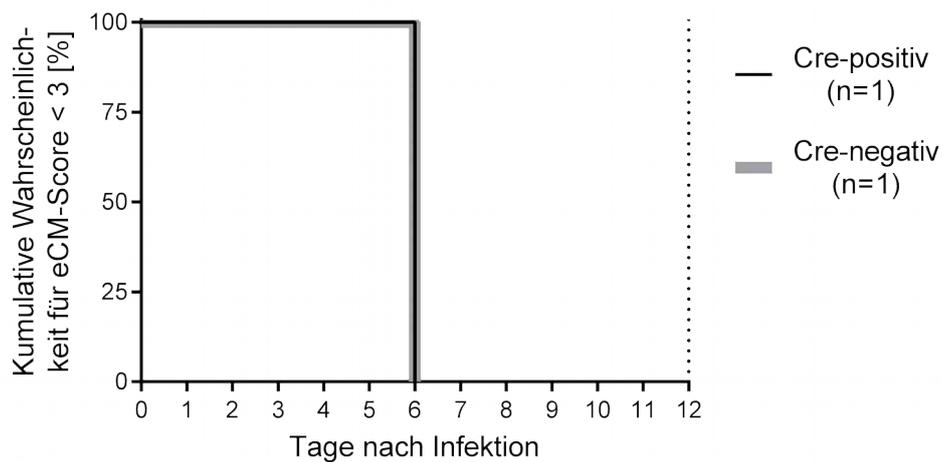


Abb. 4.19: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgang 3/4

Details siehe Abb. 4.16

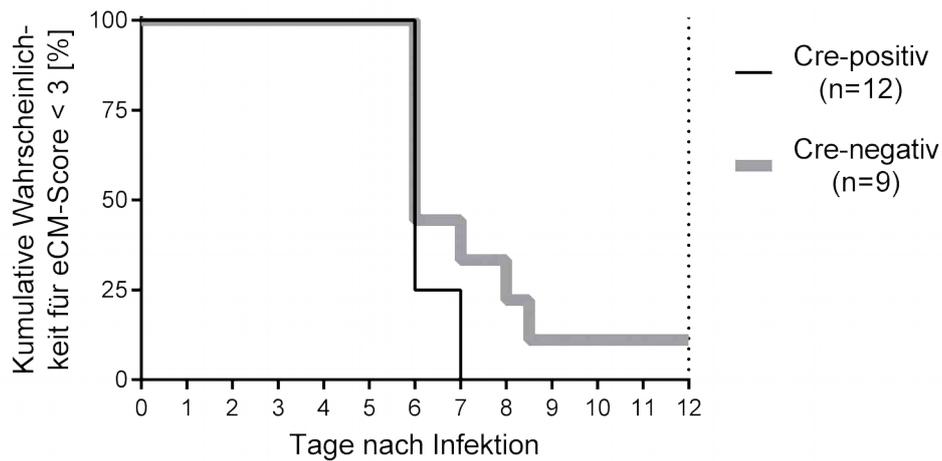


Abb. 4.20: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgang 4/4

Details siehe Abb. 4.16

Tab. 4.5: Cox-Regression für LysM-Cre über alle Experimente

	<i>Hazard Ratio</i>	95% Konfidenzintervall für <i>Hazard Ratio</i>		p-Wert
		Unterer Wert	Oberer Wert	
Genotyp (Cre-positiv gegen Cre-negativ)	1,041	0,535	2,024	0,906
Versuchsdurchgang				0,755
Versuchsdurchgang (Nr. 2 gegen Nr. 1)	0,408	0,000	2326230	0,910
Versuchsdurchgang (Nr. 3 gegen Nr. 1)	2,144	0,325	14,154	0,428
Versuchsdurchgang (Nr. 4 gegen Nr. 1)	1,633	0,399	6,686	0,495
Alter bei Infektion [Wochen]	1,191	0,137	10,335	0,874

4.2.4 Konditionaler TNFR1-Knockout auf Endothelzellen

Es ist bekannt, dass TNF die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf zerebralem Endothel hochreguliert und damit zu einer verstärkten Sequestration von infizierten Erythrozyten beitragen kann (Idro *et al.*, 2010). Daher sollte untersucht werden, inwiefern ein spezifischer Knockout von TNFR1 auf Endothelzellen sich auf die EZM-Inzidenz auswirkt. Dafür wurden Cdh5-Cre-Mäuse (C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} Cdh5-Cre) mit PbA infiziert und auf das Auftreten von EZM hin beobachtet. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt.

Insgesamt unterschieden sich die Verläufe nicht signifikant (siehe Abb. 4.21). An Tag 12 war das *Outcome* der Cre-positiven Gruppe minimal besser als das der Cre-negativen. Betrachtet man die einzelnen Durchgänge separat, war im ersten Versuch kaum ein Unterschied feststellbar, mit tendenziell abgemildertem Verlauf bei den Cre-negativen Mäusen (siehe Abb. 4.22). Im zweiten Durchgang hatten die Cre-positiven Tiere einen etwas vorteilhafteren Verlauf (siehe Abb. 4.23). Beim dritten Versuch hatten die Cre-positiven Tiere an Tag 12 nach Infektion ein deutlich besseres *Outcome*, dies war jedoch nicht signifikant (siehe Abb. 4.24). Im vierten Durchgang war die EZM bei den Cre-positiven Mäusen ebenfalls abgemildert, jedoch war auch dies nicht signifikant (siehe Abb. 4.25). Im Vergleich der Durchgänge fällt auf, dass die EZM-Inzidenz in der Cre-negativen Kontrollgruppe zum Teil deutlich variierte. Dies deutet auf weitere Einflussfaktoren hin.

Wiederum wurde zur separaten Analyse der Effekte der Variablen „Genotyp“, „Versuchsdurchgang“ und „Alter bei Infektion“ eine Cox-Regression durchgeführt (siehe Tab. 4.6). Diese zeigt, dass der Einfluss der Variable „Versuchsdurchgang“ hochsignifikant war ($p < 0,001$). Im Einzelnen unterschieden sich sowohl der dritte ($p < 0,001$) mit einem *Hazard Ratio* von 0,1 als auch der vierte Durchgang ($p = 0,014$) mit einem *Hazard Ratio* von 0,3 jeweils signifikant gegenüber dem ersten Durchgang. Diesem Ergebnis stehen die nicht signifikanten Einflüsse von Genotyp und Alter gegenüber.

Damit lässt sich TNFR1 auf Endothelzellen in diesem Versuchssetting keine kritische Rolle bei der Entstehung von EZM zuschreiben. Dagegen besteht ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Durchführungen des Experiments und der Entwicklung von EZM. Im Prinzip handelt es sich bei der Variable „Versuchsdurchgang“ um einen Surrogatparameter für verschiedene Einflussfaktoren wie die individuell aufgetaute

Charge an *PbA*-Stabilat oder die Konstitution der verwendeten Vorversuchsmaus. Damit gibt es bei dieser Anwendung des Mausmodells nicht ausreichend kontrollierte Variablen, die einer Untersuchung der eigentlichen Fragestellung im Wege stehen.

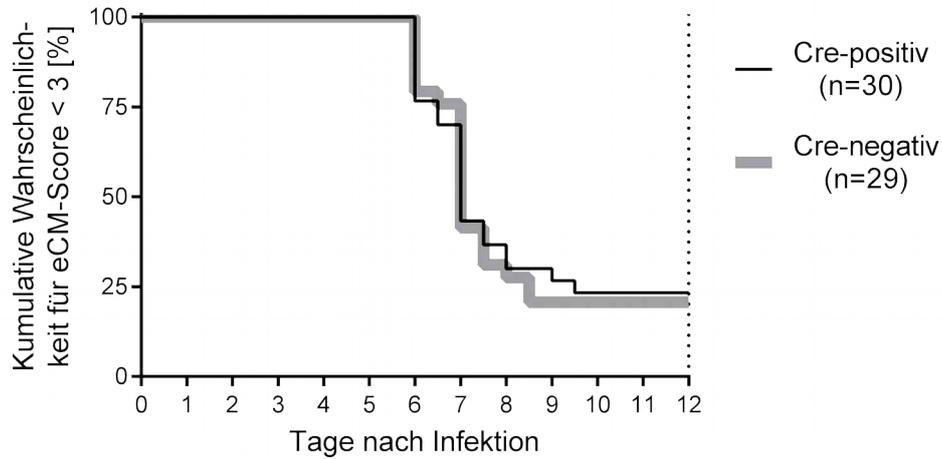


Abb. 4.21: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgänge 1,2,3,4 gepoolt

Weibliche Mäuse (C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} Cdh5-Cre^{+/+} mit aktivem Knockout und C57BL/6 TNFR1^{fl/fl} Cdh5-Cre^{-/-} als Kontrollgruppe, es handelte sich um Wurfgeschwister) im Alter von 7-11 Wochen wurden mit 10⁵ *PbA*-infizierten Erythrozyten aus dem Blut einer Vorversuchsmaus ad 200µl PBS i.p. infiziert. Die Mäuse wurden bis Tag 12 nach Infektion anhand des EZM-Scores auf neurologische Symptome hin beobachtet, ein Score ≥ 3 wurde als EZM gewertet. Mäuse mit aufgetretener EZM wurden getötet. An Tag 6 nach Infektion wurde ein Blutausstrich zur Parasitämiebestimmung gewonnen. Nicht infizierte Mäuse wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Gezeigt sind die gepoolten Daten von vier unabhängigen Durchführungen des Versuchs.

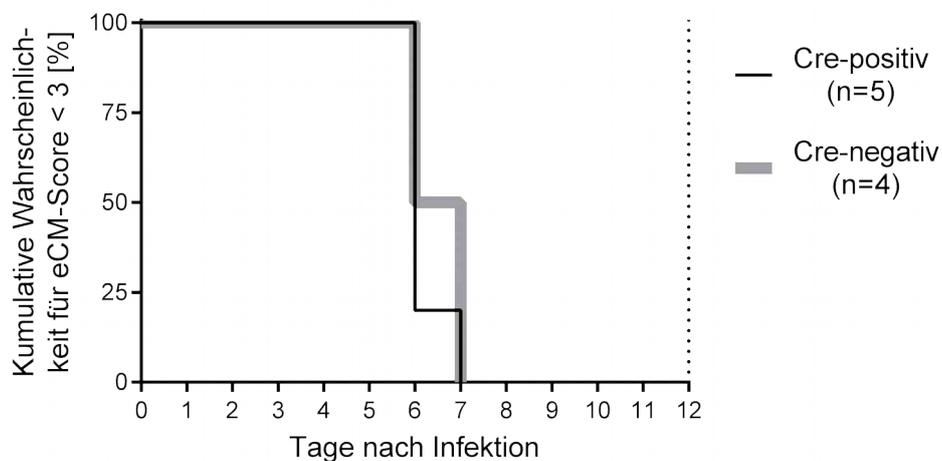


Abb. 4.22: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 1/4

Details siehe Abb. 4.21

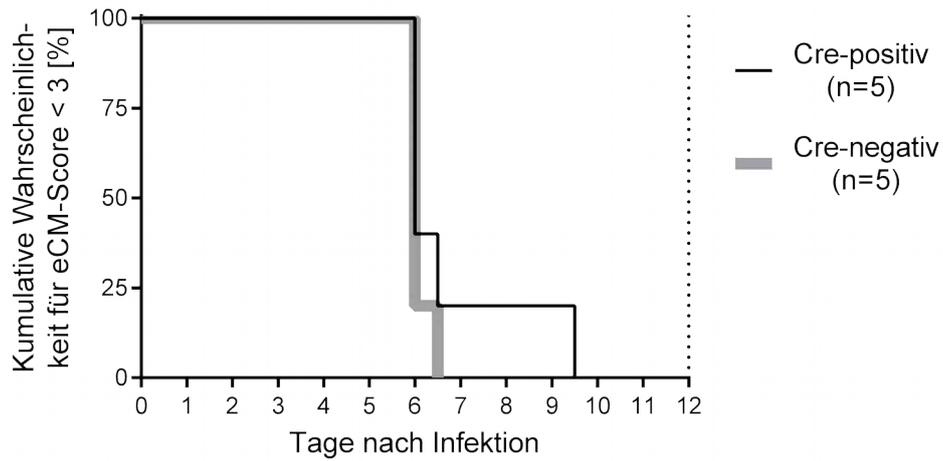


Abb. 4.23: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 2/4
 Details siehe Abb. 4.21

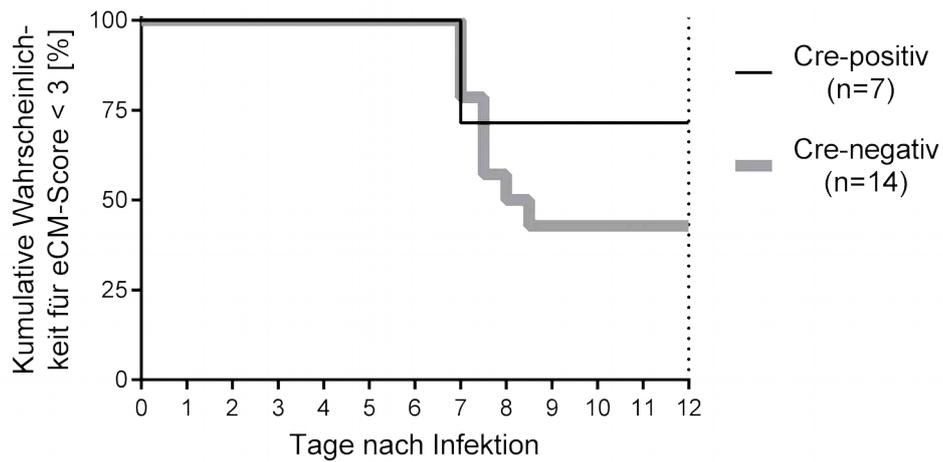


Abb. 4.24: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 3/4
 Details siehe Abb. 4.21

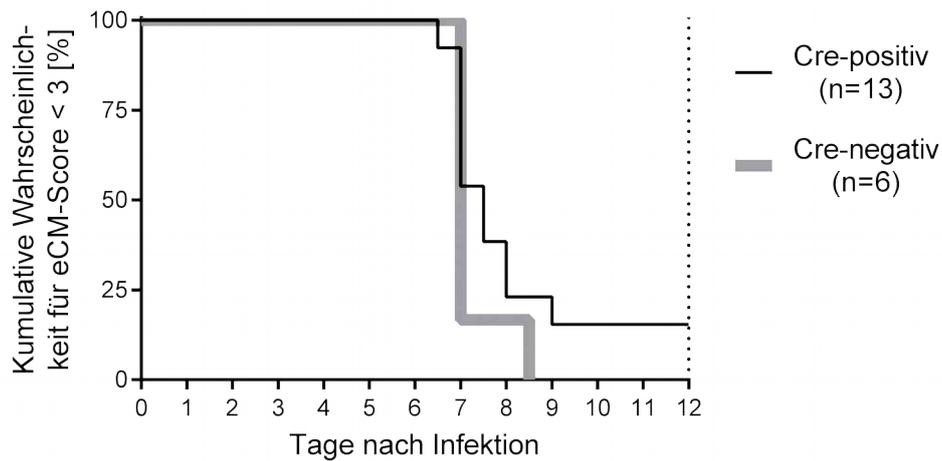


Abb. 4.25: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 4/4

Details siehe Abb. 4.21

Tab. 4.6: Cox-Regression für Cdh5-Cre über alle Experimente

	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall für Hazard Ratio		p-Wert
		Unterer Wert	Oberer Wert	
Genotyp (Cre-positiv gegen Cre-negativ)	0,652	0,347	1,224	0,183
Versuchsdurchgang				0,000
Versuchsdurchgang (Nr. 2 gegen Nr. 1)	1,066	0,379	2,995	0,904
Versuchsdurchgang (Nr. 3 gegen Nr. 1)	0,125	0,047	0,334	0,000
Versuchsdurchgang (Nr. 4 gegen Nr. 1)	0,327	0,133	0,800	0,014
Alter bei Infektion [Wochen]	0,835	0,463	1,507	0,549

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In einer explorativen Studie, basierend auf dem *PbA-C57BL/6*-Mausmodell für zerebrale Malaria (EZM), wurden verschiedene Eingriffe ins *TNF-Signalling* hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Inzidenz von EZM untersucht.

Im ersten Teil wurde die Rolle löslicher TNFR-Liganden (TNF, $LT\alpha$) adressiert. Dafür wurden die TNF-Blocker Etanercept und Infliximab i.p. zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und/oder nach der Infektion verabreicht. Es konnte insgesamt kein signifikanter Effekt auf die EZM-Entwicklung nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil wurde unter Verwendung von konditionalen Knockoutmäusen die Bedeutung von TNFR1 auf vier verschiedenen Zelltypen (T-Zellen, Leberzellen, myeloide Zellen, Endothelzellen) im Modell evaluiert. Auch hier konnten in der Gesamtbetrachtung keine signifikanten Auswirkungen auf die EZM-Inzidenz beobachtet werden.

5.2 Verwendetes Mausmodell

Der Erforschung der Pathogenese der humanen zerebralen Malaria (HZM) sind enge Grenzen gesetzt: Das Gehirn als solches entzieht sich durch seine anatomische Lage dem einfachen Zugang und ist aufgrund seiner hohen Bedeutung für die Gesundheit und der Unberechenbarkeit der Folgen eines Eingriffs invasiven Untersuchungen zu Forschungszwecken nicht zugänglich. Auch die Anwendung nicht-invasiver bildgebender Diagnostik lässt bislang nur begrenzte Schlussfolgerungen zu. Experimentelle therapeutische Verfahren bei Erkrankten sind aus ethischen Gründen nur sehr eingeschränkt zulässig. Die systematische Exploration der pathologischen Prozesse und die gezielte Suche nach Interventionsmöglichkeiten sind damit am Menschen nicht möglich.

Aus diesem Grund haben sich auf dem Gebiet der experimentellen Erforschung von zerebraler Malaria Mausmodelle etabliert. Die Infektion mit dem für die vorliegende Arbeit verwendeten Parasitenstamm *Plasmodium berghei* ANKA wird als bestes verfügbares Modell angesehen (De Souza *et al.*, 2010), es wurden stets susceptible C57BL/6-Mäuse verwendet. Typischerweise treten 6-8 Tage nach der Infektion

neurologische Symptome auf, die sich im weiteren Verlauf bis hin zum Koma verstärken und zum Tod des Versuchstiers führen. Laut Versuchsprotokoll wurden die Mäuse nach Eintritt der ersten Anzeichen für einen schweren Verlauf mit EZM getötet.

5.3 Vergleichbarkeit der Pathogenese von HZM und EZM

Eine wichtige Frage ist, inwiefern die pathologischen Vorgänge im murinen Modell der zerebralen Malaria (EZM) denen bei der humanen zerebralen Malaria (HZM) gleichen und inwieweit EZM damit ein geeignetes Modell für die Erforschung der HZM darstellt. 2010 stellten White *et al.* die Relevanz und den Nutzen des Mausmodells infrage und kritisierten, dass einer wachsenden Zahl von Publikationen zum *PbA*-Modell eine sinkende Zahl humaner Studien zur zerebralen Malaria gegenüberstünde. Als Hauptargument für eine fehlende Vergleichbarkeit nennen sie histopathologische Unterschiede in Bezug auf die Sequestration und Infiltration in zerebralen Gefäßen. Bei HZM liege stets eine Sequestration infizierter Erythrozyten vor, wohingegen bei EZM in erster Linie eine Infiltration durch Leukozyten zu beobachten sei (White *et al.*, 2010). Dieser Argumentation widersprechen Riley *et al.* sowie Franke-Fayard *et al.* Sie führen einerseits an, dass eine Sequestration von parasitierten Erythrozyten im Rahmen der EZM durchaus zu beobachten sei und merken andererseits an, dass nicht abschließend geklärt sei, ob Sequestration bei der HZM tatsächlich die Hauptursache der Komplikation ist. Damit rechtfertigen sie eine weitere Verwendung des Mausmodells und heben den möglichen Nutzen hervor (Franke-Fayard *et al.*, 2010; Riley *et al.*, 2010).

In einer kürzlich erschienenen Publikation argumentieren Frevert und Nacer, dass bei HZM und EZM *upstream* im Krankheitsgeschehen voneinander verschiedene Mechanismen wirkten, die jedoch beide in endothelialer Aktivierung und dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke resultierten und als gemeinsame Endstrecke zu Hirnödemen, intrakraniellen Hochdruck, Kompression des Hirnstammes und Tod durch Atemstillstand führten (Frevert & Nacer, 2014).

5.4 TNF-Signalling und zerebrale Malaria

Auf die allgemeine Bedeutung von TNF-Signalling im Kontext einer Malariainfektion wird in Kap. 1.6.4 (S. 17) eingegangen. Im Folgenden soll der aktuelle Kenntnisstand zu TNF-Signalling im Rahmen von zerebraler Malaria erörtert werden.

5.4.1 TNFR-Liganden bei zerebraler Malaria

Die Rollen der Zytokine TNF und LT α in der Pathogenese der zerebralen Malaria sind bislang nur unzureichend verstanden. Ein schwerer Krankheitsverlauf, bis hin zur HZM, scheint mit der Konzentration von TNF im Serum von Patienten positiv zu korrelieren (Kwiatkowski *et al.*, 1990; Kinra & Dutta, 2013). Für die Sequestration von parasitierten Erythrozyten bei der HZM ist die Interaktion zwischen erythrozytärem PfEMP-1 und endothelständigen Molekülen wie ICAM-1 verantwortlich (Engwerda *et al.*, 2002). TNF reguliert die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen im Gehirn herauf und sorgt so für eine vermehrte Adhäsion von parasitierten Erythrozyten (Idro *et al.*, 2010). Unter der Annahme, dass HZM durch die Sequestration infizierter Erythrozyten ausgelöst wird, wie von MacPherson *et al.* postuliert (MacPherson *et al.*, 1985), legt dies nahe, dass TNF ursächlich für das Auftreten zerebraler Malaria verantwortlich ist. Dieser Annahme widersprechen die Anhänger der Zytokintheorie, nach der zerebrale Malaria unabhängig von der Sequestration parasitierter Erythrozyten direkt durch proinflammatorische Zytokine verursacht wird (Clark & Rockett, 1994), allerdings mit der ähnlichen Schlussfolgerung, dass starke TNF-Freisetzung zu zerebraler Malaria führt.

Tatsächlich konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die Applikation TNF-neutralisierender Antikörper die Entwicklung von EZM verhindert (Grau *et al.*, 1987; Jacobs *et al.*, unveröffentlicht). Im Widerspruch dazu steht jedoch die Beobachtung, dass bei TNF^{-/-}-Knockoutmäusen EZM wie bei Wildtypmäusen unverändert auftritt, wohingegen LT α ^{-/-}-Knockoutmäuse vollständig vor EZM geschützt sind (Engwerda *et al.*, 2002), ein Befund, der LT α als möglichen Mediator zerebraler Malaria in den Fokus rückt. Tatsächlich führt LT α *in vitro* ebenso wie TNF zu einer Hochregulation von ICAM-1 (Pober *et al.*, 1987). Allerdings ist bekannt, dass LT α ^{-/-}-Knockoutmäuse auch in ihrer TNF-Produktion beeinträchtigt sind, was sich auf eine gestörte Transkription des TNF-Gens bei unmittelbarer Nachbarschaft zum ausgeschalteten Gen für LT α zurückführen lässt (Liepinsh *et al.*, 2006). Möglicherweise ist daher erst ein kombinierter Knockout von TNF und LT α ausreichend, um die EZM-Pathologie zu stoppen.

In einer Studie mit 41 an zerebraler Malaria erkrankten Kindern in Gambia, die zum Teil einen monoklonalen Antikörper gegen TNF (CB0006) erhielten, zeigte sich keine signifikante Auswirkung auf die Mortalität (Kwiatkowski *et al.*, 1993). Eine weitere Studie in Gambia, bei der 610 Kinder mit HZM entweder einen monoklonalen

Antikörper gegen TNF (B-C7) oder ein Placebo erhielten, ergab ebenfalls keinen verändernden Effekt des TNF-Antikörpers auf das Auftreten von EZM, jedoch war die Entwicklung neurologischer Folgeschäden gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (van Hensbroek *et al.*, 1996). Van Hensbroek *et al.* vermuteten, dass der Antikörper zu einer Retention von TNF im Kreislauf und damit zu einer verlängerten TNF-Wirkung führte.

Um das Wissen zu den Rollen von TNF und $LT\alpha$ zu erweitern, wurden in dieser Arbeit die TNF-neutralisierenden Agenzien Infliximab sowie Etanercept im Mausmodell verabreicht und ihr Einfluss auf das Auftreten von EZM hin untersucht. Beide Substanzen sind als Medikamente für den Einsatz am Menschen zugelassen.

5.4.1.1 Neutralisierung von TNF durch Infliximab *in vivo*

Infliximab (Handelsname Remicade) ist ein chimärer, human-muriner, monoklonaler IgG1-Antikörper, der an TNF, nicht aber an $LT\alpha$, bindet und dessen Wirkung neutralisiert. Er wird klinisch u.a. bei rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) und ankylosierender Spondylitis eingesetzt. Die Halbwertszeit im Menschen beträgt ca. 8 bis 9,5 Tage. Die höchste empfohlene Einzeldosis für den Menschen beträgt 5mg pro Kilogramm Körpergewicht (MSD, 2014). In dieser Arbeit wurden den Mäusen Einzeldosen von 500 μ g Infliximab verabreicht, was etwa 25mg pro Kilogramm Körpergewicht und damit dem 5-fachen der humanen Dosis entspricht (Annahme: Das Gewicht einer Maus beträgt 20g).

Die Gabe von Infliximab eine Stunde vor der Infektion der Mäuse mit *PbA* führte zu keiner signifikanten Veränderung in der Inzidenz von EZM. Dies ist gegensätzlich zu den Beobachtungen von Grau *et al.* und Jacobs *et al.* (Grau *et al.* 1987, Jacobs *et al.*, unveröffentlicht). In der Schlussfolgerung ist TNF im angewandten *Versuchssetting* nicht kritisch in der Entstehung von EZM involviert.

Bei der Verabreichung von Infliximab in Mausmodellen handelt es sich um ein etabliertes Vorgehen, mit dem in einer Vielzahl von Forschungsbereichen gearbeitet wird (Queiroz-Junior *et al.*, 2012). ELISA-basierte Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Infliximab zeigen, dass der Antikörper sowohl humanes als auch (mit etwas geringerer Affinität) murines TNF bindet. *In vivo* zeigen sich im DSS-Kolitismodell nach Gabe von Infliximab signifikant mildere Verläufe (Lopetuso *et al.*,

2013). Gleichwohl gibt es Autoren, die die wirksame Neutralisierung von TNF durch Infliximab in der Maus anzweifeln und auf andere Agenzien, u.a. Etanercept, verweisen (Filler *et al.*, 2007; Kruglov & Nedospasov, 2012).

5.4.1.2 Neutralisierung von LT α und TNF durch Etanercept *in vivo*

Bei Etanercept (Handelsname Enbrel) handelt es sich um ein dimeres Fusionsprotein aus der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des humanen TNFR2 und dem Fc-Teil von humanem IgG₁, das in CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary*, Eierstockzelllinie des Chinesischen Hamsters) rekombinant hergestellt wird. Sein Einsatzgebiet überschneidet sich mit dem von Infliximab, erstreckt sich jedoch nicht auf die Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Die Halbwertszeit im Menschen liegt bei etwa 70 Stunden. Für die maximale Dosierung werden 50mg pro Woche angegeben (Pfizer, 2014). Das entspricht etwa 0,67mg pro Kilogramm Körpergewicht (Annahme: Das Gewicht eines Menschen beträgt 75kg). In dieser Arbeit wurden den Mäusen Einzeldosen von 500 μ g Etanercept gespritzt, was in etwa 25mg pro Kilogramm Körpergewicht und damit dem 37,5-fachen der humanen Dosis entspricht (Annahme: Das Gewicht einer Maus beträgt 20g).

Da TNFR2 sowohl TNF wie auch LT α bindet, neutralisiert Etanercept, im Gegensatz zu Infliximab, beide Zytokine (Murdaca *et al.*, 2012). Dies gilt auch für das Mausmodell, in dem Etanercept wirksam LT α und TNF neutralisiert (Markey *et al.*, 2009; Kruglov & Nedospasov, 2012; Ye *et al.*, 2014). Aus diesem Grund eignet es sich, um zu überprüfen, ob LT α oder TNF, alleine oder in Kombination, im vorliegenden Mausmodell eine kritische Funktion bei der Entwicklung von EZM haben.

Die Ergebnisse der Experimente zeigen, dass die Gabe von Etanercept weder zu einem frühen (eine Stunde vor der Infektion mit *PbA*) noch zu einem späten Zeitpunkt (fünf Tage nach der Infektion) einen signifikanten Effekt auf die Entwicklung experimenteller zerebraler Malaria haben. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Engwerda *et al.*, die anhand von Experimenten mit LT α ^{-/-}-Knockoutmäusen eine signifikante Rolle von LT α bei der Entstehung von EZM beobachteten (Engwerda *et al.*, 2002). Selbst wenn bei diesen Mäusen wie zuvor erwähnt auch die TNF-Produktion beeinträchtigt war und erst die kombinierte Abwesenheit von LT α und TNF die protektive Wirkung vermittelte, steht dies im Widerspruch zu dieser Arbeit, da Etanercept ebenfalls zur gleichzeitigen Neutralisierung beider Zytokine führt.

Die vorliegende Arbeit widerlegt daher für das verwendete Mausmodell die Hypothese, dass LT α oder TNF alleine oder in Kombination kritisch für die Entstehung von EZM sind.

5.4.2 TNFR bei zerebraler Malaria

Die Zytokine TNF und LT α wirken auf die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. Daneben gibt es weitere Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen im TNF-*Signalling*-System, beschrieben in Kap. 1.6.3 (S. 15), auf die an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen wird.

Lucas *et al.* untersuchten 1997 anhand von entsprechenden Knockoutmäusen, welcher der beiden TNF-Rezeptoren kritisch für die Entwicklung experimenteller zerebraler Malaria ist. Sie konnten zeigen, dass ein TNFR2-Knockout die Tiere vor EZM schützte, wohingegen ein Knockout von TNFR1 keine Veränderung in der EZM-Suszeptibilität mit sich brachte (Lucas, Lou, *et al.*, 1997).

Dieses Ergebnis wirft jedoch einen scheinbaren Widerspruch auf. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Neutralisierung von löslichem TNF (sTNF) die Entstehung von EZM verhindert (Grau *et al.* 1987, Jacobs *et al.*, unveröffentlicht). Gleichzeitig ist bekannt, dass sTNF mit höherer Affinität an TNFR1 bindet und TNFR2 möglicherweise nicht vollständig aktivieren kann (Grell *et al.*, 1995; Wajant *et al.*, 2003). Um das Wissen zu der Rolle der TNFR bei experimenteller zerebraler Malaria zu erweitern, wurden in dieser Arbeit zelltypspezifische TNFR1-Knockoutmäuse auf ihre Suszeptibilität für EZM hin untersucht.

5.4.2.1 Zelltypspezifische TNFR1-Knockouts

In dieser Arbeit wurden Mäuse mit konditionalem TNFR1-Knockout auf T-Zellen, Leberzellen, myeloiden Zellen und Endothelzellen mit *PbA* infiziert und auf das Auftreten von EZM hin beobachtet. Es konnte in keinem Fall eine signifikante Abweichung in der EZM-Inzidenz nachgewiesen werden. Daher kann geschlossen werden, dass die Anwesenheit von TNFR1 auf keinem der genannten Zelltypen für die Entwicklung der Komplikation kritisch ist. Dies unterstützt unabhängig von Lucas *et al.* (Lucas, Lou, *et al.*, 1997) die Theorie, dass TNFR1 in der Pathogenese der EZM keine wichtige Rolle spielt.

Wird die Wirkung von TNF im Mausmodell durch Gabe eines neutralisierenden Antikörpers unterbunden, zeigen sich eine vorübergehende Wachstumsverzögerung sowie eine Atrophie von Thymus, Milz und Lymphknoten (Kossodo *et al.*, 1992). Um solche makroskopischen Veränderungen mit schwer beurteilbaren immunologischen Konsequenzen bzw. reduzierter Vergleichbarkeit zu vermeiden, stellt die zelltypspezifische und damit zielgenaue Unterbrechung des TNF-Signallings auf Rezeptorebene einen grundsätzlich vielversprechenden Ansatz dar.

5.4.3 Limitationen

5.4.3.1 Statistik

Für diese Studie wurde ein exploratives Vorgehen gewählt. Bei den durchgeführten Experimenten wurden pro Versuchswiederholung verhältnismäßig kleine Fallzahlen (typischerweise $n \approx 5$ pro Gruppe) verwendet. Daher besteht die Möglichkeit, dass subtile Effekte, die sich erst bei einer größeren Fallzahl als signifikant demaskieren würden, übersehen werden.

Bei der Anwendung der Cox-Regression wurde die Annahme zugrundegelegt, dass die Einflüsse verschiedener Variablen auf die EZM-Inzidenz über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant waren.

5.4.3.2 Versuchsdesign

In dieser Arbeit wurden die Mäuse nach Vorgabe des Versuchsprotokolls getötet, sobald die ersten Anzeichen für einen schweren Verlauf mit EZM auftraten, um ein weiteres Leiden der Tiere zu vermeiden. Diese Vorgehensweise stellt eine Limitation dar, denn die durchgeführten Interventionen können so stets nur bezüglich ihrer Wirkung auf die anfängliche Ausprägung von EZM untersucht werden, nicht aber hinsichtlich möglicher Auswirkungen auf den Verlauf der Komplikation. Es besteht daher das Risiko, dass solche späteren Effekte, die möglicherweise von großer therapeutisch-praktischer Relevanz sein könnten, übersehen werden. Deshalb muss klar darauf hingewiesen werden, dass die gewonnenen Daten, aufbereitet in einem Kaplan-Meier-Diagramm, nicht das tatsächliche „Überleben“ darstellen, sondern die „EZM-Inzidenz“, definiert als $\text{EZM-Score} \geq 3$. Bei der Durchsicht einschlägiger Publikationen fällt jedoch auf, dass eine sprachliche Unterscheidung nicht durchgehend eingehalten wird. So bezeichnet der Begriff „survival“ in einer aktuellen Publikation von He *et al.* (He *et al.*, 2014) das Überleben im eigentlichen Sinne, wohingegen Maglinao *et al.* (Maglinao *et al.*, 2013) mit dem gleichen Begriff die Zeit bis zum Eintreten klinischer Symptome

beschreiben, nach der die Mäuse getötet werden. Dies suggeriert bei oberflächlicher Betrachtung eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse, die jedoch möglicherweise nicht besteht und daher zu Fehlannahmen führen kann. Die vorliegende Arbeit vermeidet daher den Begriff „Überleben“ und legt die präzisere Bezeichnung „EZM-Inzidenz“ zugrunde.

5.4.3.3 Nicht kontrollierte Variablen

Es fällt auf, dass in einigen Fällen die EZM-Inzidenz in der Kontrollgruppe zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen stark variierte, z.B. in der Gruppe der Cre-negativen Tiere bei Endothelspezifischem TNFR1-Knockout (siehe Kap. 4.2.4, S. 57). Hier ergab die Cox-Regression einen hochsignifikanten Einfluss der Variable „Versuchsdurchgang“. Bei dieser Variable handelt es sich um einen Surrogatparameter für unterschiedliche Einflussfaktoren wie die individuell aufgetaute Charge an *PbA*-Stabilat, die unmittelbare Herkunft, das Stresslevel und das Mikrobiom der infizierten Mäuse, aber auch das Alter und die Abstammung der verwendeten Vorversuchsmaus, die Identität der betreuenden Versuchstierpfleger oder Veränderungen im Tagesrhythmus der Tiere, z.B. weil im Rahmen anderer Experimente ein mit Lichteinfall verbundener Zutritt zum gemeinsam genutzten Tierraum während der „Nachtphase“ nötig wurde. Offenbar konnten diese Einflussfaktoren im Rahmen dieser Arbeit nicht in allen Fällen „kontrolliert“, d.h. konstant gehalten werden, wodurch die Untersuchung der eigentlichen Fragestellung erschwert wird.

Interessanterweise finden sich auch beim Vergleich jüngerer Publikationen zum *PbA*-C57BL/6-Mausmodell in den Wildtyp-Kontrollgruppen gewisse Unterschiede in der EZM-Inzidenz. So verstarben bei He *et al.* bis Tag 11 nach der Infektion 40 von 40 C57BL/6-Mäusen, die mit 10^6 *PbA*-infizierten Erythrozyten infiziert wurden (He *et al.*, 2014), wohingegen bei Baccarella *et al.* zum gleichen Zeitpunkt und bei gleicher *PbA*-Infektionsdosis noch etwa 10% von 63 C57BL/6-Mäusen lebten, wobei dieser Anteil fast unverändert bis Tag 18 bestehen blieb (Baccarella *et al.*, 2014). Für diesen Unterschied könnten ähnliche, nicht kontrollierte Einflussfaktoren verantwortlich sein.

5.5 Ausblick

Der Kenntnisstand zur Pathogenese der zerebralen Malaria bleibt ein kompliziertes Puzzle aus Einzelbeobachtungen in Mensch und Maus, deren Vergleichbarkeit kontinuierlich hinterfragt werden muss. Diese Arbeit konnte zeigen, dass im murinen Modell der EZM die Neutralisierung der Zytokine TNF und $LT\alpha$ durch die TNF-

Blocker Infliximab bzw. Etanercept nicht vor der Komplikation schützte, ein Ergebnis, das überrascht, da Engwerda *et al.* zeigen konnten, dass $LT\alpha^{-/-}$ -Knockoutmäuse deutlich vor EZM geschützt sind (Engwerda *et al.*, 2002). Etanercept ist wie Infliximab ein klinisch zugelassenes Medikament, mit dem bereits jetzt viele Menschen über einen langen Zeitraum wegen chronischer Krankheiten therapiert werden. Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit nicht auf einen möglichen therapeutischen Effekt von Etanercept bei HZM hinweisen (und dies aufgrund der Unterschiede zwischen EZM und HZM generell sorgfältig hinterfragt werden müsste), könnten Patienten, die sich aus anderen Gründen einer Therapie mit Etanercept unterziehen, in Bezug auf die Anfälligkeit für Malaria im Allgemeinen und HZM im Speziellen beobachtet werden. Möglicherweise ließen sich so Hinweise auf den Effekt einer Etanercept-vermittelten $LT\alpha$ -Neutralisierung im Kontext der Malariainfektion beim Menschen finden. In der Folge könnten Empfehlungen generiert werden, z.B. ob der Aufenthalt in einem Malariaendemiegebiet bei gleichzeitiger Etanercept-Behandlung ein erhöhtes Risiko für eine schwere Verlaufsform einer Malariainfektion mit sich bringt oder ob dieses Risiko gesenkt wird (wie sich auf Basis der genannten Studie von Engwerda *et al.* spekulieren ließe). Tatsächlich existiert ein *Case Report* über eine 45-jährige Patientin, die aufgrund einer rheumatoiden Arthritis wöchentliche Infliximab-Injektionen erhielt, sich auf einer Urlaubsreise mit *P. falciparum* infizierte und eine hohe Parasitämie sowie zerebrale Malaria entwickelte (Geraghty *et al.*, 2007).

Hinsichtlich des *PbA-C57BL/6*-Mausmodells könnte es für zukünftige Studien von Vorteil sein, die allgemeinen Einflussfaktoren auf die EZM-Inzidenz systematisch zu untersuchen, um diese Variablen besser kontrollieren zu können und ein verbessertes Mausmodell der EZM zu etablieren.

Die weitere Erforschung der Pathogenese von humaner zerebraler Malaria, die in den Endemiegebieten eine verbreitete Todesursache darstellt, ist dringend notwendig, um Patienten besser behandeln zu können. Große Hoffnungen richten sich auch auf die Entwicklung wirkungsvoller präventiver Maßnahmen wie einer Schutzimpfung gegen Malaria, die eine drastische Reduktion der Infektionsrate in greifbare Nähe rücken könnte.

6 Zusammenfassung

Malaria ist eine gefährliche Infektionskrankheit, die jedes Jahr viele Menschenleben kostet. Angesichts des zunehmenden Auftretens von Resistenzen gegen die verfügbaren Medikamente erscheint die Entwicklung eines Impfstoffs dringend erforderlich, doch trotz starker Bemühungen war diese bislang nicht erfolgreich bzw. die Impfung nicht praxistauglich. Von besonderer Bedeutung ist die Infektion mit dem Erreger *P. falciparum*, die zu vielfältigen Komplikationen, unter anderem zur zerebralen Malaria (HZM), führen kann und damit akut lebensbedrohlich ist. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich die Vorgänge bei der zerebralen Malaria im *PbA-C57BL/6*-Mausmodell (EZM) durch Eingriffe ins TNF-*Signalling* beeinflussen lassen.

In einem ersten Teil wurde die Rolle der TNF-Rezeptor-Liganden Tumornekrosefaktor (TNF) und Lymphotoxin- α (LT α) untersucht. Dafür wurden die zur Behandlung von rheumatoider Arthritis klinisch zugelassenen TNF-Blocker Infliximab, ein human-muriner monoklonaler Antikörper, der TNF neutralisiert, und Etanercept, ein human-humanes Fusionsprotein aus der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) und dem Fc-Teil von IgG₁, das sowohl TNF als auch LT α neutralisiert, im Mausmodell verabreicht. Es zeigte sich, dass die EZM-Inzidenz nach keiner der Interventionen signifikant verändert war, sodass anzunehmen ist, dass weder TNF noch LT α eine kritische Funktion in der EZM-Pathogenese innehaben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die zelltypspezifische Rolle von TNFR1 im Kontext der EZM-Entstehung evaluiert. Dabei kamen konditionale TNFR1-Knockoutmäuse mit C57BL/6-Hintergrund, basierend auf dem Cre/loxP-System, zum Einsatz. Es wurden vier verschiedene Mauslinien untersucht (jeweils TNFR1^{fl/fl} und Expression von Cre unter gewebespezifischem Promotor): CD4-Cre mit T-Zell-spezifischem Knockout, AFP-Cre mit leberspezifischem Knockout, LysM-Cre mit spezifischem Knockout in myeloiden Zellen und Cdh5-Cre mit endothelspezifischem Knockout. Bei keiner der untersuchten Mauslinien konnte ein signifikanter Unterschied in der EZM-Inzidenz nachgewiesen werden, sodass TNFR1 auf den genannten Zelltypen keine kritische Rolle in der EZM-Entstehung zugewiesen werden kann.

Durch die Anwendung der Cox-Regression ergaben sich Hinweise auf Einflussvariablen, die im Modell nicht kontrolliert wurden. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen statistische Limitationen durch die relativ geringe Fallzahl sowie bekannte Unterschiede in der Pathogenese von HZM und EZM berücksichtigt werden.

7 Abstract

Malaria is a dangerous infectious disease killing many people every year. When considering the increasing number of parasites with resistance against available medication, the development of a vaccine seems crucial. However, despite intensive research in this field, no vaccination with large scale feasibility has been established. Of particular interest is the infection with *P. falciparum* as it yields manifold complications, including cerebral malaria (human cerebral malaria / HCM), and therefore poses an acute threat to life. The aim of this study is to evaluate how the pathogenetic mechanisms of cerebral malaria in the *PbA*-C57BL/6 mouse model (experimental cerebral malaria / ECM) could be influenced by manipulating TNF signalling.

In the first part, the role of the TNF receptor ligands tumor necrosis factor (TNF) and Lymphotoxin- α (LT α) was investigated. Therefore, the TNF-neutralizing agent Infliximab, a human-murine monoclonal antibody that is clinically approved for the treatment of rheumatoid arthritis, and Etanercept, a human-human fusion protein consisting of the extracellular ligand binding domain of TNF receptor 2 (TNFR2) and the Fc fragment of IgG₁, which neutralizes both TNF and LT α , was administered in the mouse model. The incidence of ECM did not significantly change from either of the interventions, suggesting that neither TNF nor LT α are crucial for the development of ECM.

In the second part of the study, the cell type-specific role of TNF receptor 1 (TNFR1) was evaluated in the context of ECM development. Conditional TNFR1 knockout mice of C57BL/6 background were used applying the Cre/loxP system. Four different strains were screened (each TNFR1^{fl/fl} and expressing Cre under tissue-specific promotor): CD4-Cre with T cell-specific knockout, AFP-Cre with liver cell-specific knockout, LysM-Cre with specific knockout for myeloid cells and Cdh5-Cre with endothelium-specific knockout. None of the different strains showed a significant difference in ECM incidence when compared to their Cre-negative littermates, indicating that TNFR1 on those cell types is not crucial for the development of ECM.

Employment of the Cox regression in the data analysis suggests there might be non-controlled variables in the mouse model. When interpreting the results of this study, statistical limitations due to a relatively small number of cases have to be taken into account, as well as known differences in the pathogenesis of HCM and ECM.

8 摘要 (abstract in Chinese / traditional characters)

瘧疾是一種危險且具有傳染性的疾病，每年有很多人因為此疾病而死亡。當我們注意到近來具有抗藥性的寄生蟲的數量大量增加時，疫苗的發展就成為一個針對該疾病措施中的重要關鍵。即使已經有很多相關研究存在於這個領域裡，仍然沒有大規模的可行的疫苗接種建立。特別是 *P. falciparum* 感染，因為它會導致多種併發症，包含腦瘧疾 (腦型瘧疾/ECM) 而因此對生命產生威脅。這個研究目的在於評估在控制 TNF 信號 (TNF Signalling) 下，腦瘧疾在 *PbA-C57BL/6* 老鼠模型 (實驗性腦瘧疾/ECM) 的發病機制會有什麼樣的影響。

第一部份主要在探討兩種和 TNF 受體結合的配體 (TNF-receptor-ligands): 腫瘤壞死因子 (TNF) 和淋巴毒素- α (LT α)。因此，使用抑制 TNF 中和制劑 Infliximab，一種老鼠的抗人體單株抗體，又稱單克隆抗體，已可以使用在臨床治療類風濕性關節炎。同時，使用另外一種試用在老鼠模型的藥，Etanercept，可以中和 TNF 和 LT α 。Etanercept 是一種人體對人體融合蛋白，由抑制 TNF 受體 2 (TNFR2) 的胞外配體鍵結域以及 IgG1 的 Fc 片段組成。在這兩組實驗裡，兩組 ECM 的發病率並沒有因為使用藥物而有太顯著的變化，說明了 TNF 和 LT α 對 ECM 發生並沒有太大的影響。

第二部分的研究著重於了解，在不同細胞類型上移除 TNF 受體 1 (TNFR1)，ECM 實驗會有怎樣的變化。這研究使用 Cre/loxP 系統來制訂條件性的 TNFR1 knockout C57BL/6 背景的老鼠。有 4 種不同的細胞具體類型被檢視：CD4-Cre 之 T 細胞具體類型 knockout，AFP-Cre 之肝細胞具體類型 knockout，LysM-Cre 之髓細胞具體類型 knockout，以及 Cdh5-Cre 之血管內皮細胞具體類型 knockout。結果顯示這 4 種不同的實驗組和同窩 Cre 負型 (一樣父母，沒有 Cre)，ECM 發病率並沒有太顯著的變化。結果說明 TNFR1 在這 4 種具體類型下對 ECM 發生沒有太大的影響。

實驗結果最後使用了 Cox 回歸統計方法分析。結果顯示在老鼠模型裡可能有無法控制的變數。由於案例的數量相對不高且 HCM 和 ECM 有不同的發病機制，所以在討論此研究的分析結果時要將這兩個因素考慮進去。

9 摘要 (abstract in Chinese / simplified characters)

疟疾是一种危险且具有传染性的疾病，每年有很多人因为此疾病而死亡当我们注意到近来具有抗药性的寄生虫的数量大量增加时，疫苗的发展就成为一个针对该疾病措施中的重要关键。即使已经有很多相关研究存在于这个领域里，仍然没有大规模的可行的疫苗接种建立。特别是 *P. falciparum* 感染，因为它会导致多种并发症，包含脑疟疾 (脑型疟疾/ECM) 而因此对生命产生威胁。这个研究目的在于评估在控制 TNF 信号 (TNF Signalling) 下，脑疟疾在 *PbA-C57BL/6* 老鼠模型 (实验性脑疟疾/ECM) 的发病机制会有什么样的影响。

第一部份主要在探讨两种和 TNF 受体结合的配体 (TNF-receptor-ligands): 肿瘤坏死因子 (TNF) 和淋巴毒素 $-\alpha$ (LT α)。因此，使用抑制 TNF 中和制剂 Infliximab，一种老鼠的抗人体单株抗体，又称单克隆抗体，已可以使用在临床治疗类风湿性关节炎。同时，使用另外一种试用在老鼠模型的药，Etanercept，可以中和 TNF 和 LT α 。Etanercept 是一种人体对人体融合蛋白，由抑制 TNF 受体 2 (TNFR2) 的胞外配体键结域以及 IgG1 的 Fc 片段组成。在这两组实验里，两组 ECM 的发病率并没有因为使用药物而有太显著的变化，说明了 TNF 和 LT α 对 ECM 发生并没有太大的影响。

第二部分的研究着重于了解，在不同细胞类型上移除 TNF 受体 1 (TNFR1)，ECM 实验会有怎么样的变化。这研究使用 Cre/loxP 系统来制订条件性的 TNFR1 knockout C57BL/6 背景的老鼠。有 4 种不同的细胞具体类型被检视：CD4-Cre 之 T 细胞具体类型 knockout，AFP-Cre 之肝细胞具体类型 knockout，LysM-Cre 之髓细胞具体类型 knockout，以及 Cdh5-Cre 之血管内皮细胞具体类型 knockout。结果显示这 4 种不同的实验组和同窝 Cre 负型 (一样父母，没有 Cre)，ECM 发病率并没有太显著的变化。结果说明 TNFR1 在这 4 种具体类型下对 ECM 发生没有太大的影响。

实验结果最后使用了 Cox 回归统计方法分析。结果显示在老鼠模型里可能有无法控制的变数。由于案例的数量相对不高且 HCM 和 ECM 有不同的发病机制，所以在讨论此研究的分析结果时要将这两个因素考虑进去。

10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
∞	unendlich
Abb.	Abbildung
ACT	artemisininbasierte Kombinationstherapie (englisch: artemisinin-based combination therapy)
ADAM17	eine Metalloproteinase (englisch: a disintegrin and metalloproteinase 17), synonym mit TACE
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
AMA-1	Oberflächenprotein von <i>Plasmodium</i> (englisch: apical membrane antigen 1)
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
bp	Basenpaare
Ca ²⁺	zweifach positiv geladenes Calcium-Ion
CD	immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen (englisch: cluster of differentiation)
Cdh5	Cadherin 5
CHO	Eierstockzelllinie des Chinesischen Hamsters (englisch: chinese hamster ovary)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPS	Immunisierung mit Chemoprophylaxe und Sporozoiten (englisch: chemoprophylaxis and sporozoite immunization)
CR-1	Komplementrezeptor 1 (englisch: complement receptor 1)
Cre	Cre-Rekombinase (englisch: causes recombination)
CSP	Oberflächenprotein der Sporozoiten (englisch: circumsporozoite protein)
d.h.	das heißt
DC	Dendritische Zelle (englisch: dendritic cell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	Dextran-Natriumsulfat (englisch: dextran sodium sulfate)

EBA	Proteine von <i>Plasmodium</i> (englisch: erythrocyte-binding antigens)
eCM	experimentelle zerebrale Malaria (englisch: experimental cerebral malaria), synonym mit EZM
ELISA	ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (englisch: enzyme-linked immunosorbent assay)
EPCR	endotheliales Oberflächenprotein (englisch: endothelial protein C receptor)
<i>et al.</i>	et alia
EZM	experimentelle zerebrale Malaria, synonym mit eCM
fl	von loxP-Erkennungssequenzen flankiert, „gefloxt“
g	Gramm
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositolphosphat
h	Stunde
HR	<i>hazard ratio</i>
HSPG	ein Typ von Proteoglykanen (englisch: highly sulfated heparan sulfate proteoglycans)
HVEM	ein Rezeptor (englisch: herpes virus entry mediator)
HZM	humane zerebrale Malaria
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	(unter anderem) endothelial exprimiertes Oberflächenprotein (englisch: intercellular adhesion molecule 1)
IgG	Immunglobulin G
IKD	intrakranieller Druck
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LIGHT	ein Protein (englisch: homologous to LT, inducible expression, competes with herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D for HSV entry mediator (HVEM), a receptor expressed on T lymphocytes)
loxP	bestimmte DNA-Sequenzen (englisch: locus of X-over P1)
LPS	Lipopolysaccharid
LSA-1	Leberphaseantigen von <i>Plasmodium</i> (englisch: liver-stage antigen 1)
LSEC	ein Typ von Endothelzellen (englisch: liver sinusoidal endothelial cells)
LT α	Lymphotoxin- α
LT $\alpha_1\beta_2$	Heterotrimer aus einem Molekül LT α und zwei Molekülen LT β
LT $\alpha_2\beta_1$	Heterotrimer aus zwei Molekülen LT α und einem Molekül LT β

LT α_3	Lymphotoxin- α -Homotrimer
LT β	Lymphotoxin- β
LT β R	Lymphotoxin- β -Rezeptor
LysM	Lysozym M
MAP-Kinasen	Proteinkinasen (englisch: mitogen activated protein kinases)
MBC	B-Gedächtniszelle (englisch: memory B cell)
mg	Milligramm
Mg ²⁺	zweifach positiv geladenes Magnesium-Ion
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (englisch: major histocompatibility complex)
min	Minute
min.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol/Liter
MSP-1	Oberflächenprotein der Merozoiten (englisch: merozoite surface protein 1)
mTNF	membrangebundener Tumornekrosefaktor (englisch: membrane-bound TNF)
MVEC	mikrovasculäre Endothelzellen (englisch: microvascular endothelial cells)
n	Anzahl
NF- κ B	ein Transkriptionsfaktor (englisch: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
p	Wahrscheinlichkeit (englisch: probability)
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
<i>PbA</i>	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
<i>PfEMP-1</i>	Proteine von <i>Plasmodium falciparum</i> (englisch: <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane proteins 1)
<i>PfMC-2TM</i>	polymorphes Oberflächenprotein von <i>Plasmodium falciparum</i> (englisch: <i>Plasmodium falciparum</i> Maurer's clefts two transmembrane protein)
<i>PfRh</i>	Proteine von <i>Plasmodium falciparum</i> (englisch: <i>Plasmodium</i>

	<i>falciparum</i> reticulocyte-binding homolog)
PLAD	Rezeptordomänen (englisch: pre-ligand-binding assembly domains)
RAS	durch Strahlung behandelte Sporoziten (englisch: irradiation-attenuated sporozoites)
RIFIN	polymorphes Oberflächenprotein von <i>Plasmodium falciparum</i> (englisch: repetitive interspersed family proteins)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: ribonucleic acid)
s	Sekunde
STEVOR	polymorphes Oberflächenprotein von <i>Plasmodium falciparum</i> (englisch: subtelomeric variable open reading frame proteins)
sTNF	löslicher Tumornekrosefaktor (englisch: soluble tumor necrosis factor)
SURFIN	polymorphes Oberflächenprotein von <i>Plasmodium falciparum</i> (englisch: surface-associated interspersed gene family proteins)
Tab.	Tabelle
TACE	eine Metalloproteinase (englisch: TNF- α -converting enzyme), synonym mit ADAM17
TAE-Puffer	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (Bakterium)
TBE-Puffer	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
T _{H1}	T-Helferzelle Typ 1 (englisch: T helper cell type 1)
T _{H2}	T-Helferzelle Typ 2 (englisch: T helper cell type 2)
TNF	Tumornekrosefaktor (englisch: tumor necrosis factor)
TNF ₃	Tumornekrosefaktor-Homotrimer
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TRAP	Oberflächenprotein der Sporoziten (englisch: thrombospondin-related anonymous protein)
Troy	ein Rezeptor (englisch: TNFR superfamily member 19)
u.a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: World Health Organization)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Exemplarisches Bild eines Gels nach Elektrophorese.....	29
Abb. 3.2: Exemplarisches Bild eines Gels nach Elektrophorese.....	30
Abb. 3.3: Digitalisierter Blutausstrich einer mit <i>PbA</i> infizierten Maus.....	32
Abb. 3.4: Quelltext des Makros zur Auszählung digitalisierter Blutausstriche.....	33
Abb. 3.5: Versuchsschema.....	36
Abb. 4.1: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept oder Infliximab 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgänge 1,2,3 gepoolt.....	40
Abb. 4.2: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgang 1/3.....	41
Abb. 4.3: Parasitämie nach Gabe von Etanercept 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgang 1/3.....	41
Abb. 4.4: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept oder Infliximab 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgang 2/3.....	42
Abb. 4.5: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept oder Infliximab 1 Stunde vor Infektion: Versuchsdurchgang 3/3.....	42
Abb. 4.6: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept 5 Tage nach Infektion.....	44
Abb. 4.7: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM nach Gabe von Etanercept 1 Stunde vor sowie 5 Tage nach Infektion.....	45
Abb. 4.8: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei T-Zell-spezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgänge 1,2 gepoolt.....	47
Abb. 4.9: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei T-Zell-spezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 1/2.....	48
Abb. 4.10: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei T-Zell-spezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 2/2.....	48
Abb. 4.11: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgänge 1,2,3,4 gepoolt.....	50
Abb. 4.12: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 1/4.....	50
Abb. 4.13: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 2/4.....	51
Abb. 4.14: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 3/4.....	51

Abb. 4.15: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei leberspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 4/4.....	52
Abb. 4.16: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgänge 1,2,3,4 gepoolt.....	54
Abb. 4.17: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgang 1/4.....	54
Abb. 4.18: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgang 2/4.....	55
Abb. 4.19: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgang 3/4.....	55
Abb. 4.20: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei spezifischem Knockout von TNFR1 auf myeloiden Zellen: Versuchsdurchgang 4/4.....	56
Abb. 4.21: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgänge 1,2,3,4 gepoolt.....	58
Abb. 4.22: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 1/4.....	58
Abb. 4.23: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 2/4.....	59
Abb. 4.24: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 3/4.....	59
Abb. 4.25: Kaplan-Meier-Diagramm zur Inzidenz von EZM bei endothelspezifischem Knockout von TNFR1: Versuchsdurchgang 4/4.....	60

12 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Liganden und Rezeptoren des TNF- <i>Signalling</i> -Systems.....	16
Tab. 3.1: <i>Score</i> zur Beurteilung des Auftretens experimenteller zerebraler Malaria.....	36
Tab. 3.2: Beispiel für das Ergebnis einer Cox-Regression.....	38
Tab. 4.1: Cox-Regression für Intervention 1 Stunde vor Infektion.....	43
Tab. 4.2: Cox-Regression für Interventionsart gegen Zeitpunkt der Intervention.....	46
Tab. 4.3: Cox-Regression für CD4-Cre über alle Experimente.....	49
Tab. 4.4: Cox-Regression für AFP-Cre über alle Experimente.....	52
Tab. 4.5: Cox-Regression für LysM-Cre über alle Experimente.....	56
Tab. 4.6: Cox-Regression für Cdh5-Cre über alle Experimente.....	60

13 Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. (2012) *Cellular and Molecular Immunology*. 7. Auflage. Philadelphia: Saunders.

Ademolue, T. W. and Awandare, G. A. (2017) Evaluating antidisease immunity to malaria and implications for vaccine design. *Immunology* 153(4):423–434.

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. and Spiegel, F. W. (2012) The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59(5):429–514.

Aggarwal, B. B., Gupta, S. C. and Kim, J. H. (2011) Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119(3):651–665.

Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V and Harkins, R. N. (1985) Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 260(4):2345–2354.

Al-Lamki, R. S. and Mayadas, T. N. (2015) TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. *Kidney Int.* 87(2):281–296.

Alva, J. A., Zovein, A. C., Monvoisin, A., Murphy, T., Salazar, A., Harvey, N. L., Carmeliet, P. and Iruela-Arispe, M. L. (2006) VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev. Dyn.* 235(3):759–767.

Amino, R., Giovannini, D., Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J.-F., Prévost, M.-C., Ishino, T., Yuda, M. and Ménard, R. (2008) Host Cell Traversal Is Important for Progression of the Malaria Parasite through the Dermis to the Liver. *Cell Host Microbe* 3(2):88–96.

Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F. and Menard, R. (2006) Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat. Med.* 12(2):220–224.

Baccarella, A., Huang, B., Fontana, M. and Kim, C. (2014) Loss of Toll-like receptor 7 alters cytokine production and protects against experimental cerebral malaria. *Malar. J.* 13(1):354.

Baer, K., Klotz, C., Kappe, S. H. I., Schnieder, T. and Frevert, U. (2007) Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS*

Pathog. 3(11):1651–1668.

Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A. B., Van Rooijen, N., Schnieder, T. and Frevert, U. (2007) Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cell. Microbiol.* 9(2):397–412.

Bannister, L. H. and Dluzewski, A. R. (1990) The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells* 16(2–3):257–292.

Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S. and Mitchell, G. H. (2000) A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages. *Parasitol. Today* 16(10):427–433.

Bano, N., Romano, J. D., Jayabalasingham, B. and Coppens, I. (2007) Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. *Int. J. Parasitol.* 37(12):1329–1341.

Baum, J., Maier, A. G., Good, R. T., Simpson, K. M. and Cowman, A. F. (2005) Invasion by *P. falciparum* Merozoites Suggests a Hierarchy of Molecular Interactions. *PLoS Pathog.* 1(4):299–309.

Bender, R. and Lange, S. (2007) Was ist der p-Wert? *Dtsch Med Wochenschr* 132:e15–e16.

Bijker, E. M., Bastiaens, G. J. H., Teirlinck, A. C., van Gemert, G.-J., Graumans, W., van de Vegte-Bolmer, M., Siebelink-Stoter, R., Arens, T., Teelen, K., Nahrendorf, W., Remarque, E. J., Roeffen, W., Jansens, A., Zimmerman, D., Vos, M., van Schaijk, B. C. L., Wiersma, J., van der Ven, A. J. A. M., de Mast, Q., van Lieshout, L., Verweij, J. J., Hermsen, C. C., Scholzen, A. and Sauerwein, R. W. (2013) Protection against malaria after immunization by chloroquine prophylaxis and sporozoites is mediated by preerythrocytic immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(19):7862–7867.

Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. and Cerretti, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385(6618):729–733.

Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J.-L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J. and Schneider, P. (2006) Interactions of Tumor Necrosis Factor (TNF) and TNF Receptor Family Members in the Mouse and Human. *J. Biol. Chem.* 281(20):13964–13971.

Brown, H., Hien, T. T., Day, N., Mai, N. T. H., Chuong, L. V., Chau, T. T. H., Loc, P. P., Phu, N. H., Bethell, D., Farrar, J., Gatter, K., White, N. and Turner, G. (1999) Evidence of blood–brain barrier dysfunction in human cerebral malaria. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25(4):331–340.

Bruce-Chwatt, L. J. (1988) Three hundred and fifty years of the Peruvian fever bark. *Br. Med. J.* 296(6635):1486–1487.

- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72(9):3666–3670.
- Chakravarty, S., Cockburn, I. A., Kuk, S., Overstreet, M. G., Sacci, J. B. and Zavala, F. (2007) CD8⁺ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat. Med.* 13(9):1035–1041.
- Chan, F. K.-M., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. and Lenardo, M. J. (2000) A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science* 288(5475):2351–2354.
- Chan, J.-A., Fowkes, F. I. and Beeson, J. (2014) Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cell. Mol. Life Sci.* Springer Basel 71(19):3633–3657.
- Clark, I. A. (1978) Does endotoxin cause both the disease and parasite death in acute malaria and babesiosis? *Lancet* 312(8080):75–77.
- Clark, I. A. (2007) How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18(3–4):335–343.
- Clark, I. A., Budd, A. C., Alleva, L. M. and Cowden, W. B. (2006) Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar. J.* 5(1):1–32.
- Clark, I. A. and Chaudhri, G. (1988) Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br. J. Haematol.* 70(1):99–103.
- Clark, I. A. and Rockett, K. A. (1994) The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol. Today* 10(10):410–412.
- Clark, I. A., Virelizier, J. L., Carswell, E. A. and Wood, P. R. (1981) Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Infect. Immun.* 32(3):1058–1066.
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. and Forster, I. (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 8(4):265–277.
- Cowman, A. F. and Crabb, B. S. (2006) Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* 124(4):755–766.
- Cox, F. (2010) History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit. Vectors* 3(1):5.
- Cross, M., Mangelsdorf, I., Wedel, a and Renkawitz, R. (1988) Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(17):6232–6.
- Doolan, D. L., Dobaño, C. and Baird, J. K. (2009) Acquired Immunity to Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(1):13–36.

- Dorovini-Zis, K., Schmidt, K., Huynh, H., Fu, W., Whitten, R. O., Milner, D., Kamiza, S., Molyneux, M. and Taylor, T. E. (2011) The Neuropathology of Fatal Cerebral Malaria in Malawian Children. *Am. J. Pathol.* 178(5):2146–2158.
- Edwards, D. R., Handsley, M. M. and Pennington, C. J. (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29(5):258–289.
- Engwerda, C. R., Mynott, T. L., Sawhney, S., De Souza, J. B., Bickle, Q. D. and Kaye, P. M. (2002) Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J. Exp. Med.* 195(10):1371–1377.
- Faurant, C. (2011) From bark to weed: The history of artemisinin. *Parasite* 18(3):215–218.
- Filler, S. G., Solis, N. V, Guo, J., Doellgast, G., Ruiz-Garcia, A. and Pan, W.-J. (2007) Pharmacokinetics of Murine p75-Fc Fusion Protein and MP6-XT22 Anti-Murine TNF-[alpha] mAb in Mice. *J Invest Derm Symp P* 12(1):52–56.
- Franke-Fayard, B., Fonager, J., Braks, A., Khan, S. M. and Janse, C. J. (2010) Sequestration and Tissue Accumulation of Human Malaria Parasites: Can We Learn Anything from Rodent Models of Malaria? *PLoS Pathog* 6(9):e1001032.
- Freitas-Junior, L. H., Bottius, E., Pirrit, L. A., Deitsch, K. W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrbass, U., Wellems, T. E. and Scherf, A. (2000) Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* 407(6807):1018–1022.
- Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L. and Yee, H. (2005) Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol.* 3(6):1034–1046.
- Frevert, U. and Nacer, A. (2014) Fatal cerebral malaria: a venous efflux problem. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4(155):1–7.
- Frevert, U., Nacer, A., Cabrera, M., Movila, A. and Leberl, M. (2014) Imaging *Plasmodium* immunobiology in the liver, brain, and lung. *Parasitol. Int.* 63(1):171–186.
- Geraghty, E. M., Ristow, B., Gordon, S. M. and Aronowitz, P. (2007) Overwhelming Parasitemia with *Plasmodium falciparum* Infection in a Patient Receiving Infliximab Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Clin. Infect. Dis.* 44(10):e82–e84.
- Glushakova, S., Humphrey, G., Leikina, E., Balaban, A., Miller, J. and Zimmerberg, J. (2010) New stages in the program of malaria parasite egress imaged in normal and sickle erythrocytes. *Curr. Biol.* 20(12):1117–1121.
- Glushakova, S., Yin, D., Li, T. and Zimmerberg, J. (2005) Membrane Transformation during Malaria Parasite Release from Human Red Blood Cells. *Curr. Biol.* 15(18):1645–1650.
- Goel, V. K., Li, X., Chen, H., Liu, S.-C., Chishti, A. H. and Oh, S. S. (2003) Band 3 is a

host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(9):5164–5169.

Grau, G. E., Fajardo, L. F., Piguet, P., Allet, B., Lambert, P. and Vassalli, P. (1987) Tumor Necrosis Factor (Cachectin) as an Essential Mediator in Murine Cerebral Malaria. *Science* 237:1210–1212.

Grau, G. E. and de Kossodo, S. (1994) Cerebral malaria: Mediators, mechanical obstruction or more? *Parasitol. Today* 10(10):408–409.

Gray, P. W., Aggarwal, B. B., Benton, C. V, Bringman, T. S., Henzel, W. J., Jarrett, J. A., Leung, D. W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L. P., Palladino, M. A. and Nedwin, G. E. (1984) Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 312(5996):721–724.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83(5):793–802.

Hafalla, J. C., Silvie, O. and Matuschewski, K. (2011) Cell biology and immunology of malaria. *Immunol. Rev.* 240(1):297–316.

Hashimoto, T., Schlessinger, D. and Cui, C.-Y. (2008) Troy binding to lymphotoxin- α activates NF κ B mediated transcription. *Cell Cycle* 7(1):106–111.

Van Hauwermeiren, F., Armaka, M., Karagianni, N., Kranidioti, K., Vandenbroucke, R. E., Loges, S., Van Roy, M., Staelens, J., Puimège, L., Palagani, A., Berghe, W. Vanden, Victoratos, P., Carmeliet, P., Libert, C. and Kollias, G. (2013) Safe TNF-based antitumor therapy following p55TNFR reduction in intestinal epithelium. *J. Clin. Invest.* 123(6):2590–2603.

Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005) The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol. Rev.* 57(2):173–185.

He, X., Yan, J., Zhu, X., Wang, Q., Pang, W., Qi, Z., Wang, M., Luo, E., Parker, D. M., Cantorna, M. T., Cui, L. and Cao, Y. (2014) Vitamin D Inhibits the Occurrence of Experimental Cerebral Malaria in Mice by Suppressing the Host Inflammatory Response. *J. Immunol.* 193(3):1314–1323.

Hempelmann, E., Tesarowicz, I. and Oleksyn, B. J. (2009) Kurzgefasste Geschichte der Malaria-Chemotherapie. Von Zwiebeln bis zum Artemisinin. *Pharm. Unserer Zeit* 38(6):500–507.

van Hensbroek, M. B., Palmer, A., Onyiorah, E., Schneider, G., Jaffar, S., Dolan, G., Memming, H., Frenkel, J., Enwere, G., Bennett, S., Kwiatkowski, D. and Greenwood, B. (1996) The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* 174(5):1091–1097.

Hunt, N. H., Golenser, J., Chan-Ling, T., Parekh, S., Rae, C., Potter, S., Medana, I. M.,

- Miu, J. and Ball, H. J. (2006) Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* 36(5):569–582.
- Idro, R., Marsh, K., John, C. C. and Newton, C. R. J. (2010) Cerebral malaria: Mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr. Res.* 68(4):267–274.
- Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y. and Yuda, M. (2004) Cell-Passage Activity Is Required for the Malarial Parasite to Cross the Liver Sinusoidal Cell Layer. *PLoS Biol* 2(1):77–84.
- Janes, K. A., Gaudet, S., Albeck, J. G., Nielsen, U. B., Lauffenburger, D. A. and Sorger, P. K. (2006) The Response of Human Epithelial Cells to TNF Involves an Inducible Autocrine Cascade. *Cell* 124(6):1225–1239.
- Kaufman, T. S. and Rúveda, E. A. (2005) The Quest for Quinine: Those Who Won the Battles and Those Who Won the War. *Angew. Chemie Int. Ed.* 44(6):854–885.
- Kellendonk, C., Opherk, C., Anlag, K., Schütz, G. and Tronche, F. (2000) Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *genesis* 26(2):151–153.
- Kester, K. E., Cummings, J. F., Ofori-Anyinam, O., Ockenhouse, C. F., Krzych, U., Moris, P., Schwenk, R., Nielsen, R. A., Debebe, Z., Pinelis, E., Juompan, L., Williams, J., Dowler, M., Stewart, V. A., Wirtz, R. A., Dubois, M.-C., Lievens, M., Cohen, J., Ballou, W. R. and Heppner D. Gray, J. (2009) Randomized, Double-Blind, Phase 2a Trial of Falciparum Malaria Vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in Malaria-Naive Adults: Safety, Efficacy, and Immunologic Associates of Protection. *J. Infect. Dis.* 200(3):337–346.
- Kinra, P. and Dutta, V. (2013) Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria. *Trop. Biomed.* 30(4):645–653.
- Klein, S. L., Shann, F., Moss, W. J., Benn, C. S. and Aaby, P. (2016) RTS,S Malaria Vaccine and Increased Mortality in Girls. *MBio* 7(2):514–516.
- Koch, U. and Radtke, F. (2011) Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:539–562.
- Kossodo, S. de, Grau, G. E., Daneva, T., Pointaire, P., Fossati, L., Ody, C., Zapf, J., Piguet, P.-F., Gaillard, R. C. and Vassalli, P. (1992) Tumor necrosis factor alpha is involved in mouse growth and lymphoid tissue development. *J. Exp. Med.* 176(5):1259–1264.
- Kruglov, A. A. and Nedospasov, S. A. (2012) Comment on ‘experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF- α and the oral microbiota’. *J. Immunol.* 188(1):4–5.
- Kuehn, A. and Pradel, G. (2010) The coming-out of malaria gametocytes. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:976827.
- Kwiatkowski, D., Molyneux, M. E., Stephens, S., Curtis, N., Klein, N., Pointaire, P.,

- Smit, M., Allan, R., Brewster, D. R., Grau, G. E. and Greenwood, B. M. (1993) Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q. J. Med.* 86(2):91–98.
- Kwiatkowski, D., Sambou, I., Twumasi, P., Greenwood, B. M., Hill, A. V. S., Manogue, K. R., Cerami, A., Castracane, J. and Brewster, D. R. (1990) TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 336(8725):1201–1204.
- Lang, W., Bendick, C., Bialek, R., Bienzle, U. B., Bodio, M., Boecken, G., Bretzel, G., Brun, R., Burchard, G.-D., Dobler, G., Drost, C., Ehrhardt, S., Ehrlich, J. H. H., Fenner, T., Fischer, M., Fischer, R., Fleischer, B., Fleischer, K., Frangoulidis, D., Fritzsche, C., Funk, M., Groß, U., Günther, S., Gyr, N. E., Harms-Zwischenberger, G., Hatz, C., Hillemann, D., Hölscher, M., Hörauf, A., Horstmann, R., Jäger, H., Jelinek, T., Junghans, T., Kantelhardt, E. J., Kern, P., Klauß, V., J. Knobloch, J. K., Kollaritsch, H., Korte, R., Krämer, A., Krawinkel, M.-B., Kroidl, A., Krüger, A., Langenscheidt, P., Leichsenring, M., Löscher, T., Luft, F. C., Mantel, C., Mehlhorn, H., Meyer, H., Mockenhaupt, F. P., Müller, A., Nothdurft, H. D., Paulke-Korinek, M., Pöschl, R., Reisinger, E. C., Richter, J., Richter-Turtur, M., Rinder, H., Ritter, B., Ritter, K. M., Roggendorf, M., Roß, R. S., Rüscher-Gerdes, S., Ruppel, A., Sauerborn, R., Schaller, U. C., Schmauz, R., Schmeller, W., Schmidt-Chanasit, J., Schmiedel, S., Schmutzhard, E., Siedenburg, J., Steffen, R., Stich, A., Stingl, P., Stompe, T., Sudeck, H., Tannich, E., Tetzlaff, K., Timmann, C., von Sonnenburg, F., Wacker, J., Weinke, T. and Wörmann, T. (2010) *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. 4. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Lange, S. and Bender, R. (2007) Lineare Regression und Korrelation. *Dtsch Med Wochenschr* 132:e9–e11.
- Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Pérez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., Cherry, S. R., Tsai, J. H., Tucker, S. M., Weaver, W. M., Kelso, A., Jaenisch, R. and Wilson, C. B. (2001) A Critical Role for Dnmt1 and DNA Methylation in T Cell Development, Function, and Survival. *Immunity* 15(5):763–774.
- Liepinsh, D. J., Grivennikov, S. I., Klarmann, K. D., Lagarkova, M. A., Drutskaya, M. S., Lockett, S. J., Tessarollo, L., McAuliffe, M., Keller, J. R., Kuprash, D. V and Nedospasov, S. A. (2006) Novel Lymphotoxin Alpha (LT α) Knockout Mice with Unperturbed Tumor Necrosis Factor Expression: Reassessing LT α Biological Functions. *Mol. Cell. Biol.* 26(11):4214–4225.
- Lopetuso, L. R., Petito, V., Cufino, V., Arena, V., Stigliano, E., Gerardi, V., Gaetani, E., Poscia, A., Amato, A., Cammarota, G., Papa, A., Sgambato, A., Gasbarrini, A. and Scaldaferrì, F. (2013) Locally injected Infliximab ameliorates murine DSS colitis: Differences in serum and intestinal levels of drug between healthy and colitic mice. *Dig. Liver Dis.* 45(12):1017–1021.
- Lucas, R., Lou, J. N., Juillard, P., Moore, M., Bluethmann, H. and Grau, G. E. (1997)

Respective role of TNF receptors in the development of experimental cerebral malaria. *J. Neuroimmunol.* 72(2):143–148.

Lucas, R., Suter, P. M. and Grau, G. E. (1997) TNF in Septic Shock and Cerebral Malaria. in *Yearb. Intensive Care Emerg. Med.* 1997. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 63–73.

MacPherson, G. G., Warrell, M. J., White, N. J., Looareesuwan, S. and Warrell, D. A. (1985) Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* 119:385–401.

Maegraith, B. (1974) Other pathological processes in malaria. *Bull. World Health Organ.* 50(3–4):187–193.

Maglinao, M., Klopffleisch, R., Seeberger, P. H. and Lepenies, B. (2013) The C-type lectin receptor DCIR is crucial for the development of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* 191(5):2551–2559.

Malaria Vaccine Initiative (2011) First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. *N. Engl. J. Med.* 1863–1875.

Markey, K. A., Burman, A. C., Banovic, T., Kuns, R. D., Raffelt, N. C., Rowe, V., Olver, S. D., Don, A. L. J., Morris, E. S., Pettit, A. R., Wilson, Y. A., Robb, R. J., Randall, L. M., Korner, H., Engwerda, C. R., Clouston, A. D., MacDonald, K. P. A. and Hill, G. R. (2009) Soluble lymphotoxin is an important effector molecule in GVHD and GVL. *Blood* 115(1):122–132.

Medana, I. M. and Turner, G. D. H. (2007) Plasmodium falciparum and the Blood-Brain Barrier—Contacts and Consequences. *J. Infect. Dis.* 195(7):921–923.

Meis, J. F. G. M., Verhave, J. P., Jap, P. H. K. and Meuwissen, J. H. E. T. (1985) Fine Structure of Exoerythrocytic Merozoite Formation of Plasmodium berghei in Rat Liver. *J. Protozool.* 32(4):694–699.

Mikolajczak, S. A. and Kappe, S. H. I. (2006) A clash to conquer: the malaria parasite liver infection. *Mol. Microbiol.* 62(6):1499–1506.

Mitchell, G. H., Thomas, A. W., Margos, G., Dluzewski, A. R. and Bannister, L. H. (2004) Apical Membrane Antigen 1, a Major Malaria Vaccine Candidate, Mediates the Close Attachment of Invasive Merozoites to Host Red Blood Cells. *Infect. Immun.* 72(1):154–158.

Moncunill, G., Mayor, A., Bardají, A., Puyol, L., Nhabomba, A., Barrios, D., Aguilar, R., Pinazo, M.-J., Almirall, M., Soler, C., Muñoz, J., Gascón, J. and Dobaño, C. (2013) Cytokine Profiling in Immigrants with Clinical Malaria after Extended Periods of Interrupted Exposure to Plasmodium falciparum. *PLoS One* 8(8):e73360.

MSD (2014) Fachinformation Infliximab (Remicade).

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold*

Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51:263–273.

Murdaca, G., Colombo, B. M., Contini, P. and Puppo, F. (2012) Determination of Lymphotoxin-Alpha Levels in Patients with Psoriatic Arthritis Undergoing Etanercept Treatment. *J. Interf. Cytokine Res.* 32(6):277–279.

Nahrendorf, W., Scholzen, A., Bijker, E. M., Teirlinck, A. C., Bastiaens, G. J. H., Schats, R., Hermsen, C. C., Visser, L. G., Langhorne, J. and Sauerwein, R. W. (2014) Memory B-Cell and Antibody Responses Induced by Plasmodium falciparum Sporozoite Immunization. *J. Infect. Dis.* 210(12):1981–1990.

Nedwin, G. E., Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Smith, D., Jarrett-Nedwin, J., Pennica, D., Goeddel, D. V and Gray, P. W. (1985) Human Lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 13(17):6361–6373.

Nerlich, A. G., Schraut, B., Dittrich, S., Jelinek, T. and Zink, A. R. (2008) Plasmodium falciparum in Ancient Egypt. *Emerg. Infect. Dis.* 14(8):1317–1319.

Newton, C. R. J. C. and Krishna, S. (1998) Severe Falciparum Malaria in Children: Current Understanding of Pathophysiology and Supportive Treatment. *Pharmacol. Ther.* 79(1):1–53.

Newton, C. R. J. C., Winstanley, P. A., Peshu, N., Marsh, K., Kirkham, F. J., Pasvol, G. and Warrell, D. A. (1991) Intracranial pressure in African children with cerebral malaria. *Lancet* 337(8741):573–576.

Newton, C. R., Peshu, N., Kendall, B., Kirkham, F. J., Sowunmi, A., Waruiru, C., Mwangi, I., Murphy, S. A. and Marsh, K. (1994) Brain swelling and ischaemia in Kenyans with cerebral malaria. *Arch. Dis. Child.* 70(4):281–287.

O'Malley, W. E., Achinstein, B. and Shear, M. J. (1962) Action of Bacterial Polysaccharide on Tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by Serum of Mice Treated With Serratia Marcescens Polysaccharide, and Induced Tolerance. *J Nat Cancer Inst* 29:1169–1175.

Penet, M.-F., Viola, A., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Duhamel, G., Kober, F., Ibarrola, D., Izquierdo, M., Coltel, N., Gharib, B., Grau, G. E. and Cozzone, P. J. (2005) Imaging Experimental Cerebral Malaria In Vivo: Significant Role of Ischemic Brain Edema. *J. Neurosci.* 25(32):7352–7358.

Persson, K. E. M., McCallum, F. J., Reiling, L., Lister, N. A., Stubbs, J., Cowman, A. F., Marsh, K. and Beeson, J. G. (2008) Variation in use of erythrocyte invasion pathways by Plasmodium falciparum mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J. Clin. Invest.* 118(1):342–351.

Pfizer (2014) Fachinformation Etanercept (Enbrel).

Pober, J. S., Lapierre, L. A., Stolpen, A. H., Brock, T. A., Springer, T. A., Fiers, W., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L. and Gimbrone, M. A. (1987) Activation of cultured

- human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J. Immunol.* 138(10):3319–3324.
- van der Poll, T., Büller, H. R., ten Cate, H., Wortel, C. H., Bauer, K. A., van Deventer, S. J. H., Hack, C. E., Sauerwein, H. P., Rosenberg, R. D. and ten Cate, J. W. (1990) Activation of Coagulation after Administration of Tumor Necrosis Factor to Normal Subjects. *N. Engl. J. Med.* 322(23):1622–1627.
- Postels, D. G. and Birbeck, G. L. (2013) Cerebral malaria. *Handb. Clin. Neurol.* 114:91–102.
- Postels, D. G., Chimalizeni, Y. F., Mallewa, M., Boivin, M. J. and Seydel, K. B. (2013) Pediatric cerebral malaria: a scourge of Africa. *Future Neurol.* 8(1):67–85.
- Potter, S., Chan-Ling, T., Ball, H. J., Mansour, H., Mitchell, A., Maluish, L. and Hunt, N. H. (2006) Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* 36(4):485–496.
- Pradel, G., Garapaty, S. and Frevert, U. (2002) Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol. Microbiol.* 45(3):637–651.
- Prudencio, M., Rodriguez, A. and Mota, M. M. (2006) The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat Rev Micro* 4(11):849–856.
- Queiroz-Junior, C. M., de Souza, D. da G., Teixeira, M. M. and da Silva, T. A. (2012) Response to Comment on “Experimental Arthritis Triggers Periodontal Disease in Mice: Involvement of TNF- α and the Oral Microbiota”. *J. Immunol.* 188(1):5–6.
- Reece, W. H. H., Pinder, M., Gothard, P. K., Milligan, P., Bojang, K., Doherty, T., Plebanski, M., Akinwunmi, P., Everaere, S., Watkins, K. R., Voss, G., Tornieporth, N., Allouche, A., Greenwood, B. M., Kester, K. E., McAdam, K. P. W. J., Cohen, J. and Hill, A. V. S. (2004) A CD4⁺ T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural Plasmodium falciparum infection and disease. *Nat. Med.* 10(4):406–410.
- Remouchamps, C., Boutaffala, L., Ganeff, C. and Dejardin, E. (2011) Biology and signal transduction pathways of the Lymphotoxin- $\alpha\beta$ /LT β R system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22(5–6):301–310.
- Retief, F. and Cilliers, L. (2004) Malaria in Graeco-Roman times. *Acta Cl.* 47:127–137.
- Riley, E. M., Couper, K. N., Helmbly, H., Hafalla, J. C. R., de Souza, J. B., Langhorne, J., Jarra, W. B. and Zavala, F. (2010) Neuropathogenesis of human and murine malaria. *Trends Parasitol.* 26(6):277–278.
- Roestenberg, M., Teirlinck, A. C., McCall, M. B. B., Teelen, K., Makamdop, K. N., Wiersma, J., Arens, T., Beckers, P., van Gemert, G., van de Vegte-Bolmer, M., van der Ven, A. J. A. M., Luty, A. J. F., Hermsen, C. C. and Sauerwein, R. W. (2011) Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *Lancet* 377(9779):1770–1776.

- RTS/S Clinical Trials Partnership (2015) Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* 386(9988):31–45.
- Ruddle, N. H. and Waksman, B. H. (1967) Cytotoxic effect of lymphocyte-antigen interaction in delayed hypersensitivity. *Science* 157(3792):1060–1062.
- Sabio, G. and Davis, R. J. (2014) TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin. Immunol.* 26(3):237–245.
- Sauer, B. and Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(14):5166–70.
- Scherf, A., Hernandez Rivas, R., Buffet, P., Bottius, E., Benatar, C., Pouvelle, B., Gysin, J. and Lanzer, M. (1998) Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* 17(18):5418–5426.
- Scherf, A., Lopez-Rubio, J. J. and Riviere, L. (2008) Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol.* 62(1):445–470.
- Schneider, K., Potter, K. G. and Ware, C. F. (2004) Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol. Rev.* 202(1):49–66.
- Schofield, L. and Mueller, I. (2006) Clinical Immunity to Malaria. *Curr. Mol. Med.* 205–221.
- Sidjanski, S. and Vanderberg, J. P. (1997) Delayed Migration of *Plasmodium* Sporozoites from the Mosquito Bite Site to the Blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57(4):426–429.
- Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K. and Lavstsen, T. (2013) Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell. Microbiol.* 15(12):1976–1983.
- Soares, M. P., Teixeira, L. and Moita, L. F. (2017) Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nat. Rev. Immunol.* 17(2):83–96.
- De Souza, J. B., Hafalla, J. C. R., Riley, E. M. and Couper, K. N. (2010) Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* 137(5):755–772.
- Spillman, N. J., Beck, J. R. and Goldberg, D. E. (2015) Protein Export into Malaria Parasite-Infected Erythrocytes: Mechanisms and Functional Consequences. *Annu. Rev. Biochem.* 84:813–841.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.-M., Menard, R. and Heussler, V. T. (2006) Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science* 313(5791):1287–1290.

- Taylor, H. M., Kyes, S. A. and Newbold, C. I. (2000) Var gene diversity in *Plasmodium falciparum* is generated by frequent recombination events. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110(2):391–397.
- Troye-Blomberg, M., Berzins, K. and Perlmann, P. (1994) T-cell control of immunity to the asexual blood stages of the malaria parasite. *Crit. Rev. Immunol.* 14(2):131–155.
- Tsuji, M. and Zavala, F. (2003) T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*. *Trends Parasitol.* 19(2):88–93.
- Tyler, J. S., Treeck, M. and Boothroyd, J. C. (2011) Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. *Trends Parasitol.* 27(9):410–420.
- Upadhyay, V. and Fu, Y.-X. (2013) Lymphotoxin signalling in immune homeostasis and the control of microorganisms. *Nat. Rev. Immunol.* 13(4):270–279.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10(1):45–65.
- White, N. J., Turner, G. D. H., Medana, I. M., Dondorp, A. M. and Day, N. P. J. (2010) The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol.* 26(1):11–15.
- Wirth, C. C. and Pradel, G. (2012) Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *Int. J. Med. Microbiol.* 302(4–5):172–178.
- World Health Organization (2013) *World Malaria Report 2013*.
- World Health Organization (2014) *World Malaria Report 2014*.
- Yamauchi, L. M., Coppi, A., Snounou, G. and Sinnis, P. (2007) *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell. Microbiol.* 9(5):1215–1222.
- Yañez, D. M., Manning, D. D., Cooley, A. J., Weidanz, W. P. and van der Heyde, H. C. (1996) Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J. Immunol.* 157(4):1620–1624.
- Ye, J., Jiang, R., Cui, M., Zhu, B., Sun, L., Wang, Y., Zohaib, A., Dong, Q., Ruan, X., Song, Y., He, W., Chen, H. and Cao, S. (2014) Etanercept Reduces Neuroinflammation and Lethality in Mouse Model of Japanese Encephalitis. *J. Infect. Dis.* 210(6):875–889.
- Ziegler, A., Lange, S. and Bender, R. (2007) Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression. *Dtsch Med Wochenschr* 132:e42–e44.

14 Veröffentlichte eigene wissenschaftliche Arbeiten

- Berker, M., Frank, L. J., Geßner, A. L., Grassl, N., Holtermann, A. V., Höppner, S., Kraef, C., Leclaire, M. D., Maier, P., Messerer, D. A. C., Möhrmann, L., Nieke, J. P., Schoch, D., Soll, D. and Woopen, C. M. P. (2017) Allergies – A T cells perspective in the era beyond the TH1/TH2 paradigm. *Clin. Immunol.* 174:73–83.

15 Danksagung und Widmung

Die Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit war eine große Herausforderung für mich, die ich nur durch die Unterstützung vieler Menschen meistern konnte, denen ich meinen Dank aussprechen möchte.

Allen voran danke ich PD Dr. Thomas Jacobs für die freundliche Aufnahme in seine Forschungsgruppe, die Betreuung der Arbeit und unzählige Gespräche, Ratschläge und Hilfestellungen. Ebenso gebührt mein Dank Dr. Hanno Ehlken für seine Betreuung, für die zahlreichen Gespräche und unterstützenden Ratschläge. Für seine Supervision im Rahmen der Betreuungskommission danke ich Prof. Dr. Friedrich Haag.

Alltägliche Unterstützung erfuhr ich durch die Mitglieder der Laborgruppe Jacobs, wofür ich mich herzlich bedanken möchte, ganz besonders bei Christiane Steeg. Auch über die Laborgruppe hinaus erhielt ich viel Unterstützung am Bernhard-Nocht-Institut. Insbesondere gilt mein Dank Constantin Pretnar, Aline Adam, Yvonne Richter, Doris Kuri, Meryem Küçük, Meral Araz, Arshad Ali, Marie-Luise Eschbach, Anne MacDonald und Monica Prado. Ebenfalls möchte ich dem Team der Arbeitsgruppe Ehlken am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf danken, zuvorderst Raluca Wroblewski für ihre tatkräftige Unterstützung, ihr offenes Ohr bei Problemen jeglicher Art und ihren unbezwingbaren Optimismus. Auch Markus Sturm gebührt mein Dank.

Ich danke Dr. Anika Buchholz für ihre Beratung in statistischen Fragen.

Danke an 許桂華 (Guihua Xu) und 周乐浦 (Dr. Lepu Zhou) für Ihre Unterstützung und Hilfe bei der Übersetzung der Zusammenfassung ins Chinesische.

Bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit wurde ich ferner unterstützt vom Graduiertenkolleg des Sonderforschungsbereichs 841 „Entzündung und Regeneration der Leber“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie von der Studienstiftung des deutschen Volkes, wofür ich sehr dankbar bin.

Ich danke meinen Eltern, die schon immer meinen Forschergeist befeuerten und mich auf dem langen Weg meiner Ausbildung stets unterstützten und ermutigten. Und ich danke meinen Freund*innen, auf deren Verständnis und Rückhalt ich bauen durfte.

Diese Arbeit widme ich Robert Klunker, dessen Leidenschaft und Humor mich überzeugten, den Weg des Medizinstudiums einzuschlagen und dessen Freundschaft mich bereits durch deutsche, laotische und chinesische Krankenhäuser begleitete, sowie Prof. Dr. Ingeborg Rapoport (1912-2017), die mich nach unserem leider einzigen Gespräch zugleich verwundert und beeindruckt zurückließ.

16 Lebenslauf

(aus Datenschutzgründen nicht enthalten)

17 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

(aus Datenschutzgründen nicht enthalten)