

# **Effekt von Testosteron auf die Anti-Malaria Effektorfunktion der Milz**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Vorgelegt von  
Liv Mehnert  
aus Mülheim / Ruhr

Düsseldorf  
2005

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Univ. Prof. Dr. F. Wunderlich

Koreferent: Univ. Prof. Dr. H. Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2005

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:**

Wunderlich, F., Dkhil, M.A., **Mehnert, L.I.**, Braun, J.V., El-Khadragy, M., Borsch, E., Hermsen, D., Benten, W.P.M., Pfeffer, K., Mossmann, H. und Krücken, J. [2005]: Testosterone responsiveness of spleen and liver in female lymphotoxin  $\beta$  receptor-deficient mice resistant to blood stage malaria: *Microbes Infect.*; **7**: 399-409

Wunderlich, F., Dkhil M., El-Khadragy, M., **Mehnert, L.I.**, Benten, W.P.M. und Krücken, J. [2005]: The role of liver in blood stage malaria: *J. Egypt. Germ. Soc. Zool.*; in press

Krücken, J., **Mehnert, L.I.**, Dkhil, M.A., El-Khadragy, M., Benten, W.P.M., Pfeffer, K., Mossmann, H. und Wunderlich, F. [2005]: Malaria-induced gating excludes parasitized red blood cells from the spleen: *Infect. Immun.*; in press



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.1</b>	<b>Malaria – eine weltweite Bedrohung.....</b>	<b>1</b>
1.2	Entwicklungszyklus von <i>Plasmodium</i> .....	4
1.3	Krankheitsbild .....	6
1.4	Immunantwort gegen Malaria .....	7
1.4.1	Die Rolle von B-Zellen und Antikörpern .....	8
1.4.2	Die Rolle von T-Zellen .....	9
1.4.3	Die Rolle von Makrophagen .....	11
1.5	Die Rolle der Milz bei der Immunität gegen Blutstadien der Malaria.....	12
1.6	Die Rolle der Apoptose bei Malaria.....	15
1.7	Die Wirkung von Testosteron bei Malaria .....	16
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1	Materialien .....	19
2.2	Lösungen und Puffer .....	21
2.3	Antikörper .....	24
2.4	Spezifische Reagenzien für FACS und Fluoreszenzmikroskopie .....	25
2.5	Zellkulturlinie.....	26
2.6	Hefestamm .....	26
2.7	Versuchstiere.....	26
2.8	Parasiteninfektion.....	27
2.8.1	Infektion mit dem Malaria-Erreger <i>Plasmodium chabaudi</i> .....	27
2.8.2	Isolation von infizierten Erythrozyten .....	27
2.9	Testosteron-Behandlung von C57BL/6-Weibchen .....	28
2.10	TNF $\alpha$ -Behandlung von C57BL/6-Weibchen .....	28
2.11	Zellkultur .....	28
2.11.1	Herstellung von CSCS .....	28
2.11.2	Kultivierung der Makrophagenzelllinie .....	29

---

2.11.3	Kryokonservierung von Zellen.....	29
2.11.4	Auftauen von Zellen.....	29
2.12	Durchflußzytometrie.....	30
2.12.1	Isolation von Milzzellen.....	30
2.12.2	Quantifizierung von Milzzellpopulationen .....	30
2.12.3	Bestimmung von apoptotischen Zellen .....	30
2.13	Filtrationskapazität der Milz.....	31
2.13.1	Bestimmung der Filtrationskapazität.....	31
2.14	<i>In vivo</i> Erythrophagozytose .....	32
2.14.1	Färben von Erythrozyten.....	32
2.14.2	<i>In vivo</i> Erythrophagozytose.....	32
2.14.3	Kryoschnitte .....	32
2.14.4	<i>In situ</i> Antikörperfärbung von Kryoschnitten .....	33
2.14.5	Hämatoxylinfärbung von Kryoschnitten.....	33
2.15	Phagozytose durch Makrophagen.....	33
2.15.1	Erythrophagozytose durch Makrophagen .....	33
2.15.1.1	Färben von Erythrozyten.....	33
2.15.1.2	Testosteronbehandlung von RAW 264.7-Makrophagen .....	34
2.15.1.3	Erythrophagozytose durch RAW 264.7-Makrophagen .....	34
2.15.2	Phagozytose von Hefe.....	35
2.15.2.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35
2.15.2.2	Phagozytose von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35
2.16	Mikroskopie.....	35
2.16.1	Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie.....	35
2.16.2	Konfokale Laserscanning Mikroskopie.....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Die Milz als Effektor gegen Malaria .....	37
3.1.1	Verlauf einer <i>Plasmodium chabaudi</i> -Infektion.....	37
3.1.2	Zellularität der Milz während einer <i>Plasmodium chabaudi</i> -Infektion.....	40
3.1.2.1	Anzahl der gesamten und apoptotischen Milzzellen während einer Infektion.....	40

---

3.1.2.2	Milz-“gating” .....	42
3.1.2.2.1	Partikelaufnahme und Struktur .....	42
3.1.2.2.2	Aufnahme von PKH26-markierten Erythrozyten .....	43
3.1.2.2.3	Zellmigration.....	48
3.1.2.2.4	Marginale Zone .....	50
3.2	Wirkung von Testosteron .....	53
3.2.1	Konversion von Resistenz zu Suszeptibilität durch Testosteron .....	53
3.2.2	Zellularität während einer <i>Plasmodium chabaudi</i> -Infektion .....	54
3.2.2.1	Anzahl der gesamten und apoptotischen Milzzellen während einer <i>Plasmodium chabaudi</i> -Infektion .....	54
3.2.2.2	Milz-“gating” .....	55
3.2.2.2.1	Aufnahme von PKH26-markierten Erythrozyten .....	55
3.2.2.2.2	Zellmigration.....	57
3.2.2.2.3	Marginale Zone .....	57
3.2.3	Phagozytose durch Makrophagen .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
4.1	Die Milz als Effektor gegen Malaria.....	61
4.2	Wirkung von Testosteron .....	69
4.3	Ausblick .....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>77</b>
	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>93</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>95</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>97</b>

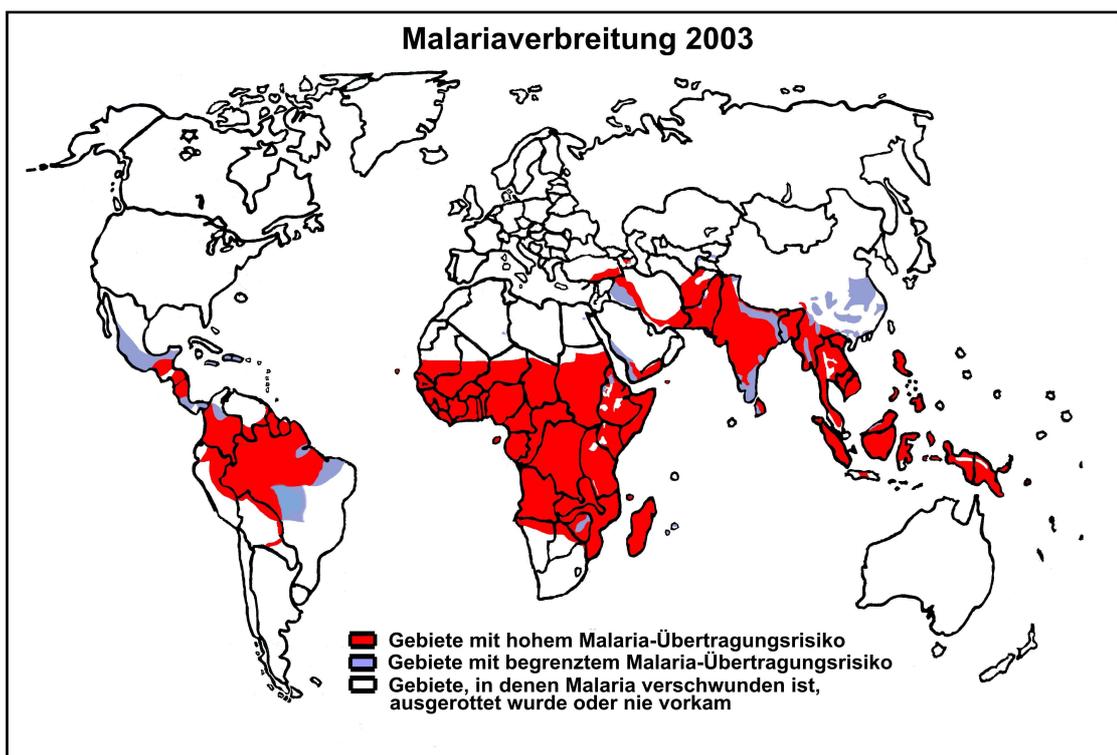


# 1 Einleitung

## 1.1 Malaria – eine weltweite Bedrohung

Infektionskrankheiten sind weltweit die häufigste Todesursache von Kindern und jungen Erwachsenen. Neben Tuberkulose und Aids gehört Malaria zu den wichtigsten Infektionskrankheiten. Sie sind zusammen für 90 % aller durch Infektionen ausgelösten Todesfälle verantwortlich [Heymann, 2000].

Malaria ist eine tropentypische Parasitose, die in den tropischen und subtropischen Regionen aller Kontinente, mit Ausnahme von Australien, in etwa 100 Ländern endemisch auftritt (**Abbildung 1-1**) [WHO, 2004].



**Abbildung 1-1** Globale Verbreitung von Malaria [modifiziert nach WHO 2004].

Die Karte zeigt eine Übersicht der Malaria-Endemiegebiete der Erde. Oft sind in den endemischen Ländern lediglich bestimmte Regionen betroffen.

Etwa 40 % der Weltbevölkerung leben in endemischen Malariagebieten, in denen schätzungsweise 300 bis 500 Millionen Neuinfektionen pro Jahr registriert werden. Dabei treten 90 % aller Malariaerkrankungen in Ländern Afrikas südlich der Sahara auf. Weitere endemische Malaria-Gebiete liegen in Indien und Südamerika (Amazonasbecken).

Pro Jahr erliegen weltweit 1,5 bis 2,7 Millionen Menschen der Malaria, das heißt in einer Stunde sterben etwa 1500 Menschen. Über 75 % davon sind Kinder unter fünf Jahren [WHO, 2002].

Selbst in Deutschland kommt es im Jahr zu 800 bis 1000 Erkrankungen durch importierte Malaria, von denen 3 bis 20 tödlich verlaufen [Robert Koch-Institut, 2003]. Damit ist die Malaria in Deutschland zur fünfthäufigsten meldepflichtigen Infektionskrankheit geworden [Bommer *et al.*, 1990]

Beschreibungen der Symptome von Malaria liegen schon aus dem Altertum vor, die ohne Kenntnis des Entwicklungszyklus in Zusammenhang mit der Luft über den Sümpfen („mala aria“ = schlechte Luft) gebracht wurden [Mehlhorn & Piekarski, 1995]. Die Identifizierung des Malariaerregers *Plasmodium* im Blut erfolgte 1880 durch Charles L. Laveran. Sechs Jahre später entdeckte Camillo Golgi die asexuelle Entwicklung und Vervielfältigung während der Schizogenie in frischen Blutaussstrichen [Kean *et al.*, 1978]. 1897 beschrieb Roland Ross pigmentierte Zysten in der Anophelesmücke und erkannte die Anophelesmücke als Vektor der Krankheit. Erst 1948 wiesen H.E. Shortt und P.C.C. Garnham die Entwicklung von *Plasmodium* in der Leber nach [Sherman, 2001a].

Es werden vier humanpathogene Plasmodienarten unterschieden (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*). Dabei ist *Plasmodium falciparum* für etwa 50 % aller Malariaerkrankungen verantwortlich. Wegen des oft tödlichen Verlaufs der sogenannten Malaria tropica ist dieser Erreger besonders gefürchtet. In Teilen Asiens und Lateinamerikas ist *Plasmodium vivax* ein häufiges Pathogen.

*Plasmodium* wird durch weibliche Stechmücken der Gattung Anopheles bei der Blutmahlzeit auf den Menschen übertragen [Lucius & Loos-Frank, 1997; Sherman, 2001b].

Bereits 1640 verwendeten spanische Kolonialisten in Südamerika die Rinde des Chinarindenbaums (*Cinchona ledgeriana*) bei der Behandlung von Malaria. 1820 isolierten und kristallisierten Pierre Pelletier und Joseph Caventou das aktive Alkaloid Chinin. Chinin lieferte einen strukturellen Prototyp, der zur Entwicklung von synthetischen Antimalariamitteln führte [Sherman, 2001a].

Mitte der 30er Jahre des vorherigen Jahrhunderts wurde mit der Einführung von Chloroquin erneut ein wirksames Behandlungsmittel gefunden. Inzwischen ist es jedoch zu einer großflächigen Verbreitung von resistenten Erregern gekommen. Eine Ausbreitung und in manchen Fällen schnelle Ausbildung von Resistenzen gegen andere Medikamente, wie Sulfadoxin-Pyrimethamin und Mefloquin (Lariam<sup>®</sup>), erschwert die Malariatherapie [Phillips, 2001; A Med-World AG, 2004]. Aufgrund dieser vielfältigen Resistenzen der Erreger gegen neuere Medikamente kommt Chinin heute in der Therapie der schweren Formen der Malaria in Kombination mit anderen Wirkstoffen wieder zunehmend zum Einsatz [Bayer AG, 2002].

Die Entdeckung der Mücke als Vektor der Malaria führte zu Versuchen, die Verbreitung der Krankheit durch Zerstörung der Brutplätze für Anopheles einzuschränken. Ende des 19. und Anfangs des 20. Jahrhunderts lag das Hauptaugenmerk auf der Vernichtung der Larven durch den Einsatz von Kerosin, die Trockenlegung von Sümpfen und dem „Screening“ von Häusern.

Im Jahr 1957 startete die Weltgesundheitsorganisation (WHO) mit dem Einsatz von DDT gegen die Stechmücken ein zunächst sehr erfolgreiches Malariabekämpfungsprogramm. Obwohl die Maßnahmen zur Ausrottung der Malaria in einigen Teilen der Welt erfolgreich waren, blieben alle Versuche, die Krankheit vollständig zu beseitigen, aufgrund von Resistenzen der Anophelesmücke gegen DDT und der Parasiten gegen die Chemotherapeutika erfolglos. Das WHO-Bekämpfungsprogramm wurde 1965 offiziell beendet und durch Strategien zur Kontrolle ersetzt [Phillips, 2001; Sherman, 2001a; Sachs, 2002].

Trotz jahrelanger Forschung ist die Entwicklung eines Impfstoffes immer noch nicht absehbar, obwohl durch die Entschlüsselung der Genome von *Plasmodium falciparum* [Gardner *et al.*, 2002] und *Anopheles gambiae* [Holt *et al.*, 2002] neue Ansatzpunkte vorhanden sind.

Durch die Kenntnis der Genome könnten Medikamente entwickelt werden, die aktiv den Stoffwechsel beeinflussen. Zum Beispiel hemmen das Artemisin-Derivat Artemisone und das Herbizid Fosmidomycin ein Enzym, welches den Inoprenoid-Stoffwechsel von *Plasmodium falciparum* hemmt [Bayer AG, 2002; Greenwood & Mutabingwa, 2002; Missinou *et al.*, 2002].

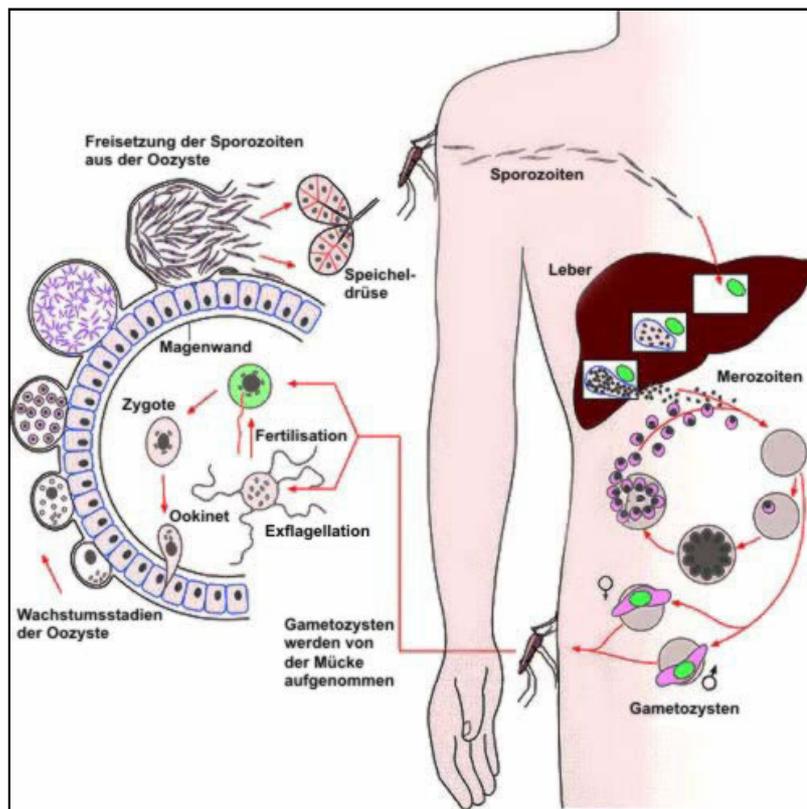
## 1.2 Entwicklungszyklus von *Plasmodium*

Malaria wird durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* (Stamm Apicomplexa, Klasse Hematozoa, Ordnung Haemosporida, Familie Plasmodiidae) verursacht. Neben den Menschen und Primaten können auch viele andere Wirbeltiere von spezifischen Arten der Plasmodien infiziert werden.

Von etwa 400 *Anopheles*-Arten weltweit dienen 60 als Endwirte und Vektoren (Überträger), in denen die geschlechtliche Vermehrung stattfindet [Butcher, 1996]. Der Mensch ist der Zwischenwirt, in dem sich die ungeschlechtliche Vermehrung vollzieht. Auf natürlichem Weg erfolgt die Infektion des Menschen durch den Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke. Der Entwicklungszyklus ist bis auf die Ausnahme einiger Affenarten als Erregerreservoir streng wirtsspezifisch (obligat) [Mehlhorn & Piekarski, 1995].

Beim Stich werden Sporoziten, wie in **Abbildung 1-2** dargestellt, mit dem Speichel in die Blutbahnen injiziert und auf dem Blutweg innerhalb von 3 bis 45 Minuten in die Leber transportiert [Rosenberg *et al.*, 1990]. Dort dringen sie über das Endothel in die Leberparenchymzellen ein. In diesen Zellen entwickeln sich die Sporoziten in einer parasitophoren Vakuole innerhalb von 6 bis 16 Tagen weiter (präerythrozytäre Phase). Je nach Art bilden sich runde oder bandförmige Trophozoiten, die sich letztendlich zu Gewebesporoziten entwickeln. Diese Schizogonie führt zur Bildung von 10000 bis 30000 Merozoiten. Bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* entstehen parallel zu

den Schizonten Dauerstadien, sogenannte Hypnozoiten, die auch noch nach mehreren Jahren zu erneuten Krankheitsausbrüchen führen können [Lucius & Loos-Frank, 1997]. Beim Platzen der Hepatozyten werden die Merozoiten frei und treten in die Blutbahn ein. Innerhalb von 15 bis 20 Sekunden binden sie an einen Erythrozyten und dringen in ihn ein [Phillips, 2001].



**Abbildung 1-2** Der Entwicklungszyklus von *Plasmodium spec.*  
[Modifiziert nach Sherman, 2001a]

Innerhalb einer parasitophoren Vakuole durchlaufen die Merozoiten eine erneute Schizogenie (erythrozytäre Phase). Aus jedem Schizogeniezyklus gehen jeweils 8 bis 16 Merozoiten hervor, die weitere Erythrozyten befallen. Einige Merozoiten differenzieren sich zu Gamonten (Gamogonie), welche, wenn sie von einer Mücke beim Stich aufgenommen werden, im Mückendarm zu Mikro- und Makrogameten heranreifen. Bei diesem Vorgang teilt sich der weibliche Gamontenkern nicht, während aus den männlichen Gamonten durch Exflagellation 4 bis 8 begeißelte Mikrogameten entstehen, die dann je einen Makrogameten befruchten [Mehlhorn & Piekarski, 1995]. Es bildet sich eine bewegliche Zygote (Ookinete), die durch das Epithel des Mückendarms

wandert und sich zwischen Epithelzellen und Basalmembran festsetzt. Der Ookinet wächst zu einer Oozyste heran, in der die Sporogonie abläuft. Nach einer Reduktionsteilung werden dabei etwa 1000 Sporozoiten gebildet, die im reifen Zustand frei werden und in die Speicheldrüsenzellen einwandern. Von dort können sie beim Stich wiederum auf den Menschen übertragen werden [Lucius & Loos-Frank, 1997].

### 1.3 Krankheitsbild

Die Malariaerkrankung beginnt häufig mit Kopf- und Rückenschmerzen, Frösteln, Hitzegefühl und vor allem hohem Fieber. Daher wird der Beginn einer Malariaerkrankung oft als Grippe fehldiagnostiziert [A Med-World AG, 2004]. Die für Malaria typischen rhythmischen Fieberanfälle werden durch die asexuellen Blutstadien von *Plasmodium* verursacht. Sie resultieren aus der Zerstörung der Erythrozyten und der daraus bedingten Freisetzung von Toxinen [Sherman, 2001a]. Diese Fieberanfälle treten je nach Art der Malaria in unterschiedlichen Abständen auf. Malaria tertiana, die von *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* verursacht wird, hat einen erythrozytären Schizogeniezyklus von 48 Stunden. Bei ihr wechselt sich ein fieberfreier Tag mit einem Fieber-Tag ab. Während bei Malaria quartana (*P. malariae*) zwei fieberfreie Tage gefolgt von einem Fieber-Tag auftreten [Mehlhorn & Piekarski, 1995]. Die gefährlichste Malariaerkrankung ist die Malaria tropica (*P. falciparum*), welche nicht nur die häufigste Krankheitsform ist, sondern auch unbehandelt in etwa 30 % der Fälle zum Tod führt [A Med-World AG, 2004]. Malaria tropica ist am schwierigsten zu diagnostizieren, da die Symptome uncharakteristisch und leicht mit anderen Krankheiten, wie z.B. grippalen Infekten, Bronchitis, Pneumonie, Gastroenteritis, Typhus, Nephritis, Sepsis, Leptospirose oder Myokarditis, zu verwechseln sind [Wunderlich & Schmitt, 1988]. *Plasmodium falciparum* induziert die Ausbildung von als „Knobs“ bezeichneten Ausstülpungen auf der Erythrozytenmembran, die vom Parasiten produzierte Adhäsionsproteine, wie PfEMP-1, enthalten. Mit diesen „Knobs“ binden die befallenen Erythrozyten an die Endothelien von Kapillaren (Zytoadhärenz) oder an andere Erythrozyten (Rosettenbildung) und vermeiden so eine Milzpassage, während der sie wahrscheinlich aussortiert und zerstört würden. Die Adhärenz der Erythrozyten führt zur Verstopfung der Kapillaren und damit zu einer Unterbrechung

der Mikrozirkulation. Dies kann Sauerstoffunterversorgung, Ödembildung und Blutungen in verschiedenen Organen zur Folge haben. Die schwerste Verlaufsform der Malaria tropica ist die zerebrale Malaria, bei der es durch Ausfall von Gehirnfunktionen zu Lähmungen, Koma und Tod kommen kann [Lucius & Loos-Frank, 1997].

## 1.4 Immunantwort gegen Malaria

Nicht alle Menschen sind gleichermaßen empfänglich für eine Malariainfektion. So gibt es einige Erbkrankheiten, die eine natürliche Resistenz gegen Malaria verleihen. Schutz gegen *Plasmodium falciparum* bieten Mutationen, die eine Reduktion in der Syntheserate von Hämoglobin, wie bei der Thalassämie, zur Folge haben. Einen Schutz bieten auch abnormale Hämoglobinmoleküle, wie bei der Sichelzellanämie, die auf den Austausch einer Aminosäure in der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins zurückzuführen sind. Auch erblich bedingter Mangel an Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, sowie Ovalozytose und Humane Leukozyten Antigene (HLA) können einen Schutz vor Malaria tropica bewirken. Dagegen erzeugen Duffy-negative Blutzellen Resistenz gegen *Plasmodium vivax* [Lucius & Loos-Frank, 1997; Sherman, 2001a; Smith *et al.*, 2002].

Wiederholte Infektionen mit *Plasmodium* bauen eine labile Immunität auf, die durch ständige Neuinfektionen aufrechterhalten wird [Lucius & Loos-Frank, 1997]. Diese Immunität ist vorwiegend gegen die Blutstadien von *Plasmodium* gerichtet und kann eine Infektion nicht verhindern. Die klinischen Symptome einer Malariaerkrankung werden aber durch diese labile Immunität unterdrückt [Playfair *et al.*, 1990; Kwiatkowsky, 1992].

Der Lebenszyklus der Malariaparasiten ist mit verschiedenen Phasen, die entweder intrazellulär in Hepatozyten oder Erythrozyten oder kurz extrazellulär sind, sehr komplex. Jede dieser Phasen ist durch die Expression phasenspezifischer Proteine charakterisiert. Deshalb werden unterschiedliche Immuneffektormechanismen mit unterschiedlicher Spezifität benötigt, um diese verschiedenartigen Formen zu

eliminieren [Li *et al.*, 2001]. Die Beseitigung von *Plasmodium* wird sowohl von erworbenen als auch angeborenen Immunmechanismen herbeigeführt. Die intrazellulären Stadien des Parasiten sind in Zellen zu finden, die Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I- und II-Moleküle exprimieren (Hepatozyten) oder denen sie fehlen (Erythrozyten). Extrazelluläre und intrazelluläre Formen von *Plasmodium* werden hauptsächlich durch antikörperabhängige erworbene Immunantworten kontrolliert, da T-Zellen die Parasitenantigene nur als von MHC-Molekülen präsentierte Peptide erkennen [Röllinghoff *et al.*, 2001].

Zusätzlich entziehen sich die intraerythrozytären Parasiten der Beseitigung durch Immunzellen der Milz, indem sie sich in verschiedene Gewebe und Organe zurückziehen. Diese Sequestration wird durch die Zytoadhärenz von parasitierten Erythrozyten an mikrovaskuläre Endothelzellen herbeigeführt. Trophozoiten und Schizonten exprimieren Oberflächenproteine wie z.B. das PfEMP-1 an der Erythrozytenoberfläche. Diese können sich an verschiedenen Endothelzellenrezeptoren, wie den Scavengerrezeptor CD36, das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), das Endothelzellenadhäsionsmolekül-1 (PECAM-1), Thrombospondin (TSP), E-Selektin oder Chondroitinsulfat binden [Roberts *et al.*, 1985; Berendt *et al.*, 1989; Ockenhouse *et al.*, 1989; 1991; Oquendo *et al.*, 1989; Baruch *et al.*, 1996; 1997; Schofield *et al.*, 1996; Siano *et al.*, 1998; Beeson *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002].

#### **1.4.1 Die Rolle von B-Zellen und Antikörpern**

Die durch wiederholte Infektionen erworbene klinische Immunität führt zur Entwicklung eines vielfältigen Antikörperrepertoires. Malariaspezifische Antikörper führen zu einer Anzahl von antiparasitischen Effektormechanismen, wie Inhibierung der Zytoadhärenz, Verhinderung der Invasion von Erythrozyten und antikörperabhängiger Zytotoxizität [Bull & Marsh, 2002; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003].

B-Zellen und Antikörper spielen eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle von erythrozytären Stadien von Malaria. B-Zell-defiziente Mäuse können zwar eine primäre akute Infektion mit *Plasmodium chabaudi* und *Plasmodium yoelli* kontrollieren, sind aber nicht fähig, die Parasiten komplett zu eliminieren. Die Entwicklung eines B-Zell-Gedächtnisses und antikörpersezernierender Plasmazellen spielt eine wichtige Rolle bei einer sekundären Malaria-Infektion [Grun & Weidanz, 1981; Yap & Stevenson, 1994;

von der Weid *et al.*, 1996; Achtman *et al.*, 2003]. Außerdem sind B-Zellen für einen Wechsel von einer  $T_H1$ - zu einer  $T_H2$ -Antwort verantwortlich [Gajewski *et al.*, 1991; Taylor-Robinson & Phillips, 1994].

Während Immunglobulin (Ig) G2a bei der Maus essentiell ist [White *et al.*, 1991], scheinen beim Menschen IgG1 und IgG3 effektiver zu sein [Groux & Gypsin, 1990]. Alle diese Immunglobuline sind zytophile Immunglobulinisotypen, die zu einer Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch den Fc-Rezeptor führen [Röllinghoff *et al.*, 2001]. Antikörper gegen die Oberfläche von parasitierten Erythrozyten führen zu einer Opsonierung dieser Zellen für die Phagozytose [Mota *et al.*, 1998]. Diese Antikörper können nicht nur ein Binden und die Sequestrierung von parasitierten Erythrozyten an bzw. in das kapillare Endothel verhindern, sie fördern auch die Entfernung der infizierten Erythrozyten durch die Milz und andere Gewebe des retikuloendothelialen Systems (RES) [Udheinya *et al.*, 1981; Jensen, 1989]. An freigesetzte Merozoiten bindende Antikörper agglutinieren die Parasiten und schützen dadurch vor einem Wiederbefall von Erythrozyten [Miller *et al.*, 1975; Green *et al.*, 1981]. Antikörper gegen Parasiten-Antigene stimulieren Monozyten zu einer exzessiven  $TNF\alpha$ -Produktion, die zu einer Wachstumshemmung von intrazellulären Parasiten in benachbarten Zellen führt [Mohan & Stevenson, 1998; Röllinghoff *et al.*, 2001].

#### 1.4.2 Die Rolle von T-Zellen

T-Zellen sind wichtig für die Entwicklung einer effektiven Immunantwort gegen Malaria [Cavacini *et al.*, 1990; Meding & Langhorne, 1991; Li *et al.*, 2001]. Zwei Stadien des Malariaparasiten sind intrazellulär: die Sporoziten, die die Hepatozyten infizieren und die asexuellen Merozoitenstadien, die in den Erythrozyten zu finden sind. Infektionen mit *Plasmodium* stimulieren sowohl  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  T-Zellen einen  $\alpha$ - oder  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor (TCR) zu exprimieren [Röllinghoff *et al.*, 2001]. Dabei sind  $\alpha\beta$  T-Zellen wichtig für die Ausbildung einer schützenden Immunität gegen *Plasmodium chabaudi* [Langhorne *et al.*, 1995].

Zur Kontrolle der Parasitenstadien in den Erythrozyten sind die  $CD4^+$  T-Zellen wichtig [Kumar *et al.*, 1989; Meding & Langhorne, 1991; Podoba & Stevenson, 1991; Amante & Good, 1997].  $CD4^+$  T-Zellen limitieren das Parasitenwachstum nicht direkt,

aktivieren aber andere Effektorzellen den Parasiten zu bekämpfen [Weidanz & Long, 1988].

Die zwei Haupt-T-Helfer-Populationen sind  $T_H1$  und  $T_H2$ . Sie kreuzregulieren die Differenzierung und Aktivierung der jeweils anderen Population durch Zytokinproduktion [Fitch *et al.*, 1993; Seder & Paul, 1994].  $T_H1$ -Zellen produzieren IL-2,  $INF\gamma$  und  $LT\alpha$ . Sie induzieren zellvermittelte Immunantworten durch Makrophagenaktivierung und verzögerte Hypersensibilität.  $INF\gamma$ , das Haupt- $T_H1$ -Effektorzytokin, verhindert die Proliferation von  $T_H2$ -Zellen. In der Maus reguliert  $INF\gamma$  ebenfalls die Produktion von zytophilen Antikörpern, wie IgG2a. Außerdem ist es in Entzündungsprozesse involviert, die Gewebeschädigungen verursachen können.  $T_H2$ -Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 und regulieren die antikörper-abhängigen Antworten. Sie produzieren ebenfalls IL-10, welches zusammen mit IL-4 und IL-13 entzündungshemmende Eigenschaften hat. Es kann durch Inhibierung der Makrophagenaktivierung als Antagonist gegen  $T_H1$ -Antworten wirken [Moore *et al.*, 1993; Mohan & Stevenson, 1998; Li *et al.*, 2001].  $T_H2$ -Zellen unterstützen B-Lymphozyten bei der Produktion von Antikörpern, wie IgM, IgG1 und IgG4. Außerdem unterstützen sie B-Zellen beim Wechsel zur IgE-Produktion [Coffman *et al.*, 1993; Mohan & Stevenson, 1998; Li *et al.*, 2001].

Sowohl  $T_H1$ - als auch  $T_H2$ -Zellen sind wichtig bei der Bekämpfung von Blutstadien von *Plasmodium chabaudi*. Im Laufe der Infektion sind sie aber unterschiedlich vertreten. So ist während der frühen akuten Phase die  $T_H1$ -Antwort dominant. Später in der Infektion überwiegt die  $T_H2$ -Antwort [Taylor-Robinson & Phillips, 1994; Mohan & Stevenson, 1998].

Normalerweise bilden Hepatozyten keine co-stimulatorischen Zytokine, die für eine Aktivierung von naiven T-Zellen nötig sind. Sporozoitenantigene werden möglicherweise von dendritischen Zellen dem MHC Klasse I präsentiert und bieten so eine Möglichkeit für die Aktivierung von  $CD8^+$  T-Zellen [Piebarski & Hill, 2000]. Die  $CD8^+$  T-Zellen fördern die Beseitigung von Leberstadien des Parasiten *Plasmodium*. Dies geschieht durch eine mögliche Produktion der Zytokine  $INF\gamma$  und  $TNF\alpha$ , die eine Produktion von Stickoxid (NO) durch die infizierten Hepatozyten induzieren [Hoffman *et al.*, 1996].

### 1.4.3 Die Rolle von Makrophagen

Die Beseitigung von Malariaparasiten wird von erworbenen und angeborenen Immunantworten gefördert. Dabei stellt die angeborene Phagozytose von *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten durch Monozyten und Makrophagen eine erste Verteidigungslinie in nichtimmunen Menschen dar [Smith *et al.*, 2002].

Als Antwort auf die Glykosylphosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker der Parasiten, die bei der Ruptur von infizierten Erythrozyten freigesetzt werden, produzieren Monozyten und Makrophagen exzessiv entzündungsfördernde Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 [Brown *et al.*, 1999; Clark & Schofield, 2000]. Immunität gegen Malaria wird mittels Phagozytose von freien Parasiten (Merozoiten) oder parasitierten Erythrozyten durch Neutrophile, Monozyten und Makrophagen und durch die Freisetzung von zytotoxischen Molekülen, wie Zytokinen, Stickoxid (NO) und reaktiven Sauerstoffintermediaten (O $_2^-$  und H $_2$ O $_2$ ) erreicht [Allison & Eugui, 1983; Brinkmann *et al.*, 1984; Clark, 1987; Clark *et al.*, 1989; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990; Boland & Berzins, 2000]. Hierbei scheint besonders die Phagozytose durch zirkulierende Neutrophile und Monozyten, sowie Gewebsmakrophagen eine wichtige Rolle zu spielen. Diese erkennen und phagozytieren die parasitenbefallenen Erythrozyten durch erworbene, durch Antikörper induzierte und angeborene Mechanismen [Trubowitz & Mazek, 1968; Celada *et al.*, 1983; Ferrante *et al.*, 1990; Schwarzer *et al.*, 1992; Turrini *et al.*, 1992; McGilvray *et al.*, 2000]. Analog zum Eliminationsmechanismus von beschädigten Erythrozyten, werden von Parasiten infizierte Erythrozyten, die durch Opsonierung (Immunglobuline oder Komplement) markiert sind, von Makrophagen erkannt und phagozytiert. Die Phagozytoserate hängt von den Entwicklungsstadien der Parasiten ab, wobei Trophozoiten und Schizonten besser phagozytiert werden als die Ringformen. Außerdem wird die Phagozytose vom Typ des Opsonins auf der Erythrozytenmembran beeinflusst.

Anders als bei opsonininduzierter Phagozytose von infizierten Erythrozyten über den Fc-Rezeptor-Weg, welche eine Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen durch Monozyten und Makrophagen induziert, führt die nichtopsonininduzierte Phagozytose nicht zu einem Anstieg von TNF $\alpha$  [McGilvray *et al.*, 2000]. Der Mechanismus für die nichtopsonininduzierte Aufnahme von Erythrozyten, die mit

asexuellen Stadien von *Plasmodium falciparum* infiziert sind, beinhaltet die Wechselwirkung zwischen von Parasiten produzierten Liganden, wie dem PfEMP-1, und dem Scavengerrezeptor CD36 auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen [Smith *et al.*, 2002]. Diese opsoninunabhängige Phagozytose kontrolliert möglicherweise die frühe Phase der Blutstadieninfektion von *Plasmodium chabaudi* [Su *et al.*, 2002].

## 1.5 Die Rolle der Milz bei der Immunität gegen Blutstadien der Malaria

Die Milz ist an Immunantworten gegen viele verschiedene Pathogene und an Autoimmunkrankheiten sowie lymphatischen Erkrankungen beteiligt [Bowdler, 1990]. Sie ist das größte Einzellymphoidorgan und beinhaltet bis zu 25 % der reifen Körperlymphozyten [Brown *et al.*, 1992].

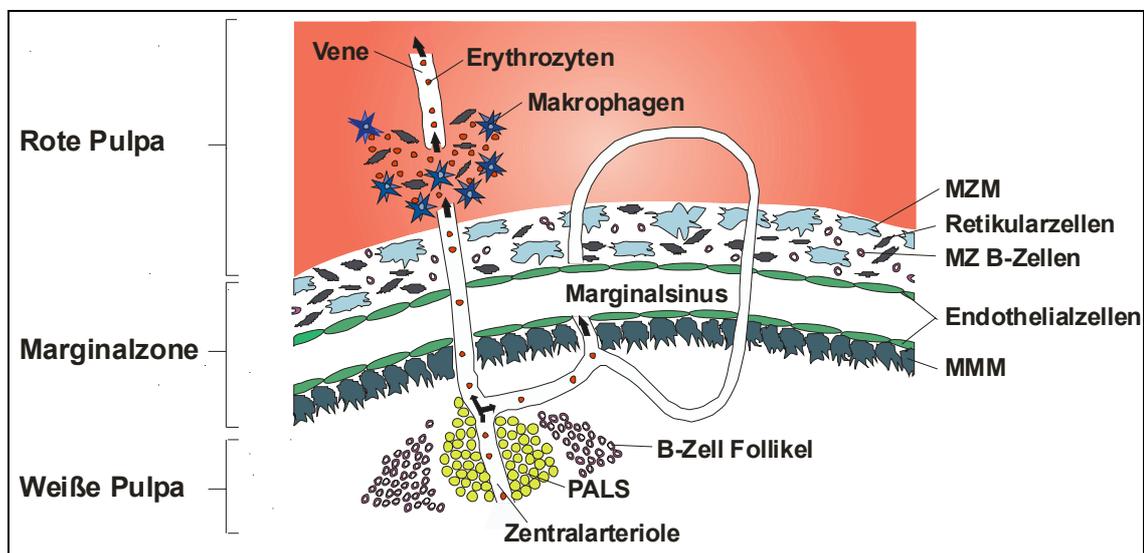
Auf makroskopischer Ebene kann die Milz in zwei Kompartimente, die rote und die weiße Pulpa, unterteilt werden (**Abbildung 1-3**) [Kraal, 1992; Fu & Chaplin, 1999].

Die rote Pulpa stellt primär einen Filter dar, durch den alte oder beschädigte Erythrozyten aus der Blutzirkulation entfernt werden. Sie besteht aus einem retikulären Netzwerk, in dem Stromazellen und eine große Population von Makrophagen zu finden sind. Außerdem beinhaltet das retikuläre Netzwerk eine variabel große Population an Plasmazellen und kann ein wichtiger Ort für die Immunglobulinproduktion sein.

In der weißen Pulpa sind Lymphozyten in Kompartimenten organisiert, in denen die Aktivierung und Reifung von antigenabhängigen B- und T-Zellen reguliert wird. Die Lymphozyten umgeben die Arteriolen, die in die Milz eintreten. Dabei liegen die T-Zellen zentral um die Arteriolen in der PALS-Region (“periarteriolar lymphoid sheath”) und die B-Zellen in Follikeln um den T-Zell-Bereich [Fu & Chaplin, 1999]. Um die weiße Pulpa liegt die Marginalzone. An der inneren Seite der Marginalzone bilden die marginalen metallophilen Makrophagen einen schmalen Ring, während die äußere Seite Marginalzonenmakrophagen und Marginalzonen-B-Zellen beheimatet [Kraal, 1992; Aichele *et al.*, 2003]. Durch diese Anordnung der spezialisierten Makrophagen und B-Zellen, die den Marginalsinus flankieren, spielt die Marginalzone eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von im Blut enthaltenen Antigenen [Nolte *et al.*, 2004]. Außerdem ist

sie für die Lenkung des Lymphozytenverkehrs in die weiße Pulpa und für die Phagozytose von Pathogenen im Blut verantwortlich [Engwerda *et al.*, 2002].

Das auffälligste anatomische Merkmal der Marginalzone ist der Sinus in den sich ein Teil des arteriellen Blutstroms fließt. Dieser marginale Sinus besteht aus einer Serie von vaskulären Zwischenräumen, die zwischen der weißen Pulpa und der eigentlichen Marginalzone liegen. Die Endothelialzellen der Kapillaren gehen kontinuierlich in die des Sinus über, in dem die Kapillaren enden. Zwischen den Endothelialzellen und der weißen Pulpa liegt eine Membran, die unterbrochen ist und so einen Übergang von Zellen zwischen der Marginalzone und der weißen Pulpa ermöglicht [Kraal, 1992].



**Abbildung 1-3 Schematischer Aufbau der Mäusemilz**

Die weiße Pulpa ist aus einer zentralen um die Zentralarteriole angeordnete T-Zell-reiche Zone ("periarteriolar lymphoid sheath" (PALS)) aufgebaut, die von B-Zell-reichen primären Follikeln umrahmt ist. Die weiße Pulpa ist durch den Marginalsinus von der roten Pulpa getrennt. Der Marginalsinus ist in eine Schicht Marginalzonenlymphozyten eingebettet. Auf der Seite der roten Pulpa befinden sich Marginalzonenmakrophagen (MZM) und Marginalzonen-B-Zellen (MZ B-Zellen). Auf der Seite der weißen Pulpa liegt eine Schicht von marginalen metallophilen Makrophagen (MMM), welche wichtig für die Regulation des Antigenaustauschs zu sein scheint. Blut fließt von der Zentralarteriole in den Marginalsinus, die Marginalzone oder die rote Pulpa, wo es in Kontakt mit Makrophagen und anderen Immuneffektorzellen kommt, bevor es in die Venen fließt. (Zusammengesetzt aus Abbildungen von Kraal, 1992; Yadava *et al.*, 1996; Fu & Chaplin, 1999)

Durch ihren Aufbau unterscheidet sich die Milz von anderen Organen. Das Blut kommt in zwei Regionen in direkten Kontakt mit Immuneffektoren, den Marginalzonenmakrophagen und dem retikulären Netzwerk der roten Pulpa, durch die das Blut auf seinem Weg zu den Sammelvenen fließt [Yadava *et al.*, 1996].

Die Milz spielt eine zentrale Rolle bei der Immunität gegen Blutstadien der Malaria [Wyler, 1983; Yap & Stevenson, 1994; Alves *et al.*, 1996]. Erstens dient sie als mechanischer Filter, welcher beschädigte oder immunologisch modifizierte Erythrozyten wie auch parasitierte Erythrozyten aussortiert. Zweitens bietet die Milz eine Umgebung für die Interaktion von Parasiten, Immunzellen und ihren Produkten während der Entstehung und Durchführung von Immuneffektormechanismen. Drittens werden in der Milz neue Blutzellen gebildet [Yap & Stevenson, 1994].

Der genaue Mechanismus, mit dem die Milz die Schutzfunktion ausübt, ist noch nicht komplett verstanden, ist aber sehr komplex [Mohan & Stevenson, 1998]. Die erste Induktion der Immunität gegen Blutstadien der Malaria scheint von der Milz auszugehen, aber auch die Leber übernimmt in Abwesenheit der Milz diese Funktion [Dockrell *et al.*, 1980].

Während einer Malaria-Infektion verändert sich die zelluläre Zusammensetzung der Milz [Yadava *et al.*, 1996]. Dabei ist eine Vermehrung von parasitenspezifischen Antikörperformenden-Zellen und eine gesteigerten Aktivierung und Ansammlung von T-Zellen zu beobachten [Langhorne & Simon-Haarhaus, 1991; Sayles & Wassom, 1991]. Außerdem kommt es zu einem merklichen Anstieg in Anzahl und Funktion der Milzmakrophagen, der durch chemotaktische Faktoren ausgelösten Immunantworten und der Zytokine, die durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen und andere aktivierte Lymphozyten produziert werden [Shear, 1989]. In Milzen von gegen *Plasmodium chabaudi* AS resistenten Mäusen konnte eine erhöhte TNF $\alpha$  und NOS2 mRNA-Expression gezeigt werden. In der Leber von nicht-resistenten Mäusen werden diese Gene hingegen nur kurz vor dem Tod verstärkt exprimiert [Jacobs *et al.*, 1985; 1996].

Eine *Plasmodium chabaudi*-Infektion bei der Maus stellt ein gutes Modell dar, um die Rolle der Milz bei einer Malaria zu untersuchen, da sich hier verschiedene Übereinstimmungen mit dem gefährlichsten menschlichen Parasiten, *Plasmodium falciparum* ergeben [Phillips *et al.*, 1997].

Untersuchungen mit *Plasmodium chabaudi adami*, *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS und *Plasmodium vinckei* haben die absolute Notwendigkeit einer intakten Milz bei der Ausbildung von primärer und sekundärer Immunität gezeigt [Grun *et al.*, 1985; Kumar *et al.*, 1989; Stevenson *et al.*, 1990; Yap *et al.*, 1994]. Die Rolle der Milz in der Effektorphase des Abtötens der Parasiten konnte durch Splenektomie bei mit *Plasmodium chabaudi adami*-infizierten Mäusen während der Krise gezeigt werden. Durch die Splenektomie kommt es zu einem erneuten Anstieg in der Parasitämie [Yadava *et al.*, 1996]. Außerdem kann durch die Transplantation von Milzen immuner Ratten ein Schutz gegen *Plasmodium berghei*-Infektionen in naiven Ratten erzeugt werden [Favila-Castillo *et al.*, 1996]. Eine Splenektomie bei immunen Mäusen führt zu einem Verlust der Immunität [Kuramar & Miller, 1990].

## 1.6 Die Rolle der Apoptose bei Malaria

Apoptose ist der natürliche Mechanismus des Zelltods, welcher zu Fragmentierung der DNA, Schrumpfen des Zytoplasmas, Änderungen der Membran, Degenerierung und Kondensation des Zellkerns und Absterben der Zelle führt [Kerr *et al.*, 1972]. Dieser Mechanismus, der auch programmierter Zelltod genannt wird, ist essentiell für die Homeostase des gesamten Organismus und spielt eine zentrale Rolle bei Prozessen von der Entwicklung bis zur Aufrechterhaltung von Körperform und -funktion.

Apoptose wird von einer Vielzahl von sowohl internen als auch externen Signalen gesteuert. Die meisten der morphologischen Veränderungen in einer Zelle, die programmierten Zelltod begeht, werden von einer Familie von Cysteinproteasen, den Caspasen, welche über eine Kaskade aktiviert werden, verursacht [Salvesen & Dixit, 1997]. Diese Enzyme haben beschränkte Targetproteine, welche normalerweise inaktiviert werden, wenn die Caspase sie schneidet. In einigen Fällen ist ein Enzyminhibitor das Target einer Caspase, so daß die letztendliche Funktion der Caspase die Aktivierung des Enzyms ist [Nicholson & Thornberry, 1997].

Während einer Immunantwort unterliegen T-Zell-Klone, die mit Antigenen wechselwirken, einer extensiven Proliferation. Wenn das Antigen eliminiert ist, muß die Anzahl der T-Zellen reduziert werden. Dies wird durch induzierte Apoptose erreicht. Das Apoptosesignal wird von den T-Zellen durch den Membranrezeptor CD95 (oder Fas) empfangen, einem Transmembranrezeptor vom Typ I. Das Todessignal wird durch den Liganden CD95L (oder FasL) gegeben, der auf lymphatischen Zellen in der späten Phase der Immunantwort exprimiert wird. Diese Elimination der T-Zellen ist ein normaler Mechanismus des An- und Ausschaltens einer Immunantwort und ein Schutz vor der Selbstbeschädigung [Van Parijs & Abbas, 1998; Sanchez-Torres *et al.*, 2001].

Auch in der Milz von mit *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infizierten Mäusen kommt es zur Apoptose. Es ergeben sich Änderungen in T-Zell-, B-Zell- und Makrophagenpopulationen in der Milz und im peripheren Blut während der akuten Blutstadieninfektion der Malaria. Die Mehrheit der apoptotischen Zellen in der Milz während der *Plasmodium chabaudi*-Infektion sind B-Zellen [Helmby *et al.*, 2000].

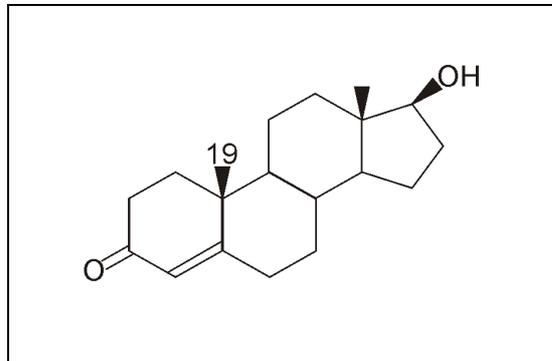
Bei vielen Infektionsarten kommt es zu einem Anstieg der Apoptose von lymphatischen Zellen. Sie kann als normale homeostatische Antwort verstanden werden, die an einem Ende der Immunantwort beteiligt ist [Van Parijs & Abbas, 1998].

Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus bei der Regulation der Entwicklung, Mutation und Aktivierung von Lymphozyten. Zusätzlich können Lymphozytenantworten durch Apoptose verhindert und beendet werden [Krammer *et al.*, 1994; Van Parijs & Abbas, 1998].

## 1.7 Die Wirkung von Testosteron bei Malaria

Androgene sind Steroidhormone, welche die Ausdifferenzierung und Reifung von männlichen Fortpflanzungsorganen, die Entwicklung von sekundären männlichen Sexualmerkmalen und die Ausbildung von männlichem Verhalten induzieren [Norman *et al.*, 1987]. Sie gehören zur Gruppe der C<sub>19</sub>-Steroide. Die chemische Bezeichnung für die C<sub>19</sub>-Steroide leitet sich von Androstan ab [Reinboth, 1980].

Die beiden bedeutendsten Androgene sind Testosteron (**Abbildung 1-4**) und 5- $\alpha$ -Dihydrotestosteron. Testosteron ist das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Androgen.



**Abbildung 1-4** Strukturformel von Testosteron

Das interstitielle Gewebe, welches bis zu 5 % des totalen Testisvolumen ausmacht, beinhaltet die primären endokrinen Zellen der Testis, die Leydig-Zellen. Diese liegen in Klustern um Blutgefäße herum, zwischen den Samenkanälchen. Unter Kontrolle des Luteinisierungshormons (LH) sind die Leydig-Zellen der Hauptbildungsort von Testosteron. Die Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER) sind der Ort der Umwandlung von Pregnenolon in Testosteron [Norman *et al.*, 1987]. Die Synthese und Ausschüttung von LH wird durch das hypothalamische Freisetzungshormon LHRH (= Luteinisierungshormon-Releasinghormon) gesteuert [Neumann, 1991]. Die im Blut zirkulierenden Androgene sind zu 70 % an ein Trägerprotein, das sexualhormonbindende Globulin (SHBG) gebunden, der Rest bis auf 2 % ist locker an Albumin gebunden. Nur die nichtgebundenen Androgene werden biologisch wirksam, denn sie können in eine Zelle aufgenommen werden [von Faber *et al.*, 1980; Neumann, 1991].

Die Regulationsmechanismen von Immunantworten sind sehr komplex und werden von einem komplizierten Netzwerk an Funktionen gesteuert. Einer dieser Faktoren sind Hormone. Androgene haben einen Einfluß auf Immunfunktion und Krankheit. Einen direkten Hinweis über den Einfluß von Androgenen gibt der sexuelle Dimorphismus der Immunfunktionen. Generell haben Frauen eine stärkere Immunantwort und höhere

Immunglobulin (IgG)-Konzentrationen als Männer [Alexander & Stimson, 1988; Brabin & Brabin, 1992].

Das männliche Hormon Testosteron beeinflusst die Fähigkeit, eine *Plasmodium chabaudi*- [Wunderlich *et al.*, 1988; 1991; Benten *et al.*, 1991; 1993; Schmitt *et al.*, 1991] oder *Plasmodium berghei*-Infektion [Kamis & Ibrahim, 1989] auszuheilen, nicht. Eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielt generell der Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC), welcher zwischen Selbst und Nicht-Selbst unterscheidet [Wunderlich *et al.*, 1988]. Weibliche Mäuse haben bei vielen Stämmen die Fähigkeit, eine *Plasmodium chabaudi*-Infektion auszuheilen. Diese Fähigkeit wird durch Gene des murine MHC, dem *H-2* Komplex, und „Non“-*H-2*-Gene kontrolliert [Wunderlich *et al.*, 1991; Mossman *et al.*, 1996].

Im Gegensatz zu seiner Wirkung in weiblichen Mäusen hat der *H-2* Komplex in männlichen Mäusen keinen Einfluß auf die Resistenz gegen *Plasmodium chabaudi*, da die Resistenz durch Testosteron unterdrückt wird [Wunderlich *et al.*, 1988]. Weiterhin gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort bei *Plasmodium chabaudi* AS-infizierten Mäusen. Diese sind auf unterschiedliche T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Zytokin-, wie INF $\gamma$ - und IL-4-, und Chemokinproduktion zurückzuführen [Zhang *et al.*, 2000].

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Der Milz kommt während einer Malariainfektion eine große Bedeutung bei der Abwehr von Parasiten zu. Ziel dieser Arbeit war eine umfassende Untersuchung und Darstellung der Veränderungen des Aufbaus und der Aufnahmekapazität der Milz während einer *Plasmodium chabaudi* Infektion.

Weiterhin sollte der Einfluß von Testosteron auf den Verlauf der Veränderungen während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion untersucht werden, da Testosteron eine Konversion der Wirtsabwehr von Resistenz zu Suszeptibilität verursacht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Falcon <sup>®</sup> 5 ml Rundbodenröhrchen, Polypropylen	Becten Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich
Fluoreszierende Polymer Microsphere Suspension, 3 µm im Durchmesser (Grün)	Ducke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, USA
Fluoreszierende Polymer Microsphere Suspension, 2,9 µm im Durchmesser (Rot)	Ducke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Linz, Österreich
Giemsa	Merck, Darmstadt
Hämatoxilin nach Mayer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Iscove's modified Dulbecco's (IMDM)- Zellkulturmedium	GIBCO-BRL, Eggenstein
May-Grünwalds Eosin Methylenblau	Merck, Darmstadt
Mounting Medium	Delta Biologicals S.r.l., Rom, Italien
P 23-Cellulose	Serva, Heidelberg
Percoll	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
RPMI 1640-Zellkulturmedium	GIBCO-BRL, Eggenstein
Seesand	Merck, Darmstadt
Sephadex G 25 und P 23 Cellulose	Servacel, Heidelberg

---

SuperFrost <sup>®</sup> Plus Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig
Testosteron (Testoviron-Depot-50)	Schering, Berlin
Testosteron	Steraloids über Paesel & Lorei GmbH & Co., Hanau
Tissue-Tek <sup>®</sup> Cryomold <sup>®</sup> Intermediate	Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, Niederlande
Tissue-Tek <sup>®</sup> O.C.T <sup>™</sup> Compound	Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, Niederlande
Tumor necrosis factor- $\alpha$ , mouse (mTNF- $\alpha$ )	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Yeast Nitrogen Base	GIBCO-BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe

Sonstige Laborchemikalien:

Fluka, Neu Ulm; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg

## 2.2 Lösungen und Puffer

Aminosäure-Mix für SD+12 Medium:	224 mg Adenin 768 mg Uracil 768 mg Histidin 768 mg Tryptophan 768 mg Arginin 288 mg Tyrosin 1152 mg Leucin 1152 mg Isoleucin 1152 mg Lysin 960 mg Phenylalanin 1152 mg Valin 1152 mg Threonin ad 1 l H <sub>2</sub> O (bidest.), sterilfiltrieren
Annexin V Labeling Puffer:	10 mM Hepes 8 g NaCl 0,28 g CaCl <sub>2</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O (bidest.)
1 % BSA-Lösung:	1 % BSA (Fraction V) ad 1 l PBS <sup>+</sup>
CPD-Puffer:	34,7 g Natriumcitrat 0,7 g Zitronensäure 22,5 g D-Glukose 1,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O ad 1 l H <sub>2</sub> O (bidest.), pH 7,2
Einfrüermedium (für Säugerzellen):	70 % Kulturmedium (v/v) 20 % FCS (v/v) 10 % DMSO (v/v)
Ethanolische KOH-Lösung:	3 g KOH 0,5 g Tween-80 ad 100 ml Ethanol

Hypotonischer Puffer:	140 mM $\text{NH}_4\text{Cl}$ 17 mM Tris ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$ (bidest.), pH 7,2
$\text{PBS}^-$ :	8 g NaCl 0,2 g KCl 1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$ (bidest.), pH 7,2
$\text{PBS}^+$ :	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	<hr/>
	0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ getrennt lösen, anschließend mischen ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$ (bidest.), pH 7,2
$\text{PBS}^-$ Hg-Konzentrat:	8 g NaCl 0,2 g KCl 1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,15 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 22,5 g Glukose $\times \text{H}_2\text{O}$ ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}$ (bidest.), pH 7,2
Percoll-Stufe:	12 ml Percoll 1,33 ml $\text{PBS}^-$ Hg-Konzentrat auf 82 % verdünnen mit 2,93 ml $\text{PBS}^-$ Hg (3% FCS), pH 7,2

SD+12 Minimalmedium:	20 g Glukose 950 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) autoklavieren 1,7 g Yeast Nitrogen Base 5 g Ammoniumsulfat 50 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) beide Lösungen zusammenfügen, sterilfiltrieren 50 ml Aminosäure-Mix für SD+12 Medium zufügen
SD+12 Platten:	20 g Glukose 15 g Agar 950 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) autoklavieren 1,7 g Yeast Nitrogen Base 5 g Ammoniumsulfat 50 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) beide Lösungen zusammenfügen, sterilfiltrieren 50 ml Aminosäure-Mix für SD+12 Medium zufügen
Sörensen-Puffer:	0,49 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O (bidest.), pH 6,8
0,1 % Triton X-100 Lösung:	10 g Triton X-100 ad 1 l H <sub>2</sub> O (bidest.)
Wässriger Phosphatpuffer:	22,9 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 800 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) 5,88 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 200 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) beide Lösungen mischen und 28,6 ml des Gemisches zu 1 l H <sub>2</sub> O (bidest.) geben

## 2.3 Antikörper

**Tabelle 2.1** *Verwendete Antikörper für FACS und Fluoreszenzmikroskopie*  
 Mitaufgeführt sind die Verdünnungen für den jeweiligen Verwendungszweck

<b>Erstantikörper:</b>	<b>Verdünnungen:</b>
<b>Monoklonaler Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierter Ratten Anti-Maus CD4 Antikörper (L3T4)</b> (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)	Durchflußzytometrie: 1:100  Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:20
<b>Monoklonaler Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierter Ratten Anti-Maus CD8a Antikörper (Ly-2)</b> (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)	Durchflußzytometrie: 1:100  Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:20
<b>Monoklonaler Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierter Ratten Anti-Maus F4/80 Antikörper (Makrophagen)</b> (AMS Biotechnology GmbH, Wiesbaden, Deutschland)	Durchflußzytometrie: 1:50  Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:50
<b>Monoklonaler Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierter Ratten Anti-Maus CD45R/B220 Antikörper</b> (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)	Durchflußzytometrie: 1:100  Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:100
<b>Monoklonaler Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierter Ratten Anti-Maus Ly-6G und Ly-6C Antikörper (Gr-1)</b> (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)	Durchflußzytometrie: 1:100  Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:100
<b>Monoklonaler Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierter Ratten Anti-Maus CD244.2 Antikörper (2B4 B6 Alloantigen)</b> (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)	Durchflußzytometrie: 1:100
<b>Monoklonaler Ratten Anti-Maus MOMA 1 Antikörper (Metallophile Makrophagen)</b> (BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz)	Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:100
<b>Monoklonaler Ratten Anti-Maus Biotin-konjugierter ER-TR9 Antikörper (Marginalzonenmakrophagen [SIGN-R1])</b> (BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz)	Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:50

<b><u>Erstantikörper</u></b>	<b>Verdünnungen</b>
<b>Monoklonaler Ratten Anti-Maus ER-TR7 Antikörper (Retikuläre Fibroblasten und Retikuläre Fasern)</b> (BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz)	Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:100
<b>Monoklonaler Ratten Anti-Maus CD169 Antikörper (Sialoadhesin [Siglec-1])</b> (Serotec GmbH, Düsseldorf)	Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:100

<b><u>Zweitantikörper:</u></b>	<b>Verdünnungen:</b>
<b>Biotin-SP konjugiertes AffiniPure Maus Anti-Ratten IgG (H+L Ketten spezifisch)</b> (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)	Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:100

## 2.4 Spezifische Reagenzien für FACS und Fluoreszenzmikroskopie

**Tabelle 2.2** *Verwendete spezifische Reagenzien für FACS und Fluoreszenzmikroskopie*  
Mitaufgeführt sind die Verdünnungen für den jeweiligen Verwendungszweck

<b><u>Reagenz:</u></b>	<b>Verdünnungen:</b>
<b>Annexin V, Alexa Fluor® 568 Konjugat</b> (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)	Durchflußzytometrie: 1:2 in 7AAD
<b>7-AAD (7-ActinomycinD) Färbelösung</b> (BD PharMingen, Heidelberg)	Durchflußzytometrie: 1:0,5 in Annexin V
<b>Alexa Fluor® 488 Streptavidin Konjugat</b> (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)	Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:100

<b>Reagenz:</b>	<b>Verdünnungen:</b>
<b>Aufgereinigter monoklonaler Ratten Anti-Maus CD16/CD32 (FcγIII/II Rezeptor) Antikörper (Mouse BD Fc Block™)</b> (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)	Durchflußzytometrie: 1:200  Immunfluoreszenz- mikroskopie: 1:200

## 2.5 Zellkulturlinie

**Tabelle 2.3: Verwendete immortalisierte Säugerzelllinie**

Mit aufgeführt sind die Register-Nummer der ATCC, der Organismus, das Gewebe und der Zelltyp

Zelllinie	Registrier-Nr.	Organismus	Gewebe	Zelltyp
RAW 264.7	ATCC: TIB-71	Maus (BALB/c)	Tumor Gewebe	Makrophage

## 2.6 Hefestamm

**Tabelle 2.4: Verwendeter *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm**

Mit aufgeführt sind der Genotyp und die Quelle

Stamm	Genotyp	Quelle
YSH19	MAT $\alpha$ ura3-52 ade2-101 trp1 $\Delta$ 63 his3 $\Delta$ 200 lys2-801 leu2 $\Delta$ 1 cyh <sup>R2</sup> CF[CEN6 yEGFP3 CYH <sup>2</sup> URA3 SUP11]	YSH13 $\times$ YSH2 $\alpha$

## 2.7 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 sowie des Auszuchtstammes NMRI aus der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine Universität verwendet. Außerdem wurden die auf einen C57BL/6 genetischen Hintergrund vorhandenen Knockout-Mäuse LT $\beta$ R<sup>-/-</sup> [Fütterer *et al.*, 1998] aus der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine Universität, TNFR1<sup>-/-</sup> [McKee *et al.*, 2002], TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> [Korner *et al.*, 1997] sowie Hox11<sup>-/-</sup> [Dear *et al.*, 1995] auf einem C57BL/6  $\times$  129SV Background aus dem Max-Planck-Institut Freiburg verwendet. Die

Tiere wurden in Kunststoff-Käfigen gehalten und mit der Standarddiät Nohrlin 10H10 (Nohrlin, Bad Salzuflen) sowie mit Wasser *ad libitum* ernährt.

## **2.8 Parasiteninfektion**

Bei den Experimenten wurde der Malaria-Erreger *Plasmodium chabaudi* eingesetzt, der ursprünglich aus dem National Institute of Research, Mill Hill, London, UK stammt und in der Abteilung für Molekulare Parasitologie seit Jahren durch Passage von infiziertem Blut in NMRI-Mäusen gehalten wird.

### **2.8.1 Infektion mit dem Malaria-Erreger *Plasmodium chabaudi***

*Plasmodium* Parasiten wurden wöchentlich auf naive NMRI-Mäuse übertragen [Wunderlich *et al.*, 1982]. Die Parasitämie wurde durch einen Ausstrich mit einem aus der Schwanzspitze entnommenen Blutropfen bestimmt. Der getrocknete Ausstrich wurde 3 Minuten mit May-Grünwald-Färbelösung überschichtet. Diese wurde anschließend mit etwa einem Volumen Sörensen-Puffer verdünnt. Nach weiteren 3 Minuten wurde die Färbelösung abgeschüttet und der Ausstrich für 5 Minuten mit Giemsa-Sörensen-Lösung überschichtet, dann getrocknet und unter dem Mikroskop (Leica DM LB, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) ausgezählt.

### **2.8.2 Isolation von infizierten Erythrozyten**

*P. chabaudi*-infizierte NMRI-Mäuse wurden bei einer Parasitämie von 30 – 50 % mit Diethylether narkotisiert. Das Blut wurde mit einer mit CPD / 3 % FCS gespülten Pasteurpipette aus dem retrobitalen Plexus entnommen und mit CPD/3 % FCS verdünnt. Um die Erythrozyten von Leukozyten und Blutplättchen zu trennen, wurde das Gesamtblut auf eine Säule aufgetragen, die ein 1:1 Gemisch aus Sephadex G 25 (Sigma, München) und Servacel (P 23-Cellulose, Serva, Heidelberg) enthielt [Nakato *et al.*, 1973], und mit CPD / 3 % FCS von der Säule eluiert. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 3000 rpm (Heraeus Multifuge 3<sub>L-R</sub>) wurde das Pellet, welches sowohl infizierte als auch nicht-infizierte Erythrozyten enthielt, in etwa 5 ml PBSHG / 3 % FCS resuspendiert.

Aliquots von etwa 1 ml wurden über 20 ml einer 83%igen Percoll-Lösung geschichtet und für 20 Minuten bei 5000 rpm ohne Bremse zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3<sub>L-R</sub>). Die parasitierten Erythrozyten wurden auf diese Weise mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 90 – 98 % über der Percoll-Stufe angereichert [Wunderlich, *et al.*, 1985].

## 2.9 Testosteron-Behandlung von C57BL/6-Weibchen

Nicht-immune Mäuse wurden mit Testosteron (Testoviron-Depot-50, Schering, Berlin) behandelt. Über einen Zeitraum von 3 Wochen wurden zweimal wöchentlich 0,9 mg Testosteron in 100:1 Sesamöl (Roth, Karlsruhe) subkutan appliziert. Dabei wurden die Tiere ruhig gestellt, indem sie leicht mit Diethylether narkotisiert wurden. Kontrolltiere wurden nur mit Sesamöl behandelt [Benten *et al.*, 1991]. Nach der Behandlung erfolgte die Infektion mit  $1 \times 10^6$  *Plasmodium chabaudi*-parasitierten Erythrozyten.

## 2.10 TNF $\alpha$ -Behandlung von C57BL/6-Weibchen

Nicht-immune Mäuse wurden mit murinem TNF $\alpha$  (Roche, Mannheim) behandelt. Über einen Zeitraum von 3 Tagen wurden täglich  $10^4$  U bzw.  $10^5$  U TNF $\alpha$  in PBS<sup>-</sup> versetzt mit 1 mg / ml BSA (Fraction V) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Dabei wurden die Tiere ruhig gestellt, indem sie leicht mit Diethylether narkotisiert wurden.

## 2.11 Zellkultur

Alle Geräte, die in der Zellkultur Verwendung fanden, wurden entweder 20 min bei 120 °C autoklaviert oder wurden direkt unter der Sterilbank aus ihrer sterilen Verpackung entnommen. Verwendete Mediumflaschen wurden ausschließlich für die Zellkultur verwendet, um das Risiko von Kontaminationen so gering wie möglich zu halten.

### 2.11.1 Herstellung von CSCS

Für die Herstellung von CSCS wurden 500 ml FCS (PAA, Österreich) mit 1 g Aktivkohle und 0,1 g Dextran für 30 min bei 56 °C geschüttelt und anschließend 1 h bei

RT und  $4000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde ein zweites Mal mit Aktivkohle (1 g) und Dextran (0,1 g) wie oben beschrieben bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  geschüttelt. Nach einer erneuten 1stündigen Zentrifugation mit  $4000 \times g$  wurde der Überstand mittels eines Filters ( $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  Porengröße) sterilisiert, aliquotiert und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.11.2 Kultivierung der Makrophagenzelllinie**

Die immortalisierte Zelllinie RAW 264.7 wurde in 110 mm Gewebekulturschalen (Greiner, Solingen) in einem Volumen von 10 ml Kulturmedium bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Hotpack 740) kultiviert.

Ein Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage mit auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgewärmtem Medium durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 70-90 % Konfluenz subkultiviert. Dies erfolgte alle 2-3 Tage. Hierzu wurden die Zellen in 5 ml frischem Medium mit einem Zellschaber von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst und nach kurzem Resuspendieren je nach Bedarf 1:5 bis 1:10 auf neue Kulturgefäße verteilt.

### **2.11.3 Kryokonservierung von Zellen**

Für die Langzeitlagerung wurden die Zelllinien bei  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wie bereits in **Kapitel 2.11.2** beschrieben, isoliert und bei 1200 rpm ( $\sim 300 \times g$ ) für 10 min in einer Beckman GPKR Zentrifuge (Beckman, München) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert, auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und in Kryoröhrchen mit Schraubverschluß (Nunc, Wiesbaden) überführt. Diese Kryoröhrchen wurden in einen auf  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgekühlten Stratacooler (Stratagene, Heidelberg) überführt und über Nacht bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  langsam eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann in flüssigen Stickstoff ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) eingelagert.

### **2.11.4 Auftauen von Zellen**

Für die Reaktivierung wurden die eingefrorenen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff direkt in einem  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -Wasserbad aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Nach 10 minütiger Pelletierung bei 1200 rpm und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde der Überstand

entfernt, das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und auf eine 110 mm Gewebekulturschale gegeben. Nach 24 h wurde die Kultur mit einem Inversmikroskop (Zeiss, Oberkochen) begutachtet und entweder subkultiviert oder mit frischem Medium versetzt.

## **2.12 Durchflußzytometrie**

### **2.12.1 Isolation von Milzzellen**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Milzen steril entnommen und durch ein Sieb in RPMI-Zellkulturmedium (GIBCO, Eggenstein, versetzt mit 5 % FCS (PAA, Österreich), gestrichen. Anschließend wurden die Erythrozyten durch zweimalige Lyse mit NH<sub>4</sub>Cl entfernt [Benten *et al.*, 1991] und die Gesamtanzahl der Leukozyten in einer Neubauerkammer bestimmt.

### **2.12.2 Quantifizierung von Milzzellpopulationen**

Die Milzleukozyten wurden mit anti-CD16/CD32 (FcIII/II Rezeptor) Fc Block für 15 Minuten vorinkubiert und anschließend eine Stunde mit einem der folgenden FITC-markierten monoklonalen Antikörper anti-Maus CD45R/B220 (Klon RA3-6B2), anti-Maus CD4 (H129.19), anti-Maus CD8a (53-6.7), anti-Maus CD244.2 (2B4), anti-Maus Gr-1 (RB6-8C5) (alle BD PharMingen, Heidelberg) und anti-Maus F4/80 (C1:A3-1) (ImmunoKontakt, Wiesbaden) behandelt. Für die FACS-Analyse wurden jeweils 10000 Zellen auf der Basis von „Forward“- und „Sideward-Scatter“ ausgezählt. Die Daten wurden mit Cell Quest Pro (BD Bioscience, Heidelberg) aufgenommen, gespeichert und ausgewertet.

### **2.12.3 Bestimmung von apoptotischen Zellen**

Die gefärbten Milzleukozyten wurden mit Annexin V konjugiert mit Alexa Fluor 588 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und 7-AAD (BD PharMingen, Heidelberg) bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert und anschließend direkt im FACSlibur (BD Biosciences, Heidelberg), wie bereits beschrieben (**Kapitel 2.12.2**), gemessen.

## 2.13 Filtrationskapazität der Milz

### 2.13.1 Bestimmung der Filtrationskapazität

Jede Maus wurde mit Diethylether betäubt und gewogen, bevor  $1,3 \times 10^8$  in 200  $\mu$ l PBS resuspendierte grün fluoreszierende "Beads" (Duke Scientific, USA) mit einem Durchmesser von 3  $\mu$ m in den retroorbitalen Plexus injiziert wurden [Pinkerton & Webber, 1964]. 5 Minuten nach der Injektion wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen und gewogen. Ein Stückchen wurde in ein 10 ml Reaktionsgefäß (Greiner, Solingen) mit 30 % Saccharose überführt und mehrere Stunden bei 4 °C inkubiert, bis es auf den Boden des Röhrchens sedimentiert war. Dann wurde das Milzstückchen in einem Tissue-Tek<sup>®</sup> Kryoschälchen (Sakura Finetek Europe BV, Niederlande) mit Tissue-Tek<sup>®</sup> OCT-Medium (Sakura Finetek Europe BV, Niederlande) auf Trockeneis eingefroren. Die restliche Milz wurde erneut gewogen und in 1 ml ethanolischer KOH-Lösung mit einem Glasstempel zerkleinert. Anschließend wurden weitere 7 ml ethanolischer KOH-Lösung zugegeben. Um den Verlust während der Extraktion zu kontrollieren, wurden  $5 \times 10^5$  rot fluoreszierenden "Beads" (2,9  $\mu$ m Durchmesser, Duke Scientific, USA) zugegeben. Anschließend wurden die Gewebe durch 48stündiges Schütteln bei 50 °C mit zwischenzeitlichem Durchmischen aufgelöst. Die Proben wurden 20 Minuten mit  $2000 \times g$  bei 20 °C zentrifugiert, das Pellet mit den "Beads" erst mit 8 ml Triton X-100, dann mit 8 ml Phosphatpuffer gewaschen und schließlich in 1 ml H<sub>2</sub>O (bidest.) resuspendiert. Die Fluoreszenzintensität wurde in einem Lumineszenz Spektrometer (Perkin Elmer LS 55, Langen) unter Verwendung einer 10  $\times$  2 mm Quarzpräzisionsküvette (Hellma, Müllheim) bei den Anregungs- / Emissionswellenlängen (450/480 für grün) und (520/590 für rot) gemessen. Die Anzahl der grün fluoreszierenden "Beads" in der Milz wurden anhand von Standardkurven aus einer Verdünnungsreihe der roten und grünen "Beads" berechnet.

## 2.14 *In vivo* Erythrophagozytose

### 2.14.1 Färben von Erythrozyten

Die infizierten Erythrozyten wurden, wie in **Kapitel 2.8.2** beschrieben, isoliert. Anschließend wurden sie in 1 ml Diluent C (Sigma, München) resuspendiert und mit 4  $\mu$ l PKH26 (Sigma, München) in 996  $\mu$ l Diluent C gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 2 ml 1%iger BSA-Lösung und 1minütiger Inkubation gestoppt. Die gestoppte Probe wurde mit 4 ml IMDM-Zellkulturmedium mit 5 % FCS (PAA, Österreich) verdünnt und für 10 Minuten bei 3000 rpm (Heraeus Multifuge 3<sub>L-R</sub>) bei 25 °C zentrifugiert. Es erfolgten 2 weitere Waschschrte mit dem Kulturmedium und ein abschließender Waschschrte in PBS<sup>+</sup>. Dann wurden die gefärbten Erythrozyten auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^9$  in 200  $\mu$ l PBS<sup>+</sup> eingestellt.

### 2.14.2 *In vivo* Erythrophagozytose

Nach Betäubung der Mäuse mit Diethylether wurden  $1 \times 10^9$  PKH26-gefärbte Erythrozyten in den retroorbitalen Plexus injiziert. 30 Minuten nach der Injektion wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Die Organe wurden in Stückchen geschnitten und in ein 10 ml Reaktionsgefäß (Greiner, Solingen) mit 30 % Saccharose überführt. Sie wurden mehrere Stunden bei 4 °C inkubiert, bis sie auf den Boden des Röhrchens sedimentiert waren. Dann wurden die Milzstückchen in Tissue-Tek<sup>®</sup> Kryoschälchen (Sakura Finetek Europe BV, Niederlande) mit Tissue-Tek<sup>®</sup> OCT-Medium (Sakura Finetek Europe BV, Niederlande) auf Trockeneis eingefroren.

### 2.14.3 Kryoschnitte

Mit Hilfe eines Kryostaten (Leica CM 3050S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) wurden 10  $\mu$ m dicke Kryoschnitte angefertigt und auf Superfrost<sup>®</sup>Plus-Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen und bei 4 °C über Nacht gelagert.

#### **2.14.4 *In situ* Antikörperfärbung von Kryoschnitten**

Die Kryoschnitte wurden 20 Minuten mit 1 % Paraformaldehyd in PBS<sup>-</sup> fixiert und anschließend 3 Minuten mit PBS<sup>+</sup> gespült. Zum Absättigen der Fc-Rezeptoren wurden die Schnitte für 20 Minuten mit anti-CD16/CD32 (FcIII/II Rezeptor) Fc-Block inkubiert und dann wiederum 2 × 2 Minuten mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Die Antikörperfärbung erfolgte in einer lichtdichten feuchten Kammer für eine Stunde. Hierfür wurden die Antikörper mit PBS<sup>+</sup> verdünnt, wie in **Kapitel 2.3** angegeben. Die ungebundenen Antikörper wurden anschließend durch zweimaliges Waschen von jeweils 2 Minuten in PBS<sup>+</sup> entfernt. Zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals der Antikörper wurden die Kryoschnitte für 20 Minuten mit Biotin konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert, 2 × 2 Minuten in PBS<sup>+</sup> gespült und anschließend 20 Minuten mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Streptavidin Konjugat gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Kryoschnitte mit Mounting Medium eingedeckelt und im Konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica DM RBE mit Leica TCS NT-Aufsatz, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) betrachtet und fotografiert.

#### **2.14.5 Hämatoxylinfärbung von Kryoschnitten**

Die Kryoschnitte wurden 20 Minuten mit 1 % Paraformaldehyd in PBS<sup>-</sup> fixiert und anschließend 3 Minuten mit PBS<sup>+</sup> gespült. Dann wurden die Schnitte 50 Sekunden mit Hämatoxylin nach Mayer (Sigma, München) gefärbt. Überschüssige Farbe wurde durch zweimaliges Waschen in H<sub>2</sub>O (bidest.) entfernt. Anschließend wurden die Schnitte mit Mounting Medium eingedeckelt und im Mikroskop (Leica DM LB, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) betrachtet und fotografiert.

### **2.15 Phagozytose durch Makrophagen**

#### **2.15.1 Erythrophagozytose durch Makrophagen**

##### 2.15.1.1 Färben von Erythrozyten

Das Färben der Erythrozyten erfolgte wie im **Kapitel 2.14.1** beschrieben. Abgeändert wurde nur der letzte Waschschrift. Dieser erfolgte ebenfalls in IMDM-

Zellkulturmedium. Dann wurden die gefärbten Erythrozyten auf eine Zellzahl von  $0,5 \times 10^8$  pro  $\mu\text{l}$  in Zellkulturmedium eingestellt.

#### 2.15.1.2 Testosteronbehandlung von RAW 264.7-Makrophagen

24 Stunden vor dem Versuch wurden die RAW 264.7-Zellen in 1 ml IMDM-Zellkulturmedium mit 5 % FCS mit einer Zelldichte von  $1,8 \times 10^5$  auf 35 mm Zellkulturschalen (Greiner, Solingen) ausgesät und etwa 6 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Hotpack 740) kultiviert. Anschließend wurden sie zweimal mit vorgewärmtem PBS- auf den Platten gewaschen und mit 1 ml IMDM-Zellkulturmedium mit 5 % CSCS versetzt und für 18 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Hotpack 740) kultiviert. Am Morgen des Versuchstages wurden die Zellen auf eine Testosteronendkonzentration von  $1 \times 10^{-8}$  M eingestellt und für 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert.

#### 2.15.1.3 Erythrophagozytose durch RAW 264.7-Makrophagen

Zu den mit Testosteron vorbehandelten und zu vorher unbehandelten RAW 264.7 Makrophagen wurden  $0,5 \times 10^8$  PKH26 gefärbte malariainfizierte bzw. nicht-infizierte Erythrozyten gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C bzw. 4 °C für 3 Stunden inkubiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und durch 1 ml Hypotonischen Puffer ersetzt. Nach 5minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Hypotonische Puffer entfernt und die Zellen zweimal mit PBS<sup>+</sup> gewaschen, von der Platte geschabt und in 5 ml Falcon<sup>®</sup> Rundbodenröhrchen (Becton Dickinson Labware Europe, Frankreich) überführt. Die Zellen wurden 8 Minuten bei 1200 rpm in einer Beckman GPKR Zentrifuge (Beckman, München) pelletiert, in 500  $\mu\text{l}$  PBS<sup>+</sup> resuspendiert und im FACScan (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen. Für die FACS-Analyse wurden jeweils 10000 gatede Zellen auf der Basis von „Forward“- und „Sideward-Scatter“ ausgezählt. Die Daten wurden mit Cell Quest Pro (BD Biosciences, Heidelberg) aufgenommen, gespeichert und ausgewertet.

Zur Überprüfung der vollständigen Lyse wurden Zellen auf einen SuperFrost<sup>®</sup>Plus-Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig) gespottet und mikroskopiert (Leica LB DM, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim).

## 2.15.2 Phagozytose von Hefe

### 2.15.2.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe YSH19 (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde in 100 ml vorgewärmtem SD+12 Minimalmedium über Nacht im Inkubator bei 30 °C und 250 rpm herangezogen.

### 2.15.2.2 Phagozytose von *Saccharomyces cerevisiae*

24 Stunden vor dem Versuch wurden die RAW 264.7-Zellen, wie in **Kapitel 2.15.1.2** beschrieben, ausgesät und kultiviert. Dann wurden zu den RAW 264.7 Makrophagen  $0,5 \times 10^8$  Hefezellen gegeben und die Zellen 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit PBS<sup>+</sup> gewaschen, von der Platte geschabt und auf SuperFrost®Plus-Objekträger (Menzel GmbH, Braunschweig) gespottet und mikroskopiert (Leica DM LB, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim).

## 2.16 Mikroskopie

### 2.16.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Leica DM LB Mikroskop mit Leica DC 300F Kameraaufsatz (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) verwendet.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden dabei ein FITC und ein TRITC Filtersatz eingesetzt.

Die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Leica IM500 Software, Version 1.20 (Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz), Adobe Photoshop® 7.0 und Corel Draw® 11.0.

### 2.16.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde mit einem Leica DM RBE Mikroskop mit TCS NT-Aufsatz, Version 1.5.451 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) durchgeführt. Die Fluoreszenz des Farbstoffes Alexa Fluor® 488 wurde bei

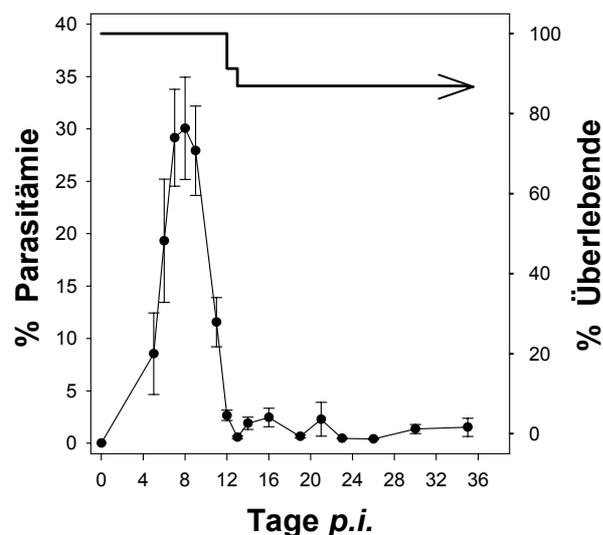
einer Anregungswellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Laser, die für PKH26 bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm mit einem Krypton-Laser angeregt. Die Schnitte wurden mit einer Auflösung von  $1024 \times 1024$  Pixel gescannt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop<sup>®</sup> 7.0 und Corel Draw<sup>®</sup> 11.0.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Milz als Effektor gegen Malaria

#### 3.1.1 Verlauf einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion

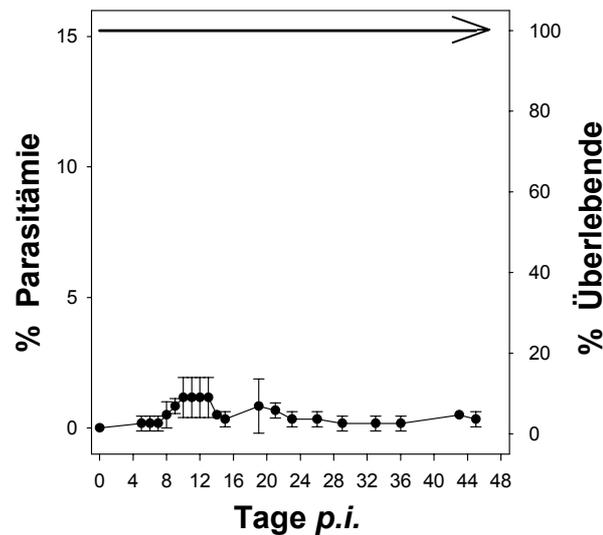
Weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 mit einer intakten Milz sind resistent gegen eine *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS Infektion und können den Parasiten innerhalb von vier Wochen eliminieren [Stevenson *et al.*, 1989]. Eine Infektion mit  $10^6$  *Plasmodium chabaudi*-parasitierten Erythrozyten des in unserem Labor verwendeten *Plasmodium chabaudi* Stammes wird bei über 80 % der Mäuse vollständig ausgeheilt. Wie die **Abbildung 3-1** zeigt, endet die Zeit steigender Parasitämie, die sogenannte Präkrise, mit einem fulminanten Maximum der Parasitämie von etwa 30 % am Tag 8 der Infektion. Die anschließende Krise ist durch eine schnell zurückgehende Parasitämie auf unter 1 % am Tag 12-13 *p.i.* charakterisiert. Nach einem zweiten und dritten, jeweils kaum merklichen Maximum am Tag 16 und 21 *p.i.*, sind keine Parasiten mehr im peripheren Blut zu finden.



**Abbildung 3-1:** Durchschnittliche Parasitämie- und Überlebensrate nach einer Infektion von weiblichen naiven C57BL/6-Mäusen (n=12) mit  $10^6$  *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten.

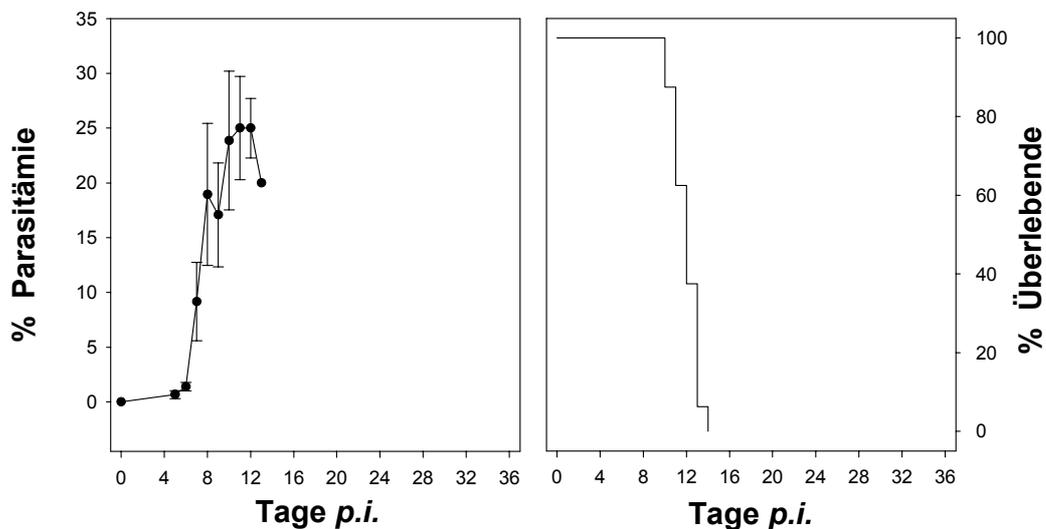
Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Reinfiziert man weibliche C57BL/6-Mäuse, die eine *Plasmodium chabaudi*-Infektion ausgeheilt haben, kommt es nur noch zu einer geringen Parasitämie von unter 2 %, wie in **Abbildung 3-2** zu sehen ist. Die Mäuse sind immun und zeigen keine malarientypischen Fieberschübe mehr. Nach 46 Tagen sind kaum noch Parasiten im peripheren Blut zu finden.



**Abbildung 3-2:** Durchschnittliche Parasitämie- und Überlebensrate nach einer Infektion von weiblichen immunen C57BL/6-Mäusen (n=2) mit  $10^6$  *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten.

Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

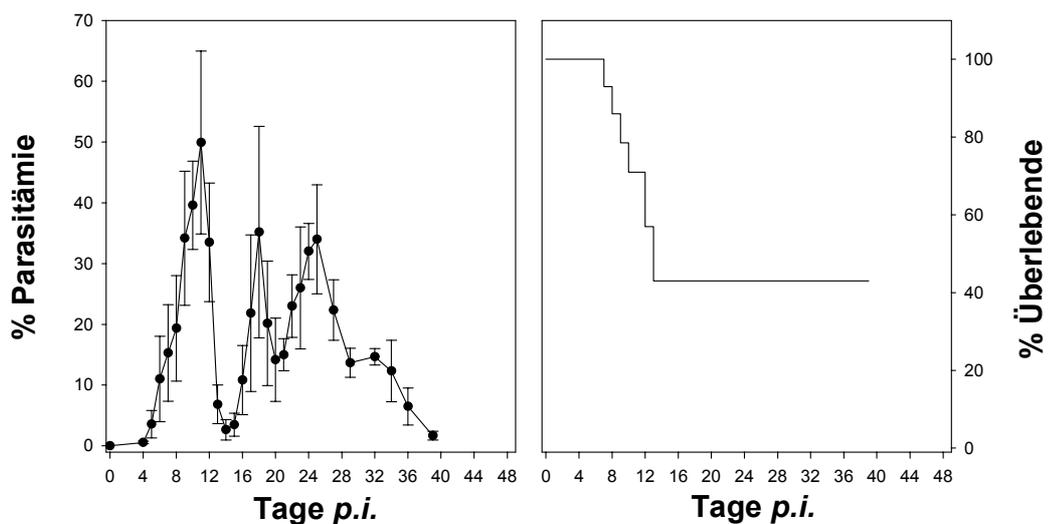


**Abbildung 3-3:** Durchschnittliche Parasitämie- (linker Graph) und Überlebensrate (rechter Graph) nach einer Infektion von weiblichen *Hox11*<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=8) mit  $10^6$  *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten.

Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Hox11<sup>-/-</sup>-Mäuse haben keine Milz [Roberts *et al.*, 1994]. Werden Weibchen mit 10<sup>6</sup> *Plasmodium chabaudi*-parasitierten Erythrozyten infiziert, kommt es, wie **Abbildung 3-3** zeigt, zu einem Anstieg der Parasitämie mit einem Maximum von etwa 25 % am Tag 11 bis 12 *p.i.*. Mit dem Erreichen des „Peaks“ sterben die Hox11<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Bei entmilzten weiblichen C57BL/6-Mäusen (**Abbildung 3-4**), endet die Zeit bis zur Krise mit einem fulminanten Maximum der Parasitämie von etwa 50 % am Tag 10 bis 12 der Infektion. Die anschließende Krise ist durch eine schnell zurückgehende Parasitämie auf 2 bis 3 % am Tag 14-15 *p.i.* charakterisiert, es sterben in dieser Phase jedoch über 50 % der Tiere. Anders als bei den unbehandelten C57BL/6-Mäusen (**Abbildung 3-1**) zeigen die überlebenden entmilzten C57BL/6-Mäuse jeweils ein deutliches zweites und drittes Maximum an den Tagen 18 und 25 *p.i.* mit Parasitämien um 35 %.

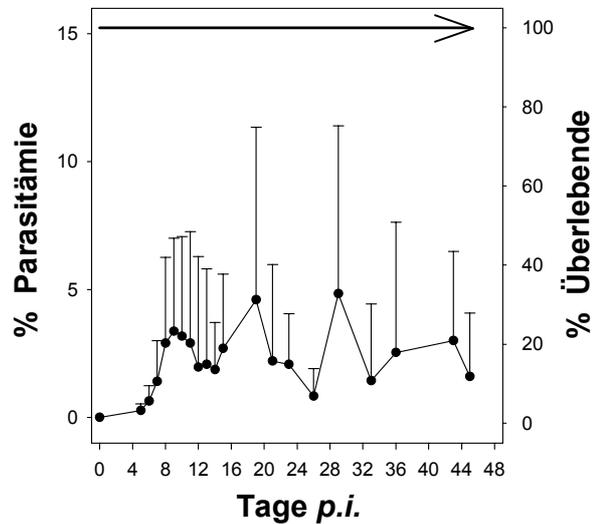


**Abbildung 3-4** Durchschnittliche Parasitämie- und Überlebensrate nach einer Infektion von weiblichen naiven entmilzten C57BL/6-Mäusen (n=7) mit 10<sup>6</sup> *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten

Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

Werden weibliche C57BL/6-Mäuse, nachdem sie eine *Plasmodium chabaudi*-Infektion ausgeheilt haben, entmilzt und mit 10<sup>6</sup> *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten reinfiziert, kommt es nur zu einer geringen Zunahme in der Parasitämie (**Abbildung 3-5**). Sie ist mit bis zu 5 % aber höher als die Parasitämie von immunen Mäusen mit

einer intakten Milz. Auch nach 46 Tagen *p.i.* sind noch Parasiten im peripheren Blut zu finden. Trotz des Fehlens der Milz überleben die Mäuse die Infektion.



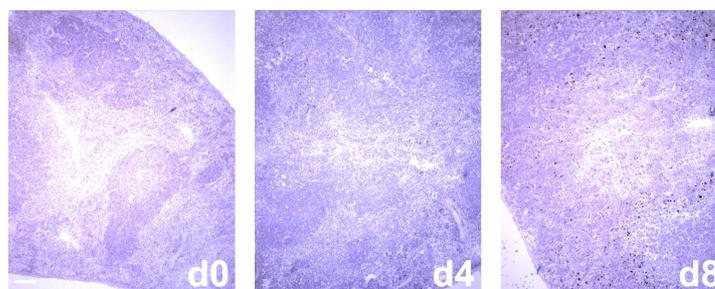
**Abbildung 3-5** Durchschnittliche Parasitämie- und Überlebensrate nach einer Infektion von weiblichen immunen entmilzten C57BL/6-Mäusen ( $n=7$ ) mit  $10^6$  *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten

Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

### 3.1.2 Zellularität der Milz während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion

#### 3.1.2.1 Anzahl der gesamten und apoptotischen Milzzellen während einer Infektion

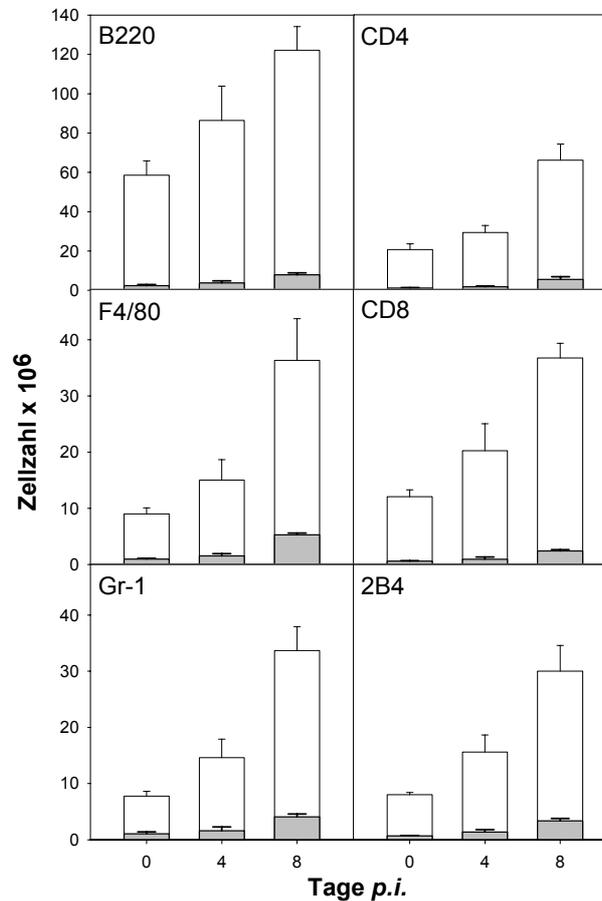
Während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion kommt es zu einer Umstrukturierung der Milz. Dies ist in **Abbildung 3-6** ersichtlich.



**Abbildung 3-6** Aufbau der Milz von weiblichen C57BL/6 Mäusen während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion (Tag 0 bis 8 *p.i.*)

Schnitte gefärbt mit Hämatoxylin. Die Größenstandardbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

Es ist eine deutliche Vergrößerung der weißen Pulpen und ein Verschwinden der eindeutigen Trennung von roter und weißer Pulpa festzustellen.



**Abbildung 3-7** Veränderungen der Anzahl aller und apoptotischer Milzleukozyten von weiblichen C57BL/6 Mäusen während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion.

Einzelzellpopulationen von Milzzellen (weiße Balken) wurden durch Durchflußzytometrie mit den aufgelisteten FITC gekoppelten Antikörpern analysiert. Tote Zellen (graue Balken) wurden durch Färbung mit 7-AAD markiert. Die totale Zellzahl wurde aus der Häufigkeit der Zelltypen und der totalen Anzahl der isolierten Milzzellen berechnet. Alle Werte sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

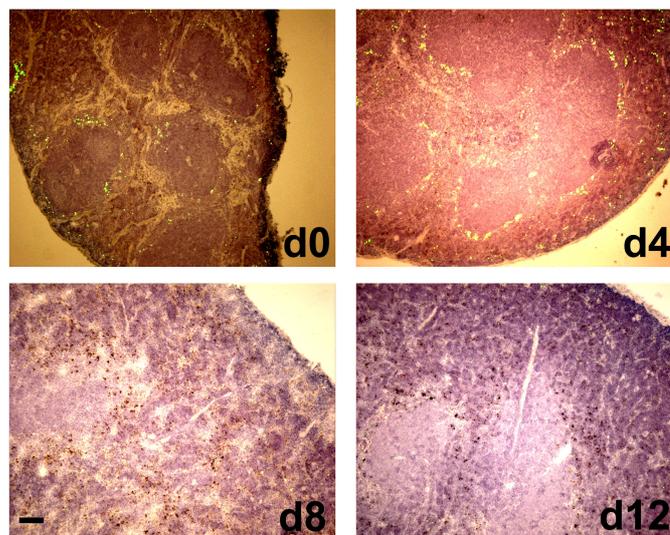
Diese Veränderungen in der Milz gehen einher mit einem Anstieg in der Anzahl von Leukozyten. Durchflußzytometrische Analysen von totalen und apoptotischen Milzleukozyten zeigten, daß sich die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten, B220<sup>+</sup> B-Zellen und 2B4<sup>+</sup> NK („natural killer“) Zellen mehr als verdoppelt. Hierbei steigt vor allem die Anzahl der phagozytischen F4/80<sup>+</sup> Makrophagen und Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten um das bis zu Vierfache. Auch die

Anzahl der apoptotischen Zellen aller untersuchten Zellpopulationen ist deutlich vergrößert. Besonders stark ist auch hier der Anstieg an apoptotischen F4/80<sup>+</sup> Makrophagen und Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten (**Abbildung 3-7**).

### 3.1.2.2 Milz-“gating”

#### 3.1.2.2.1 Partikelaufnahme und Struktur

In der Milz sind zwei distinkte Kompartimente, die rote und die weiße Pulpa zu unterscheiden, die von einer Marginalzone voneinander abgegrenzt sind. Die rote Pulpa ist für die Filterfunktionen der Milz verantwortlich, wohingegen die weiße Pulpa immunologische Funktionen der Milz übernimmt.

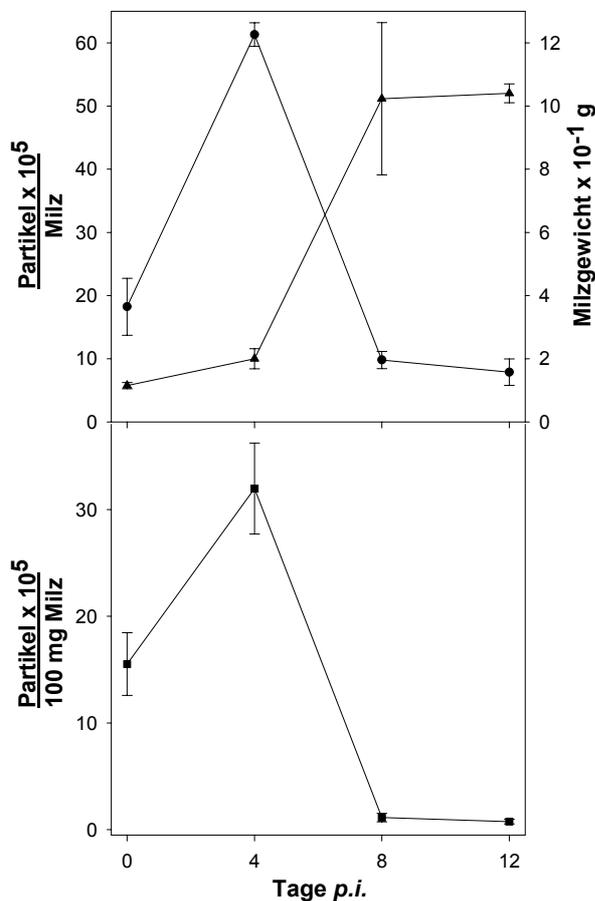


**Abbildung 3-8** Verlauf der Partikelaufnahme Kapazität der Milz von weiblichen C57BL/6 Mäusen während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion.

Lokalisierung von grün fluoreszierenden Polystyrolpartikeln in der weißen und roten Pulpa an den Tagen 0, 4, 8 und 12 *p.i.* Schnitte wurden mit Hämatoxylin gefärbt. Die Größenstandardbalken entsprechen 100 µm.

Durch eine Infektion mit *Plasmodium chabaudi* wird eine dramatische Vergrößerung der Milz induziert (**Abbildung 3-9**). Diese Vergrößerung geht einher mit einer deutlichen Abnahme in der totalen und spezifischen Filtrationskapazität von injizierten 3 µm großen fluoreszierenden Polystyrolpartikeln (**Abbildung 3-9**). Während am Tag 8 *p.i.* nur noch ungleichmäßig verteilt ein paar Partikel zu erkennen sind, sind an

den ersten Tagen der Infektion (Tag 0 und 4 *p.i.*) die fluoreszierenden Partikel vor allem in der Marginalzone angeordnet (**Abbildung 3-8**).



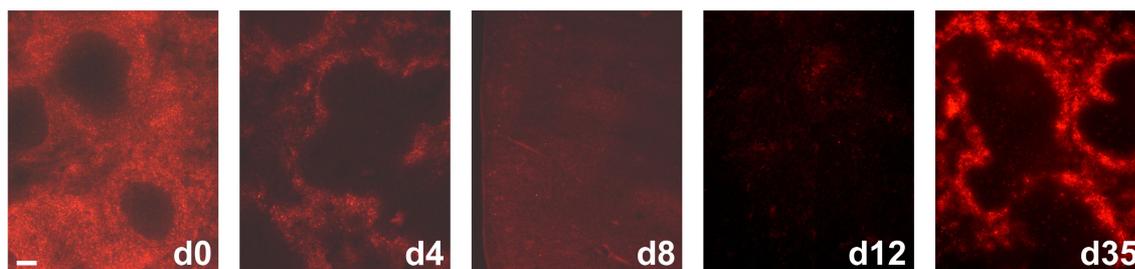
**Abbildung 3-9** Verlauf der Partikelaufnahmekapazität der Milz von weiblichen C57BL/6 Mäusen während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion.

Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Infektion wurden  $1,3 \times 10^8$  grünfluoreszierende Polystyrolpartikel in den retroorbitalen Plexus injiziert. Milzgewicht (▲) und totale Partikelaufnahme der Milz (●) (oberer Graph) wurden gemessen und die spezifische Aufnahme der Partikel pro 100 mg Milz (■) daraus berechnet (unterer Graph). Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

### 3.1.2.2.2 Aufnahme von PKH26-markierten Erythrozyten

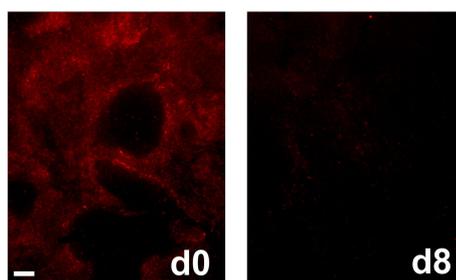
Nach einer Injektion von PKH26-markierten (rote Fluoreszenz) parasitierten Erythrozyten (pRBZ) in nicht-infizierte C57BL/6 Mäuse ist eine helle rote Fluoreszenz in der roten Pulpa sichtbar (**Abbildung 3-10**). Bei einer Injektion am Tag 4 *p.i.* hat die

Fluoreszenzintensität in der roten Pulpa bereits deutlich abgenommen, während am Punkt der maximalen Parasitämie, am Tag 8 *p.i.* und während der Krise, am Tag 12 *p.i.* kein Zurückhalten von *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten in der Milz mehr nachgewiesen werden kann. Selbst am Tag 35 *p.i.* erreicht die durchschnittliche Fluoreszenz nur 80 % der Intensität vor der Infektion (**Abbildung 3-12**).

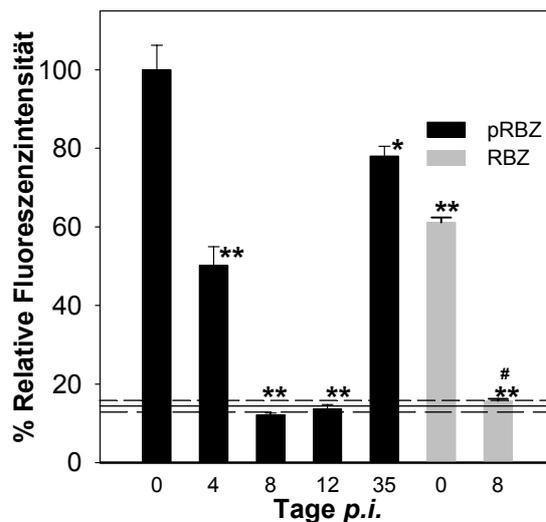


**Abbildung 3-10** Änderungen in der Aufnahmekapazität der Milz von weiblichen C57BL/6 Mäusen  
Aufnahme von pRBZ wurde an den Tagen 0 bis 35 *p.i.* 30 Minuten nach Injektion von  $1 \times 10^9$  PKH26-markierten (rot) Erythrozyten anhand von 10 µm Kryoschnitten analysiert. Der Größenstandardbalken entspricht 100 µm.

Auch bei einer Injektion von mit PKH26-markierten nicht-infizierten Erythrozyten (RBZ) kann eine Abnahme der Intensität während der Krise beobachtet werden (**Abbildung 3-11**), wobei die Aufnahme von RBZ am Tag 0 *p.i.* nur etwa 50 % der Aufnahme von pRBZ entspricht (**Abbildung 3-12**).

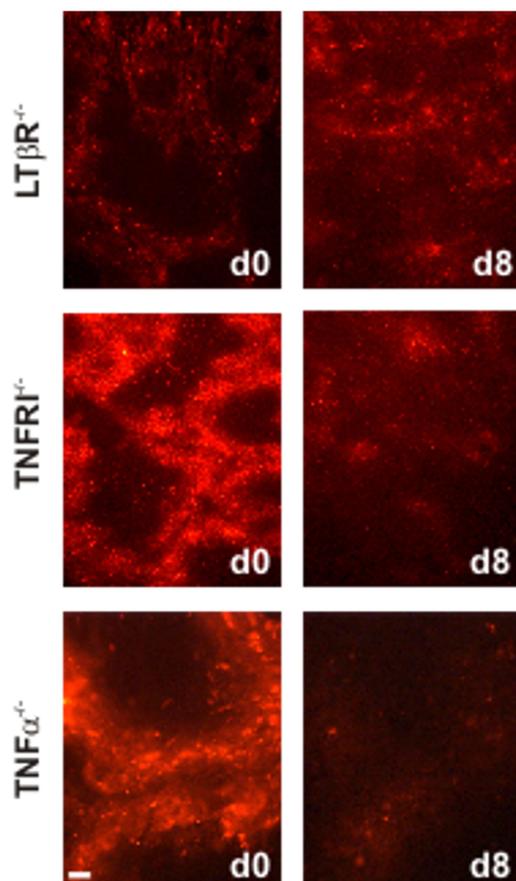


**Abbildung 3-11** Änderungen in der Aufnahmekapazität der Milz von weiblichen C57BL/6 Mäusen  
Aufnahme von RBZ wurde an den Tagen 0 bis 8 *p.i.* 30 Minuten nach Injektion von  $1 \times 10^9$  PKH26-markierten (rot) Erythrozyten anhand von 10 µm Kryoschnitten analysiert. Der Größenstandardbalken entspricht 100 µm.



**Abbildung 3-12 Änderungen in der Aufnahmekapazität der Milz von weiblichen C57BL/6 Mäusen**  
 Semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität von 10 Kryoschnitten pro Maus und 3 bis 5 Mäusen pro Zeitpunkt. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts. Die horizontale Linie gibt die durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts von Kryoschnitten von Mäusen ohne Injektion an. (\*\* entspricht  $p < 0,01$  und \* entspricht  $p < 0,05$  im Vergleich zu Tag 0 p.i. mit Injektion von pRBZ, # entspricht  $p < 0,01$  im Vergleich zu Tag 0 p.i. mit Injektion von RBZ)

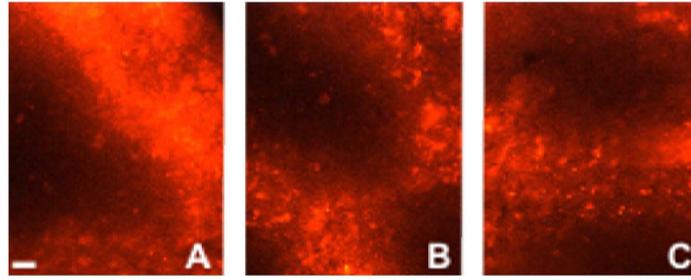
Die Aufnahme der Milz von pRBZ am Tag 0 p.i. (Abbildung 3-13) ist bei Lymphotoxin  $\beta$  Rezeptor- ( $LT\beta R^{-/-}$ ) Knockout-Mäusen deutlich reduziert. Bei Tumornekrosefaktor Rezeptor I- ( $TNFR1^{-/-}$ ) Knockout-Mäusen ist hingegen kein Unterschied in der Aufnahmekapazität von pRBZ im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen festzustellen. Tumornekrosefaktor  $\alpha$ - ( $TNF\alpha^{-/-}$ ) Knockout-Mäuse zeigen im Vergleich zu naiven C57BL/6-Mäusen eine verringerte Aufnahme von pRBZ. Die Aufnahmekapazität ist aber deutlich höher als bei  $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen. Im Höhepunkt der Parasitämie, am Tag 8 p.i., kommt es zu keiner weiteren Abnahme bei der Aufnahme von pRBZ bei  $LT\beta R^{-/-}$ -Mäusen. Währenddessen ist bei  $TNFR1^{-/-}$ - und  $TNF\alpha^{-/-}$ -Mäusen eine verringerte Fluoreszenzintensität zu erkennen, die aber deutlich stärker als bei vergleichbaren C57BL/6-Mäusen ist (Abbildung 3-15).



**Abbildung 3-13** Änderungen in der Aufnahmekapazität der Milz von weiblichen  $LT\beta R^{-/-}$ ,  $TNF\alpha^{-/-}$  und  $TNFR1^{-/-}$ -Mäusen

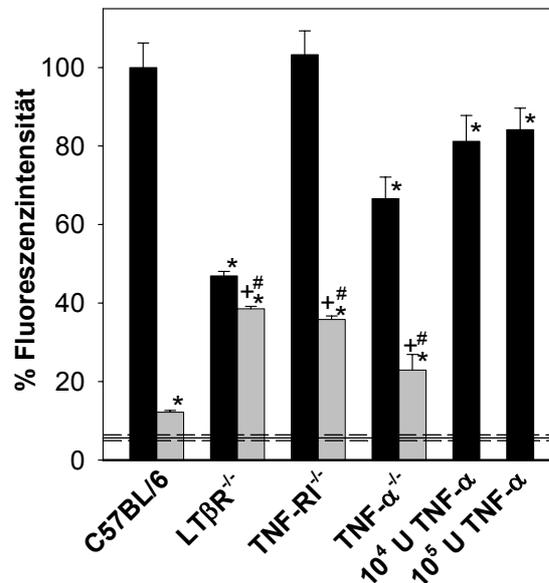
Aufnahme von pRBZ wurde an den Tagen 0 bis 8 *p.i.* 30 Minuten nach Injektion von  $1 \times 10^9$  PKH26-markierten (rot) Erythrozyten anhand von 10  $\mu\text{m}$  Kryoschnitten analysiert. Der Größenstandardbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Durch eine dreitägige Vorbehandlung von weiblichen C57BL/6-Mäusen mit  $TNF\alpha$  kommt es, verglichen mit unbehandelten C57BL/6-Mäusen, zu einer verringerten Aufnahmekapazität der Milz für parasitierte Erythrozyten (**Abbildung 3-14** und **Abbildung 3-15**).



**Abbildung 3-14** Änderungen in der Aufnahmekapazität der Milz von weiblichen mit  $\text{TNF}\alpha$  behandelten C57BL/6-Mäusen

Aufnahme von pRBZ wurde bei unbehandelten weibliche C57BL/6-Mäusen (A) und nach dreimaliger Injektion von  $10^4$  U (B) oder  $10^5$  U (C)  $\text{TNF}\alpha$  30 Minuten nach Injektion von  $1 \times 10^9$  PKH26-markierten (rot) Erythrozyten anhand von  $10 \mu\text{m}$  Kryoschnitten analysiert. Der Größenstandardbalken entspricht  $100 \mu\text{m}$ .

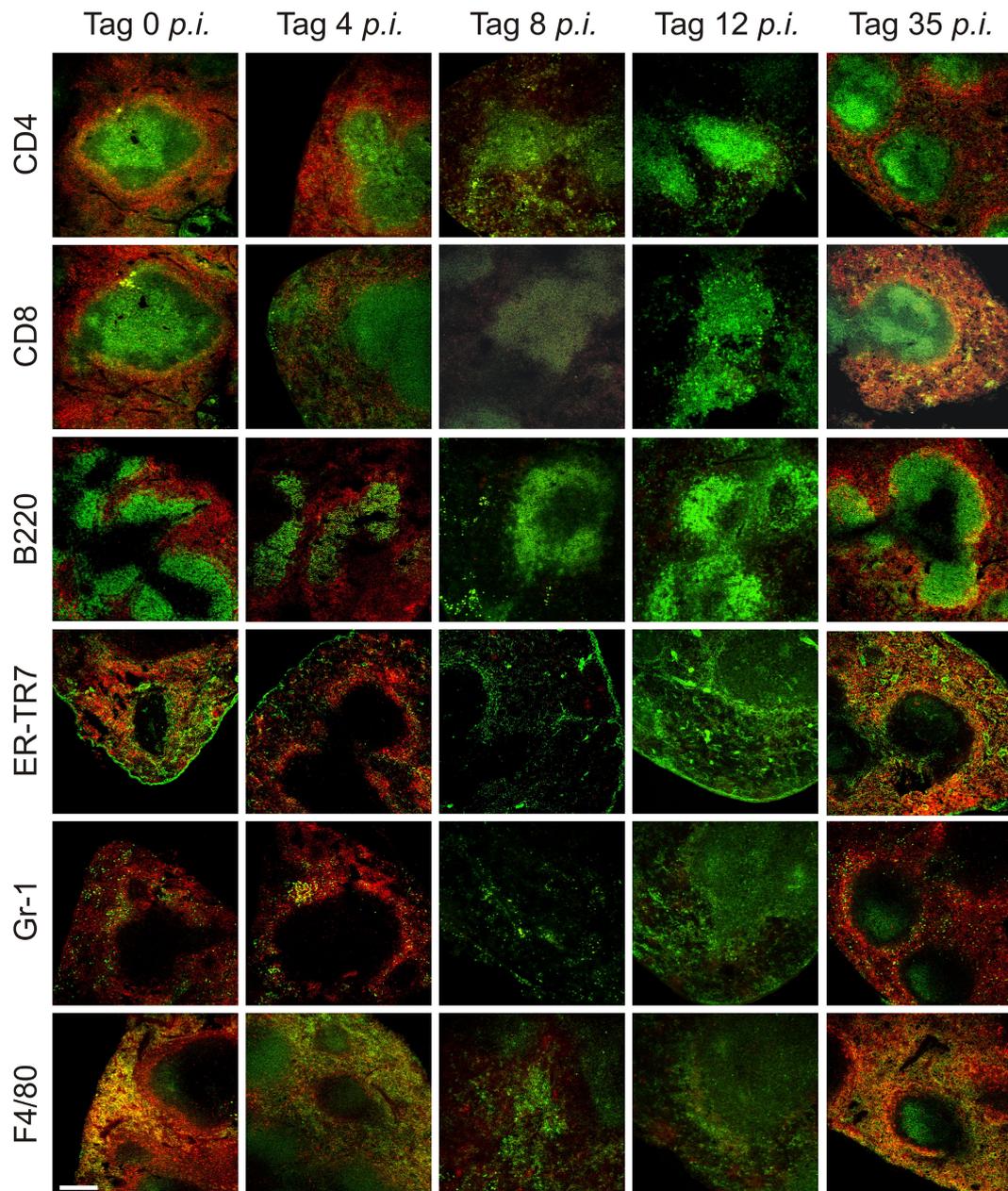


**Abbildung 3-15** Änderungen in der Aufnahmekapazität der Milz von weiblichen C57BL/6-,  $\text{LT}\beta\text{R}^{-/-}$  -  $\text{TNFRI}^{-/-}$ -,  $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ - und mit  $\text{TNF}\alpha$  behandelten C57BL/6-Mäusen

Semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität von 10 Kryoschnitten pro Maus. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts. Der schwarze Balken stellt die Werte am Tag 0 *p.i.*, der graue Balken die entsprechenden Werte am Tag 8 *p.i.* da. Die horizontale Linie gibt die durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts von Kryoschnitten von Mäusen ohne Injektion an. (\* entspricht  $p < 0,01$  im Vergleich zu Tag 0 *p.i.* von C57BL/6 Mäusen, # entspricht  $p < 0,01$  im Vergleich zum jeweilig eigenen Tag 0 *p.i.*, + entspricht  $p < 0,01$  im Vergleich zu Tag 8 *p.i.* von C57BL/6 Mäusen)

### 3.1.2.2.3 Zellmigration

Wie in **Abbildung 3-16** dargestellt, kommt es während einer Infektion mit *Plasmodium chabaudi* in der Milz zu Umstrukturierungen. Am Tag 0 *p.i.* ist eine genaue Trennung von roter und weißer Pulpa zu erkennen.  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen und  $B220^+$  B-Zellen sind in distinkten Arealen in der weißen Pulpa lokalisiert, während  $Gr-1^+$  Granulozyten,  $F4/80^+$  Makrophagen und ER-TR7<sup>+</sup> retikuläres Netzwerk in der roten Pulpa zu finden sind. Nach einer Injektion von mit PKH26 (rot) markierten infizierten Erythrozyten (pRBZ) kommt es zu einer überwiegenden Kolokalisierung (gelb) mit  $F4/80^+$  Makrophagen (grün) und nur vereinzelt mit  $Gr-1^+$  Granulozyten und ER-TR7<sup>+</sup> retikulärem Netzwerk. Am Tag 4 *p.i.* beginnen die  $F4/80^+$  Makrophagen in die weiße Pulpa einzuwandern, und es kommt zu einer beginnenden Auflösung der exakten weißen Pulpa-Bereiche. Am Punkt der höchsten Parasitämie, am Tag 8 *p.i.* und während der Krise (Tag 12 *p.i.*) bleiben die  $B220^+$  B-Zellen größtenteils auf die weiße Pulpa beschränkt. Auch bei dem ER-TR7<sup>+</sup> retikulären Netzwerk ist eine deutliche Anordnung in der roten Pulpa weiter sichtbar. Bei den anderen Zelltypen kommt es allerdings zu dramatischen Umverteilungen.  $Gr-1^+$  Granulozyten sind über die Milz verteilt.  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen hingegen ist immer noch eine verstärkte Lokalisierung in der weißen Pulpa zu beobachten. Die  $F4/80^+$  Makrophagen können zunehmend in der weißen Pulpa gefunden werden. In der chronischen Phase der Infektion (Tag 35 *p.i.*) sind die Milzstruktur und die Aufnahmekapazität für pRBZ größtenteils wieder hergestellt. Die T-Zell-Bereiche erscheinen als definierte Regionen in der weißen Pulpa. Es sind zwar noch einige  $F4/80^+$  Makrophagen in der weißen Pulpa zu erkennen, die Mehrheit liegt aber wieder in der roten Pulpa. Auch bei den  $Gr-1^+$  Granulozyten zeigt sich eine hauptsächliche Organisation in der roten Pulpa. Ferner ist eine deutliche Kolokalisierung von pRBZ mit  $B220^+$  B-Zellen und ER-TR7<sup>+</sup> retikulärem Netzwerk in der marginalen Zone festzustellen.



**Abbildung 3-16** Verteilung von Zelltypen in der Milz

Mäusen wurden  $1 \times 10^9$  PKH26 markierte (rot) pRBZ in den retroorbitalen Plexus injiziert. Kryoschnitte wurden mit den angegebenen Erstantikörpern, wie in Kapitel 2.14.4 beschrieben, inkubiert. Separate rote und grüne Bilder wurden mit einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe von Adobe Photoshop® 7.0 übereinandergelegt. Der Größenstandardbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

#### 3.1.2.2.4 Marginale Zone

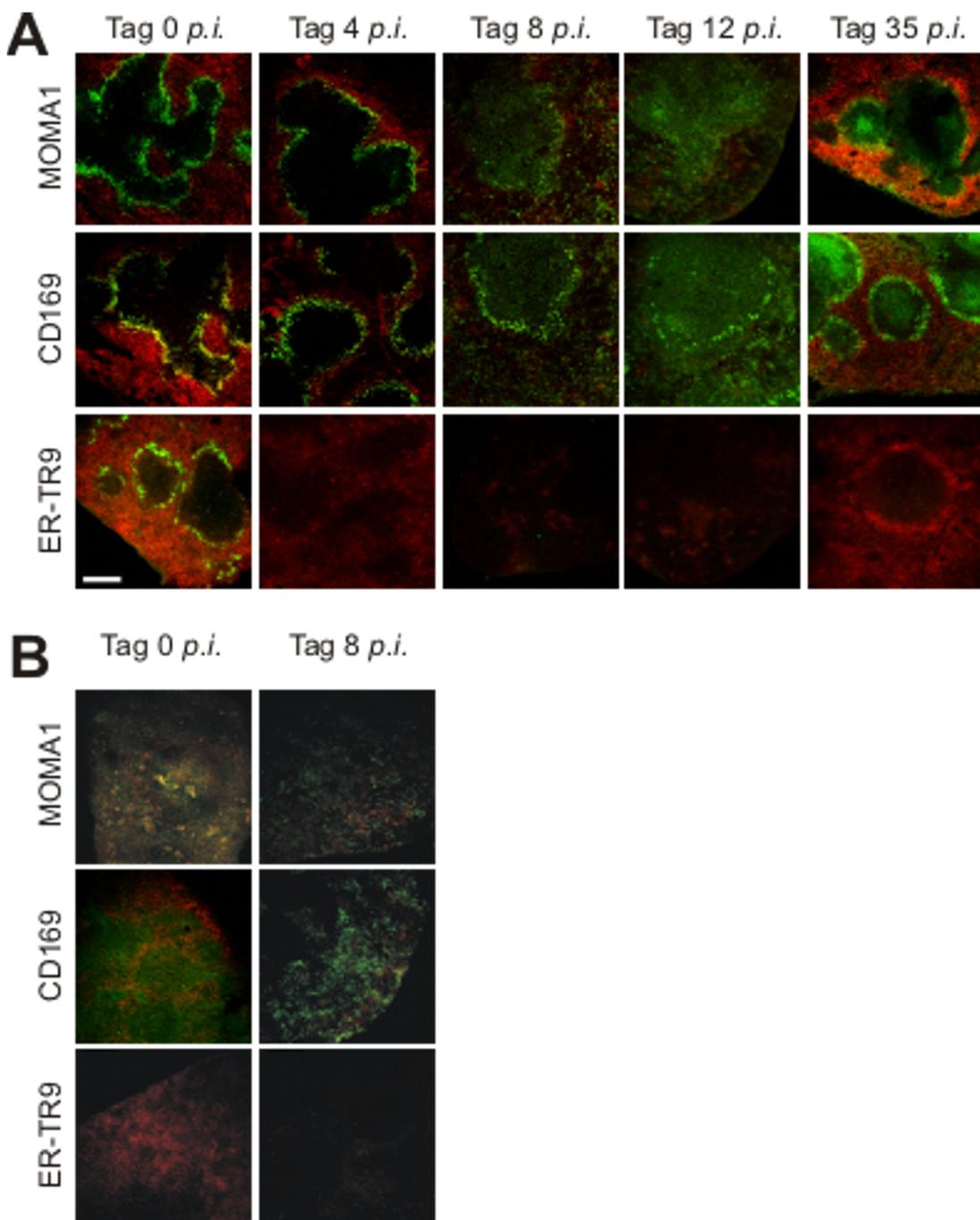
Die beiden Hauptkompartimente der Milz, rote und weiße Pulpa, werden von der marginalen Zone voneinander getrennt. In dieser marginalen Zone sind zwei Typen von Makrophagen zu finden. Dabei sind die ER-TR9<sup>+</sup> Marginalzonenmakrophagen (MZM) zwischen dem Marginalsinus und der roten Pulpa und die CD169<sup>+</sup>/MOMA1<sup>+</sup> marginalen metallophilen Makrophagen (MMM) zwischen dem marginalen Sinus und der weißen Pulpa lokalisiert (**Abbildung 3-17A**). Nach einer Injektion von PKH26-markierten Erythrozyten ist eine Kolokalisierung mit den MMM zu erkennen. Am Tag 4 *p.i.* wird die Lokalisierung der MMM diffus, MZM sind nicht mehr detektierbar. Im weiteren Verlauf der Infektion bis hin zur Krise (Tag 8 und 12 *p.i.*), wandern die CD169<sup>+</sup> MMM in die weiße Pulpa ein, es bleibt aber ein deutlicher Ring um die weiße Pulpa bestehen. Die Färbung der MMM mit MOMA1 ist nur noch schwach. In der chronischen Phase der Infektion, am Tag 35 *p.i.*, ist wieder deutlich ein innerer Ring von CD169<sup>+</sup>/MOMA1<sup>+</sup> MMM zu erkennen, wenn auch noch einige MMM in der weißen Pulpa zu detektieren sind. Es ist aber kaum Kolokalisierung der MMM mit pRBZ zu beobachten. MZM sind auch am Tag 35 *p.i.* nicht nachzuweisen.

Bei LTβR<sup>-/-</sup>-Mäusen (**Abbildung 3-17B**) fehlen alle Zellpopulationen der marginalen Zone [Fütterer *et al.*, 1998]. So lassen sich zu keinem Zeitpunkt der Infektion mit *Plasmodium chabaudi* ER-TR9<sup>+</sup> Marginalzonenmakrophagen oder CD169<sup>+</sup>/MOMA1<sup>+</sup> marginalen metallophilen Makrophagen zeigen.

Die Marginalzone von TNFRI<sup>-/-</sup>-Mäusen (**Abbildung 3-18**) ist hingegen nur leicht desorganisiert [Fu & Chaplin, 1999]. Am Tag 0 einer Malariainfektion sind sowohl CD169<sup>+</sup>/MOMA1<sup>+</sup> MMM als auch ER-TR9<sup>+</sup> MZM in der marginalen Zone detektierbar. Nach einer Injektion von PKH26 markierten pRBZ kommt es ebenso wie bei den C57BL/6-Mäusen zu einer Kolokalisierung mit den ER-TR9<sup>+</sup> MZM. Am Tag 8 *p.i.* sind bei TNFRI<sup>-/-</sup>-Mäusen noch immer ER-TR9<sup>+</sup> MZM nachzuweisen. Die CD169<sup>+</sup> MMM wandern in die weiße Pulpa ein, es ist jedoch immer noch ein deutlicher Ring um die weiße Pulpa zu erkennen. Die Färbung mit MOMA1 ist nur noch sehr schwach.

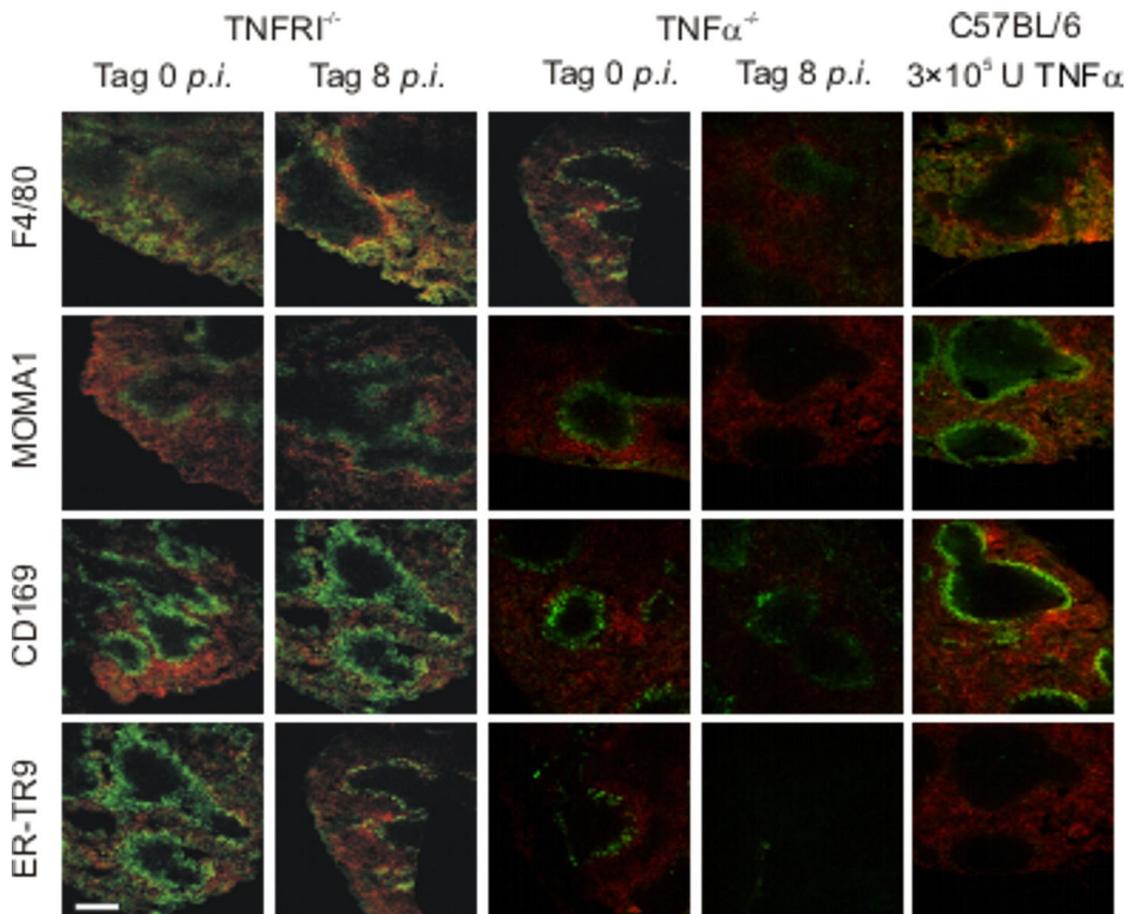
TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mäuse haben Defekte im Marginalsinus (**Abbildung 3-18**), haben aber sowohl marginale metallophile Makrophagen als auch Marginalzonenmakrophagen mit einigen Änderungen in ihrer Position [Engwerda *et al.*, 2002]. Am Tag 0 einer Malariainfektion sind sowohl CD169<sup>+</sup>/MOMA1<sup>+</sup> MMM als auch ER-TR9<sup>+</sup> MZM in der marginalen Zone detektierbar. Es ist aber eine leicht verringerte Anzahl und eine diffusere Anordnung zu erkennen. Auch bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mäusen kommt es nach einer Injektion von PKH26 markierten pRBZ zu einer Kolokalisierung mit den ER-TR9<sup>+</sup> Marginalzonenmakrophagen. Am Tag 8 *p.i.* sind keine ER-TR9<sup>+</sup> MZM mehr detektierbar und die CD169<sup>+</sup> MMM lassen sich nur noch vereinzelt nachweisen. Es kommt zu keiner Färbung der MMM mit MOMA1.

Werden die weiblichen C57BL/6-Mäuse vor der Injektion von mit PKH26-gefärbten parasitierten Erythrozyten für drei Tage mit  $1 \times 10^5$  U TNF $\alpha$  behandelt (**Abbildung 3-18**), lassen sich keine ER-TR9<sup>+</sup> MZM detektieren, während die Färbung der MMM mit CD169 und MOMA-1 deutlich erkennbar ist.



**Abbildung 3-17** Verteilung von Zelltypen in der marginalen Zone der Milz

C57BL/6- (A),  $LT\beta R^{-/-}$  (B) Mäusen wurden  $1 \times 10^9$  PKH26 markierte (rot) pRBZ in den retroorbitalen Plexus injiziert. Kryoschnitte wurden mit den angegebenen Erstantikörpern, wie in Kapitel 2.14.4 beschrieben, inkubiert. Separate rote und grüne Bilder wurden mit einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe von Adobe Photoshop® 7.0 übereinandergelegt. Die Größenstandardbalken entsprechen 200  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3-18** Verteilung von Makrophagen in der marginalen Zone und der roten Pulpa der Milz

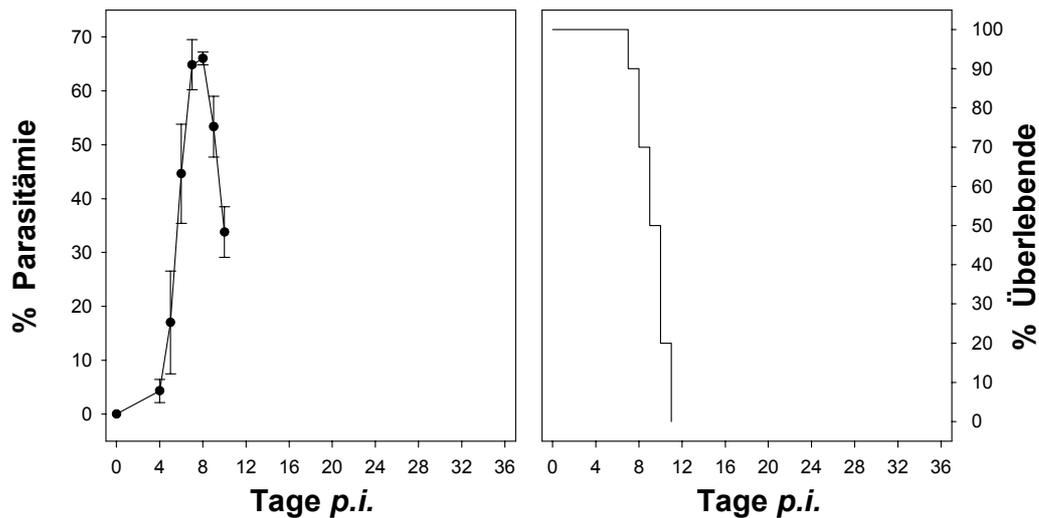
TNFR1<sup>-/-</sup>, TNFα<sup>-/-</sup> und mit  $3 \times 10^5$  U TNFα behandelten C57BL/6- Mäusen wurden  $1 \times 10^9$  PKH26 markierte (rot) pRBZ in den retroorbitalen Plexus injiziert. Kryoschnitte wurden mit den angegebenen Erstantikörpern, wie in Kapitel 2.14.4 beschrieben, inkubiert. Separate rote und grüne Bilder wurden mit einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe von Adobe Photoshop® 7.0 übereinandergelegt. Die Größenstandardbalken entsprechen 200 µm.

## 3.2 Wirkung von Testosteron

### 3.2.1 Konversion von Resistenz zu Suszeptibilität durch Testosteron

Durch Testosteron werden die ansonsten sehr gegen *Plasmodium chabaudi* resistenten weiblichen C57BL/6-Mäuse komplett zur Anfälligkeit umgewandelt. Werden die

Mäuse zweimal die Woche, für einen Zeitraum von drei Wochen mit 0,9 mg Testosteron vorbehandelt, sterben sie bei der anschließenden Infektion mit *Plasmodium chabaudi*. Wie die **Abbildung 3-19** zeigt, endet die Zeit bis zur Krise mit einem fulminanten Maximum der Parasitämie von etwa 65 % am Tag 8 der Infektion. Der Tod tritt während oder kurz nach diesem Maximum ein.



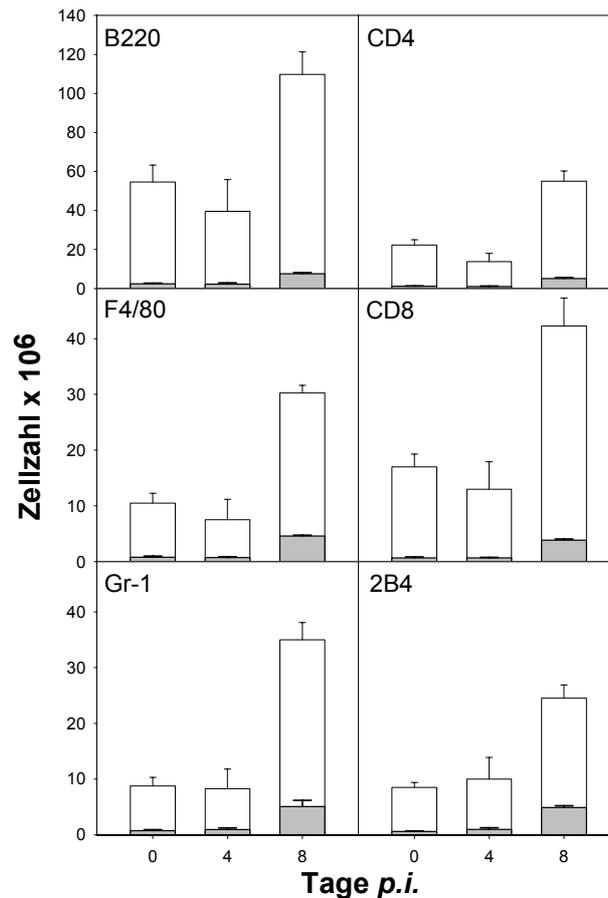
**Abbildung 3-19** Durchschnittliche Parasitämie- (linker Graph) und Überlebensrate (rechter Graph) nach einer Infektion von weiblichen testosteronbehandelten C57BL/6-Mäusen (n=5) mit  $10^6$  *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten

Dargestellte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

### 3.2.2 Zellularität während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion

#### 3.2.2.1 Anzahl der gesamten und apoptotischen Milzzellen während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion

Eine Testosteronbehandlung beeinflusst die zelluläre Zusammensetzung der Milz im Vergleich zu den vehikelbehandelten C57BL/6-Mäusen nicht (**Abbildung 3-7** und **Abbildung 3-20**). Es kommt auch zu keiner testosteroninduzierten vermehrten Zunahme an Milzzellen bis zur Krise. Am Punkt der maximalen Parasitämie hat sich die Anzahl der F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten, B220<sup>+</sup> B-Zellen, 2B4<sup>+</sup> NK-Zellen, sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht merklich im Vergleich mit vehikelbehandelten Mäusen verändert. Auch die Anzahl der apoptotischen Zellen aller dieser Zelltypen scheint größtenteils nicht von Testosteron beeinflusst zu werden.



**Abbildung 3-20** Veränderungen der Anzahl aller und apoptotischer Milzleukozyten während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion bei weiblichen testosteronbehandelten C57BL/6 Mäusen.

Einzelzellpopulationen von Milzzellen (weiße Balken) wurden durch Durchflußzytometrie mit den aufgelisteten FITC gekoppelten Antikörpern analysiert. Tote Zellen (graue Balken) wurden durch Färbung mit 7-AAD markiert. Die totale Zellzahl wurde aus der Häufigkeit der Zelltypen und der totalen Anzahl der isolierten Milzzellen berechnet. Alle Werte sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts.

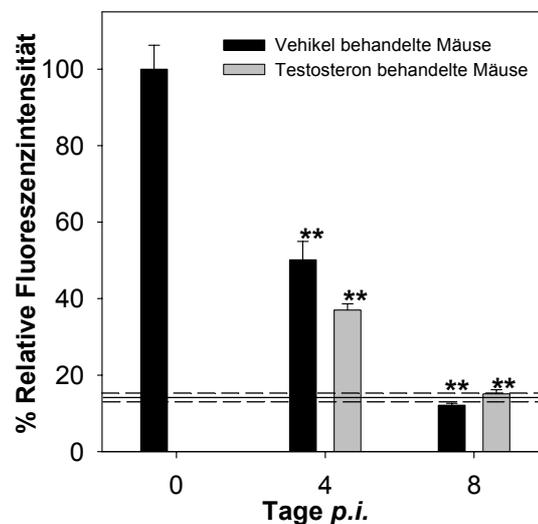
### 3.2.2.2 Milz-“gating”

#### 3.2.2.2.1 Aufnahme von PKH26-markierten Erythrozyten

Nach einer Injektion von mit PKH26-markierten (rote Fluoreszenz) parasitierten Erythrozyten (pRBZ) in nicht-infizierte C57BL/6 Mäuse ist eine helle rote Fluoreszenz in der roten Pulpa sichtbar (**Abbildung 3-22**). Bei einer Injektion in mit Testosteron vorbehandelte Mäuse am Tag 4 *p.i.* hat die Fluoreszenzintensität in der roten Pulpa deutlich abgenommen, während am Punkt der maximalen Parasitämie, am Tag 8 *p.i.*,

kein Zurückhalten von *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten in der Milz mehr nachgewiesen werden kann.

Bei einem Vergleich der Fluoreszenzintensität zwischen vehikel- und testosteronbehandelten Mäusen (**Abbildung 3-21**) zeigt sich, daß das Testosteron keine signifikanten Einflüsse auf die Aufnahmekapazität der Milz von infizierten Erythrozyten hat.



**Abbildung 3-21** Änderungen in der Aufnahmekapazität der Milz von weiblichen testosteronbehandelten C57BL/6 Mäusen

Semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität von 10 Kryoschnitten pro Maus und 3 bis 5 Mäusen pro Zeitpunkt. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts. Die horizontale Linie gibt die durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts von Kryoschnitten von Mäusen ohne Injektion an. (\*\* entspricht  $p < 0,01$  im Vergleich zu Tag 0 p.i.)

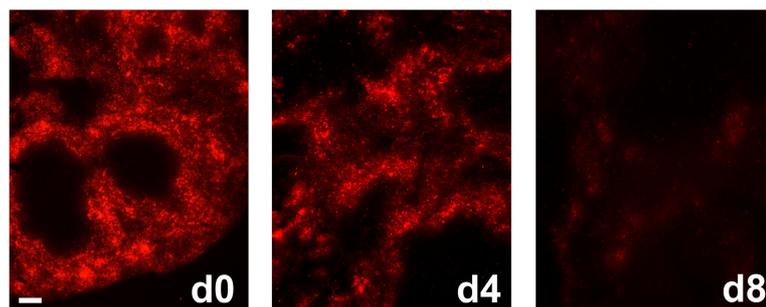
(**Abbildung 3-17A**). Am Tag 4 p.i. wird die Lokalisierung der MMM diffus, MZM sind nicht mehr detektierbar. Im weiteren Verlauf der Infektion bis hin zum Punkt der höchsten Parasitämie (Tag 8 p.i.) wandern die  $CD169^+$  MMM in die weiße Pulpa ein, es bleibt aber ein deutlicher Ring um die weiße Pulpa bestehen. Die Färbung der MMM mit MOMA1 ist nur noch schwach.

#### 3.2.2.2.2 Zellmigration

Auch auf die Umstrukturierungen der Milz während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion hat Testosteron, wie die **Abbildung 3-23** zeigt, keinen Einfluß. Am Tag 4 *p.i.* beginnen die F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, wie auch schon bei den vehikelbehandelten Mäusen (**Abbildung 3-16**) gezeigt, in die weiße Pulpa einzuwandern, und es kommt zu einer beginnenden Auflösung der exakten weißen Pulpa-Bereiche. Am Punkt der höchsten Parasitämie, am Tag 8 *p.i.*, bleiben die B220<sup>+</sup> B-Zellen größtenteils auf die weiße Pulpa beschränkt. Auch bei dem ER-TR7<sup>+</sup> retikulären Netzwerk ist eine deutliche Anordnung in der roten Pulpa weiter sichtbar. Bei den anderen Zelltypen kommt es allerdings zu dramatischen Umverteilungen. Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten sind über die Milz verteilt. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bleiben vorwiegend in der weißen Pulpa lokalisiert. F4/80<sup>+</sup> Makrophagen können zunehmend in der weißen Pulpa beobachtet werden.

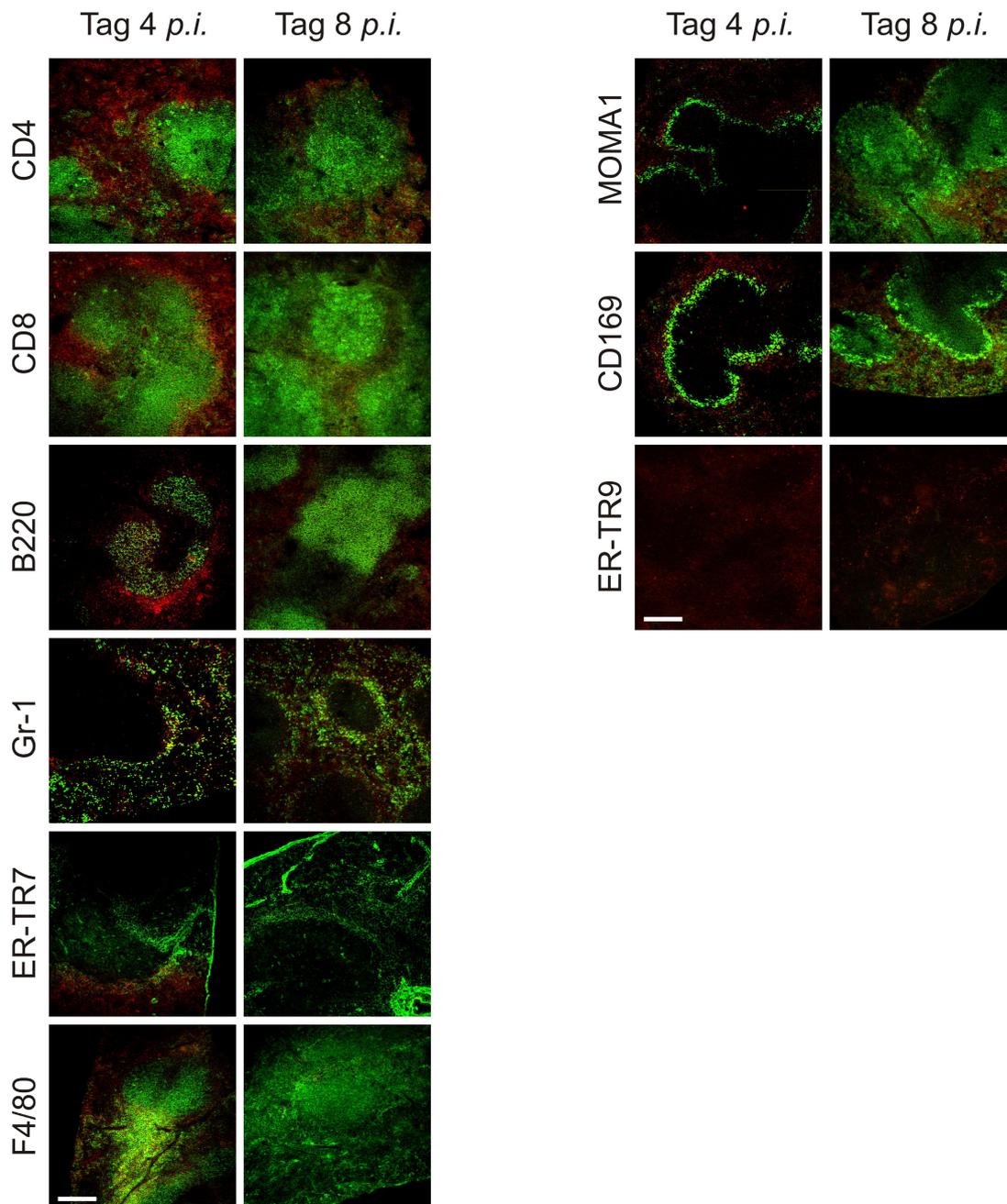
#### 3.2.2.2.3 Marginale Zone

Die Umstrukturierungen der marginalen Zone in mit testosteronbehandelten Mäusen (**Abbildung 3-23**) zeigt keine Unterschiede zu den mit vehikelbehandelten Mäusen (**Abbildung 3-17A**). Am Tag 4 *p.i.* wird die Lokalisierung der MMM diffus, MZM sind nicht mehr detektierbar. Im weiteren Verlauf der Infektion bis hin zum Punkt der höchsten Parasitämie (Tag 8 *p.i.*) wandern die CD169<sup>+</sup> MMM in die weiße Pulpa ein, es bleibt aber ein deutlicher Ring um die weiße Pulpa bestehen. Die Färbung der MMM mit MOMA1 ist nur noch schwach.



**Abbildung 3-22** Änderungen in der Aufnahmekapazität der Milz von weiblichen testosteronbehandelten C57BL/6 Mäusen

Aufnahme von pRBZ wurde an den Tagen 0 bis 35 *p.i.* 30 Minuten nach Injektion von  $1 \times 10^9$  PKH26-markierten (rot) Erythrozyten anhand von 10  $\mu\text{m}$  Kryoschnitten analysiert. Der Größenstandardbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



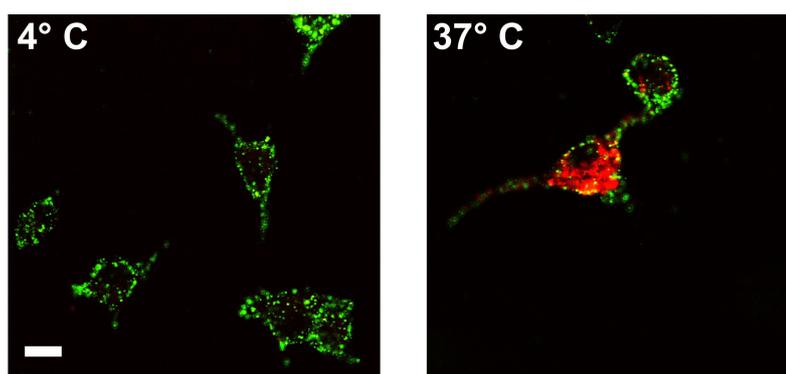
**Abbildung 3-23 Verteilung von Zelltypen in der Milz**

Mäusen wurden  $1 \times 10^9$  PKH26-markierte (rot) pRBZ in den retroorbitalen Plexus injiziert. Kryoschnitte wurden mit den angegebenen Erstantikörpern, wie in Kapitel 2.14.4 beschrieben, inkubiert. Separate rot und grün Bilder wurden mit einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe von Adobe Photoshop® 7.0 übereinandergelegt. Der Größenstandardbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3 Phagozytose durch Makrophagen

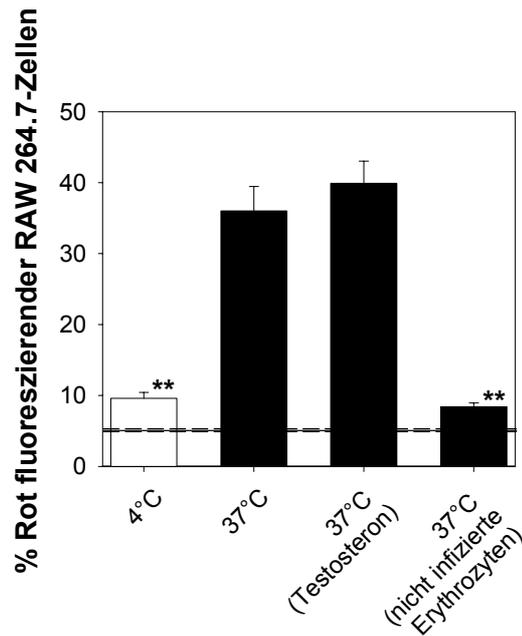
Nach einer dreistündigen Inkubation von RAW 264.7 Makrophagen mit PKH26 (rot) markierten Erythrozyten ist eine temperaturabhängige Aufnahme der pRBZ zu beobachten (**Abbildung 3-24 und Abbildung 3-25**).

Bei Betrachtung der Erythrophagozytose von testosteronbehandelten RAW 264.7 Makrophagen können keine signifikanten Unterschiede zu den mit vehikelbehandelten RAW 264.7 Makrophagen (**Abbildung 3-25**) beobachtet werden. Nach einer dreistündigen Inkubation mit nicht-infizierten PKH26-markierten Erythrozyten ist jedoch eine etwa vierfach niedrigere Aufnahme durch die RAW 264.7 Makrophagen zu beobachten, die im Größenordnungsbereich der bei 4 °C mit pRBZ inkubierten RAW 264.7 Zellen liegt.



**Abbildung 3-24 Erythrophagozytose durch RAW 264.7 Makrophagen**

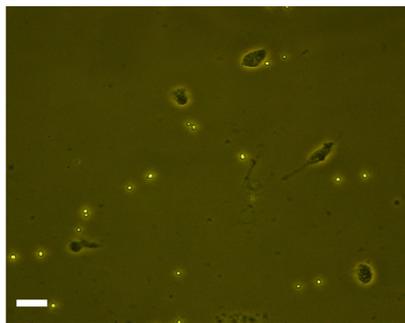
$1,8 \times 10^{10}$  RAW 264.7 Makrophagen wurden 3 Stunden mit  $0,5 \times 10^8$  PKH26-markierten (rot) pRBZ bei den aufgezeigten Temperaturen inkubiert. Nicht-phagozytierte pRBZ wurden durch Zugabe von hypotonem Puffer lysiert. Makrophagen wurden mit Anti-F4/80-Erstantikörper inkubiert und mit Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper und Streptavidin-Alexa-Fluor<sup>®</sup>488 (grün) gegengefärbt. Separate rot und grün Bilder wurden mit einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe von Adobe Photoshop<sup>®</sup> 7.0 übereinandergelegt. Der Größenstandardbalken entspricht 10  $\mu$ m.



**Abbildung 3-25 Erythrophagozytose durch RAW 264.7 Makrophagen**

Durchflußzytometrische Auswertung der rotfluoreszierenden mit PKH26 markierten Erythrozyten (rot) inkubierten RAW 264.7 Makrophagen. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts. Die horizontale Linie gibt die durchschnittliche %-Werte rotfluoreszierender RAW 264.7 Zellen  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts in der Negativkontrolle an. (\*\* entspricht  $p < 0,01$  im Vergleich zu 37 °C)

Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C von RAW 264.7 Makrophagen mit *Saccharomyces cerevisiae* (YSH19-GFP) kann keine Aufnahme der Hefe beobachtet werden (**Abbildung 3-26**).



**Abbildung 3-26 Phagozytose durch RAW 264.7 Makrophagen**

$1,8 \times 10^{10}$  RAW 264.7 Makrophagen wurden 3 Stunden mit  $0,5 \times 10^8$  *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen mit im Genom integriertem GFP (YSH19, grün) bei 37 °C inkubiert. Ein kombiniertes Durchlicht- und Grün-Bild wurde mit einem Phasenkontrast- und Fluoreszenz Mikroskop aufgenommen. Der Größenstandardbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Milz als Effektor gegen Malaria

Die Milz wird als der wichtigste Effektor bei der natürlichen Immunität gegen Blutstadien der Malaria betrachtet [Garnham, 1970; Wyler *et al.*, 1979; Eling, 1980; Weiss, 1990; Chotivanich *et al.*, 2000]. Sie übernimmt die Zerstörung der Malariaparasiten. Dabei bedient sie sich derselben Mechanismen, mit denen auch alte oder beschädigte Erythrozyten entfernt werden [Connor *et al.*, 1994].

Einen Hinweis darauf, daß die Milz eine Rolle als Effektor gegen Malariaparasiten spielt, sind die Hämozingranula, die während der akuten Phase in der Milz zu finden sind. Hämozoin wird von intraerythrozytären Parasiten zur Detoxifikation von lytischem Eisenprotoporphyrin IX des Wirtes [Pagola *et al.*, 2000] während der Hämoglobinzersetzung freigesetzt [Zhang *et al.*, 1999]. Die Hämozingranula sind fast ausschließlich in der roten Pulpa lokalisiert, was darauf hinweist, daß die Effektoren gegen Malaria hauptsächlich dort zu finden sind.

Die Notwendigkeit der Milz für die Ausbildung einer Immunität gegen Malaria zeigt sich z.B. dadurch, daß über 80 % der mit *Plasmodium chabaudi* infizierten C57BL/6-Mäuse mit einer intakten Milz die Infektion überleben, wohingegen weniger als 50 % splenektomierter C57BL/6-Mäuse eine Infektion überstehen. Weiterhin bleibt bei den überlebenden splenektomierten Mäusen in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Grun *et al.* [1985] eine deutliche Parasitämie über einen längeren Zeitraum bestehen. Eine noch höhere Sterblichkeitsrate zeigt sich bei den milzlosen Hox11<sup>-/-</sup>-Mäusen, die alle bei sehr hoher Parasitämie sterben.

Auch in immunen Mäusen spielt die Milz eine Rolle bei der Kontrolle der Parasitämie. So zeigen entmilzte immune C57BL/6-Mäuse nach homologer Reinfektion über einen längeren Zeitraum eine latente Parasitämie, während bei immunen C57BL/6-Mäusen mit intakter Milz kaum Parasiten im Blut nachzuweisen sind. Durch die Splenektomie wird ein großer "Pool" an lymphatischen Zellen entfernt, wodurch es zu einer gestörten

Resistenz kommt, die nur teilweise von anderen retikuloendothelialen Organen, wie Leber, Lunge oder Nieren, kompensiert werden kann [Quinn & Wyler, 1979; Smith *et al.*, 1982].

Als erste Verteidigung des Wirtes gegen den Malariaparasiten stellen phagozytische Zellen, welche parasitierte Erythrozyten als „fremd“ erkennen und attackieren [Schwarzer *et al.*, 1992]. Dabei bedienen sich die Makrophagen der Phagozytose und der Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten, wie  $O_2^-$  und  $H_2O_2$ , welche Hämolyse und den Tod des Malariaparasiten verursachen [Brinkmann *et al.*, 1984], sowie der Freisetzung von zytotoxischen Molekülen, wie Zytokinen ( $TNF\alpha$ , IL-1 und IL-6) und Stickoxid [Allison & Eugui, 1983; Clark, 1987; Clark *et al.*, 1989; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1999; Boland & Berzin, 2000; Clark & Schofield, 2000].

In der Milz können die Erythrozyten in zwei Regionen mit phagozytischen Zellen in direkten Kontakt kommen, zum einen im retikulären Netzwerk der roten Pulpa, zum anderen in der marginalen Zone, die rote und weiße Pulpa voneinander trennt [Yadava *et al.*, 1996]. Es wird davon ausgegangen, daß die parasitierten Erythrozyten in der roten Pulpa zurückgehalten und phagozytiert werden. Diese Phagozytose findet vor allem in den einzigartigen extravaskulären Bahnen statt, durch die das Blut fließt, bevor es die Sammelvenen erreicht [Schmidt *et al.*, 1993]. Das retikuläre Netzwerk der roten Pulpa hat eine duale Rolle bei der Filtration. Zum einen stellt es eine enorme Oberfläche zum Kontakt von Blutzellen und Partikeln mit Immuneffektorzellen dar, zum anderen verlangsamt es durch seine starken Verzweigungen den Blutfluß durch die Milz [Moghimi, 1995].

Weithin akzeptiert, aber nie formal nachgewiesen, ist die Meinung, daß die infizierten Erythrozyten sich dem Filtermechanismus der Milz und der phagozytischen Entfernung durch Bindung an die Endothelien von postkapilaren Venen entziehen [Pasloske & Howard, 1994; Ho & White, 1999; Baruch, 2002; Gratepanche *et al.*, 2003; Flick & Chen, 2004]. Diese Zytoadhärenz wird von einer großen Familie von Antigenen auf der Oberfläche der parasitierten Erythrozyten, die Antigenvariationen unterliegen, herbeigeführt.

In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß während einer Malaria eine Auflösung der marginalen Zone induziert und ein "gating"-Mechanismus in der Milz aktiviert wird, welcher infizierte Erythrozyten aus der Milz heraushält. Dieser Ausschluß parasitierter Erythrozyten ist vor allem in der Infektionsphase, die durch massive Zerstörung von parasitierten Erythrozyten gekennzeichnet ist, zu beobachten.

Als Modell für die Untersuchungen wurde der nagerspezifische Erreger *Plasmodium chabaudi* gewählt, welcher ähnliche Fähigkeiten bezüglich Sequestrierung und Antigenvariation wie die humanpathogene Form *Plasmodium falciparum* aufweist [Gilks, 1990], aber leichter im Labor gehalten werden kann. Wie bereits erwähnt, können weibliche C57BL/6-Mäuse eine Infektion mit *Plasmodium chabaudi chabaudi* ausheilen. Es wurde beschrieben, daß Infektionen mit *Plasmodium yoelii* 17XNL [Weiss *et al.*, 1986] oder *Plasmodium chabaudi adami* [Alves *et al.*, 1996], die eine sehr niedrige Pathogenität aufweisen, die Formierung einer Blut-Milz-Barriere induzieren, durch welche die Aufnahme von inerten Partikeln aus Kohlenstoff oder Polystyrol während der Präkrise und der maximalen Parasitämie verhindert wird. Während der Krise kommt es in diesen Modellen zu einem schnellen Wiederöffnen der Milz, was sich in einer höheren Aufnahmekapazität aufgrund des gestiegenen Milzgewichtes niederschlägt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß es während einer Infektion mit *Plasmodium chabaudi chabaudi* zu einer dramatischen Milzvergrößerung kommt. Die Splenomegalie ist das Ergebnis der Vergrößerung von sowohl roter als auch weißer Pulpa. Diese Beobachtung konnte ebenfalls bei Infektionen mit den nicht-letalen Malariaerregern *Plasmodium chabaudi* AS [Stevenson & Kraal, 1989], *Plasmodium chabaudi adami* [Alves *et al.*, 1996], *Plasmodium yoelii* 17XNL [Weiss *et al.*, 1986] und dem letalen Erreger *Plasmodium yoelii* 17XL [Weiss, 1989] gemacht werden. In der späten Präkrise, wenn sich das Milzgewicht in den hier beschriebenen Experimenten etwa verachtfacht hat, konnte eine sehr starke Abnahme in der totalen und spezifischen Aufnahmekapazität der Milz für injizierte 3 µm große Polystyrolpartikel beobachtet werden. Im Gegensatz zu *Plasmodium yoelii* 17XNL [Weiss *et al.*, 1986] und *Plasmodium chabaudi adami* [Alves *et al.*, 1996] zeigte sich

dieser geschlossene Status während der gesamten Krise und begann erst danach sich wieder langsam zu öffnen. Das extreme und nur langsam reversible Absinken der Filtrationskapazität der Milz könnte an der höheren Parasitämie liegen, die durch *Plasmodium chabaudi chabaudi* im Vergleich zu *Plasmodium yoelii* 17XNL [Weiss, 1989; Weiss *et al.*, 1989] und *Plasmodium chabaudi adami* [Alves *et al.*, 1996; Yadava *et al.*, 1996] verursacht wird.

Unsere Beobachtung, daß die Partikel am Tag 0 der Infektion vorwiegend in der marginalen Zone zurückgehalten werden, wohingegen sie während der Krise nur noch vereinzelt in der gesamten Milz vorliegen, stimmt mit der Beobachtung überein, daß die Marginalzonenmakrophagen (MZM) für die Entfernung von inerten Partikeln sowie Bakterien und Viren verantwortlich sind [Kraal, 1992; Aichele *et al.*, 2003]. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, daß die MZM während einer Infektion mit *Plasmodium chabaudi* aus der Milz verschwinden.

Im Gegensatz zu Partikeln werden infizierte Erythrozyten in der roten Pulpa und nicht in der Marginalzone zurückgehalten, und es wurde kein Hinweis auf die Ausbildung einer effektiven Blut-Milz-Barriere während einer Infektion mit *Plasmodium chabaudi adami* gefunden [Yadava *et al.*, 1996]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß bei einer Infektion mit *Plasmodium chabaudi chabaudi* auch für Erythrozyten derselbe "gating"-Mechanismus wie für Partikel gilt. Dieser Unterschied zu den Beobachtungen bei *Plasmodium chabaudi adami* könnte an der unterschiedlichen Virulenz der Parasiten liegen.

Bei der Infektion mit *Plasmodium chabaudi* konnte gezeigt werden, daß die Aufnahmekapazität der Milz für infizierte Erythrozyten am Tag 0 der Infektion etwa zweimal so groß war, wie für nicht-infizierte Erythrozyten. Weiterhin konnte eine Abnahme der Erythrozytenaufnahme während der Präkrise bis hin zu einem totalen Ausschluß der Erythrozyten aus der Milz während der maximalen Parasitämie am Tag 8 *p.i.* und während der Krise beobachtet werden. Erst im weiteren Verlauf der Infektion, am Tag 35 *p.i.*, konnte wieder eine Aufnahme von Erythrozyten in der Milz gezeigt werden, die allerdings noch nicht die Ausgangsaufnahmekapazität erreicht hatte. Bemerkenswerterweise funktionierte der Ausschluß aus der Milz während der Krise genauso gut für normale Erythrozyten, was andeutet, daß dieser zugrundeliegende

Mechanismus nicht davon abhängt, daß die Partikel als „fremd“ erkannt und so von angeborenen Immunmechanismen erfaßt werden. Die Tatsache, daß der Ausschluß sowohl für Polystyrolpartikel, die in der Marginalzone zurückgehalten werden, als auch für Erythrozyten, die in der roten Pulpa festgehalten werden, gilt, deutet darauf hin, daß die marginale Zone den Eintritt von *Plasmodium chabaudi*-infizierten Erythrozyten in die rote Pulpa kontrolliert. Außerdem deutet sie darauf hin, daß marginale metallophile Makrophagen für die Antigenpräsentation verantwortlich sind und damit schützende T-Zellantworten induzieren [Aichele *et al.*, 2003].

Die reduzierte Filtrationskapazität in der Infektionsphase im Bereich der maximalen Parasitämie ist nicht mit einer Abnahme in der Anzahl von phagozytischen Zellen zu erklären, denn im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit eine bis zu vierfach gesteigerte Menge an F4/80<sup>+</sup> Makrophagen und Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten nachgewiesen werden. Auch bei den nicht-phagozytischen Zelltypen konnte eine Zunahme gezeigt werden. Die Steigerung der Makrophagen und Granulozyten ist aber deutlich höher als die von B-, T- und NK-Zellen.

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein wichtiger Mechanismus, der die Entwicklung, Reifung und Aktivierung von Lymphozyten reguliert. Zusätzlich wird angenommen, daß die Apoptose vor Lymphozytenantworten schützt oder sie beendet, um exzessive Entzündungen einzuschränken [van Parijs & Abbas, 1998; Helmby *et al.*, 2000]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es während einer Infektion mit *Plasmodium chabaudi* zu einem Anstieg von apoptotischen Zellen in allen untersuchten Zellpopulationen kommt. Dabei zeigt sich ein besonders starker Anstieg bei den phagozytischen Zellen, d.h. den F4/80<sup>+</sup> Makrophagen und den Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten. Der starke Anstieg an F4/80<sup>+</sup> Makrophagen stimmt mit Beobachtungen von Helmby *et al.* [2000] bei BALB/c-Mäusen überein. Es ist ebenfalls übereinstimmend zu beobachten, daß es im Laufe der Infektion mehr apoptotische B220<sup>+</sup> B-Zellen als CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gibt, deren Anzahl wie auch bei BALB/c-Mäusen [Helmby *et al.*, 2000] nur leicht ansteigt.

Während einer Malariainfektion werden die phagozytischen Zellen der Milz stark umverteilt. Am Tag 0 einer Infektion mit *Plasmodium chabaudi* ist eine exakte Unterteilung der Milz in rote und weiße Pulpa zu erkennen. Dabei sind die

phagozytischen Zellen in der roten Pulpa (F4/80<sup>+</sup> Makrophagen und Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten) sowie in der marginalen Zone (MOMA-1<sup>+</sup>/CD169<sup>+</sup> marginale metallophile Makrophagen und ER-TR9<sup>+</sup> Marginalzonenmakrophagen) zu finden. Mit dem Beginn des Schließens der Milz beginnen die F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in die weiße Pulpa einzuwandern und die Färbung der MOMA-1<sup>+</sup>/CD169<sup>+</sup> marginalen metallophilen Makrophagen (MMM) wird diffus. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion können keine ER-TR9<sup>+</sup> Marginalzonenmakrophagen (MZM) mehr in der Milz nachgewiesen werden. Im geschlossenen Stadium der Milz am Tag 8 *p.i.* können die F4/80<sup>+</sup> Makrophagen zunehmend in der weißen Pulpa gefunden werden, und die Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten sind über die gesamte Milz verteilt. Auch CD169<sup>+</sup> MMM wandern in die weiße Pulpa ein, es bleibt jedoch ein deutlicher Ring um die weiße Pulpa während der gesamten Infektion erhalten. Die Färbung der MMM mit MOMA-1 ist nur noch schwach, was auf eine reduzierte Expression des MOMA-1-Antigens auf den MMM hindeutet. Eine solche erniedrigte Expression wurde ebenfalls bei einer Infektion mit *Leishmania donovani* [Engwerda *et al.*, 2002] gezeigt. Im Bereich der maximalen Parasitämie mit *Plasmodium chabaudi chabaudi* lassen sich, wie bereits für *Plasmodium chabaudi* AS- [Stevenson & Kraal, 1989], *Plasmodium chabaudi adami*- [Yadava *et al.*, 1996] und *Leishmania donovani*- [Engwerda *et al.*, 2002] infizierte Mäuse dargestellt werden konnte, keine ER-TR9<sup>+</sup> MZM mehr nachweisen. In der chronischen Phase der Infektion sind Milzstruktur und Aufnahmekapazität für Erythrozyten, nicht aber für 3 µm Polystyrolpartikel, größtenteils wieder hergestellt. Es befinden sich zwar noch einige F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in der weißen Pulpa, die Mehrheit liegt aber wieder in der roten Pulpa. Auch bei den Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten zeigt sich eine hauptsächliche Organisation in der roten Pulpa. In der Marginalzone ist wieder deutlich ein innerer Ring von MMM zu erkennen, die sowohl CD169- als auch MOMA1-Antigene exprimieren. ER-TR9<sup>+</sup> MZM sind auch am Tag 35 *p.i.* nicht nachzuweisen, was mit einer sehr langsamen Repopulationskinetik übereinstimmt, die auch von Kraal [1992] nach Entfernung dieser Zellen aus der Milz beobachtet werden konnte.

Bei den nicht-phagozytischen Zellen kommt es lediglich zu einer minimalen Umverteilung. B220<sup>+</sup> B-Zellen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bleiben größtenteils auf die weiße Pulpa beschränkt, während das ER-TR7<sup>+</sup> retikuläre Netzwerk während der gesamten Infektion in der roten Pulpa sichtbar ist.

Neben der Umverteilung der phagozytischen Zellen kommt es auch zu Veränderungen bei der Verteilung von infizierten Erythrozyten in der Milz. Am Tag 0 *p.i.* sind die parasitierten Erythrozyten hauptsächlich mit F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in der roten Pulpa und den MOMA-1<sup>+</sup>/CD169<sup>+</sup> marginalen metallophilen Makrophagen in der marginalen Zone und nur gering mit den Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten und dem ER-TR7<sup>+</sup> retikulären Netzwerk in der roten Pulpa kolokalisiert. Am Tag 4 *p.i.* sind wie bereits beschrieben nur noch wenige infizierte Erythrozyten in der Milz zu finden und später, während der Krise nimmt die Milz keine Erythrozyten mehr auf. Am Tag 35 *p.i.* sind Milzstruktur und Erythrozytenaufnahme größtenteils wieder hergestellt, und es ist eine Kolokalisation der parasitierten Erythrozyten mit sowohl den B220<sup>+</sup> B-Zellen und dem ER-TR7<sup>+</sup> retikulären Netzwerk in der marginalen Zone als auch mit den MOMA-1<sup>+</sup>/CD169<sup>+</sup> marginalen metallophilen Makrophagen und F4/80<sup>+</sup> Makrophagen zu beobachten.

Durch die Injektion von TNF $\alpha$  konnte ein Verlust von ER-TR9<sup>+</sup> MZM induziert werden. Diese Erhöhung der TNF $\alpha$ -Konzentration imitiert die Zytokinsekretion von Makrophagen als Antwort auf eine Malariainfektion, die für einen Verlust der ER-TR9<sup>+</sup> MZM verantwortlich zu sein scheint. TNF $\alpha$  könnte auf verschiedenen Wegen dazu führen, so könnte die Apoptose der MZM induziert werden. Alternativ könnte es zu einem Auswandern der Marginalzonenmakrophagen aus der Milz kommen [Engwerda *et al.*, 2002].

Da das richtige "homing" der Milzzellen von Mitgliedern der TNF-Familie kontrolliert wird und um herauszufinden, ob eine gestörte Architektur der marginalen Zone zum Zeitpunkt der maximalen Parasitämie die Filtrationskapazität beeinflusst, wurden in dieser Arbeit Lymphotoxin  $\beta$  Rezeptor (LT $\beta$ R<sup>-/-</sup>), Tumornekrosefaktor Rezeptor I (TNFR1<sup>-/-</sup>)- und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>)- Knockout-Mäuse sowie mit TNF $\alpha$  behandelte C57BL/6-Mäuse untersucht. Die Aufnahme von infizierten Erythrozyten am Tag 0 ist bei LT $\beta$ R<sup>-/-</sup>-Mäusen, denen alle Zellpopulationen der marginalen Zone fehlen [Fütterer *et al.*, 1998], beeinträchtigt, während sie bei TNFR1<sup>-/-</sup>-Mäusen, deren Struktur der Marginalzone nur leicht desorganisiert ist [Fu & Chaplin, 1999], unverändert bleibt. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mäuse weisen Defekte im marginalen Sinus auf. Sie besitzen aber sowohl

marginale metallophile Makrophagen (MMM) als auch Marginalzonenmakrophagen (MZM), wenn auch mit veränderter Formation [Pasparakis *et al.*, 2000]. Ihre Aufnahmekapazität für pRBZ ist leicht verringert. Auch eine Vorbehandlung von naiven C57BL/6-Mäusen mit TNF $\alpha$  führt zu einer Beeinträchtigung der Aufnahme von infizierten Erythrozyten durch die Milz. Zum Zeitpunkt der maximalen Parasitämie ist keine weiter verringerte Aufnahmekapazität für parasitierte Erythrozyten bei LT $\beta$ R<sup>-/-</sup>-Mäusen zu beobachten, bei TNFR1<sup>-/-</sup>- und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich nur eine teilweise geschlossene Milz. Dies deutet darauf hin, daß Signale des LT $\beta$ -Rezeptors und eine intakte Marginalzone für eine optimale Filtrationsfunktion der Milz notwendig sind. Wichtig für den Aufbau der Marginalzone und damit für eine optimale Filtrationskapazität scheint auch TNF $\alpha$  zu sein. Weiterhin scheinen sowohl LT $\beta$ R- als auch TNFR1-abhängige Signalwege am Schließen der Milz beteiligt zu sein.

Zusammen betrachtet zeigen die dieser Arbeit zugrundeliegenden Ergebnisse die Existenz eines malariainduzierten “gating”-Mechanismus in der Milz, der die Aufnahme von Partikeln und infizierten Erythrozyten kontrolliert. Dieses Schließen der Milz verhindert einen Kontakt zwischen den infizierten Erythrozyten und den phagozytischen Zellen. Darum kann die Milz nicht wie früher vermutet direkt an der massiven Zerstörung der parasitierten Erythrozyten beteiligt sein. Dieser Ausschluß von infizierten Erythrozyten deutet vielmehr darauf hin, daß die Entfernung der Parasiten durch die Milz kein signifikanter Evolutionsdruck für die Entwicklung eines hoch entwickelten Sequestrationssystems der *Plasmodien* sein kann. Dieses stimmt mit Beobachtungen überein, die andeuten, daß der entzündungshemmende Effekt der Adhäsion von infizierten Erythrozyten an Makrophagen und myeloide dendritische Zellen zu einem erhöhten Überleben sowohl des Parasiten als auch des Wirts führt. Ein Hauptgrund für das malariainduzierte “gating” mag der Schutz der Milz gegen Überschwemmung durch die parasitierten Erythrozyten sein, welcher verschiedene entzündungsabhängige Schäden verursacht. Im Besonderen ist die Aufnahme von infizierten Erythrozyten, möglicherweise während der frühen Phase der Infektion, wenn die Parasitämie sehr niedrig ist, limitiert, um eine unkontrollierte Aktivierung von Makrophagen mit ihren bekannten immunopathologischen Konsequenzen zu verhindern. Zum Beispiel ist bekannt, daß TNF $\alpha$  und andere proinflammatorische

Mediatoren, die von Milzmakrophagen produziert werden, an der Entstehung von cerebraler Malaria und Anämie beteiligt sind [Li *et al.*, 2001]. Für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort in der weißen Pulpa sind nur geringe Mengen an Antigen notwendig. Die F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, die von der roten in die weiße Pulpa einwandern, könnten dort die Aufgabe als antigenpräsentierende Zellen ausüben und so schützende T- und B-Zell-Antworten induzieren. Es ist bekannt, daß das Überleben einer akuten Malaria von T<sub>H</sub>1-Antworten [Langhorne *et al.*, 2002] und der Erythropoese der Milz [Chang *et al.*, 2004] und die abschließende Entfernung der Parasiten durch B-Zellen [Langhorne *et al.*, 2002] abhängen. Aufgrund dieser Erkenntnisse kann man vermuten, daß der malariainduzierte “gating”-Prozeß die Hämatopoese der Milz und die Reifung von T- und B-Effektorzellen gegen vernichtende Effekte einer unkontrollierten Entzündung schützt.

## 4.2 Wirkung von Testosteron

Seit einigen Jahren ist bereits bekannt, daß es Interaktionen zwischen dem Immunsystem und dem endokrinen System gibt. Im Zusammenhang damit liegen Hinweise dafür vor, daß bei verschiedenen Immunreaktionen besonders die Geschlechtshormone eine Rolle spielen. Mittlerweile ist bekannt, daß männliche Geschlechtshormone einen supprimierenden Effekt auf die humorale und die zellvermittelte Immunantwort haben, während das weibliche Geschlechtshormon Östradiol nur die zellvermittelte Immunantwort supprimiert, die humorale aber stimuliert [Alexander & Stimson, 1988]. Ebenso zeigen eine Reihe von Untersuchungen den supprimierenden Einfluß von Testosteron auf die verschiedensten zellulären und humoralen Immunantworten *in vivo* und *in vitro* [Kotani *et al.*, 1974; Morton *et al.*, 1981; Weinstein & Berkovich, 1981; Dunkel *et al.*, 1985; Rifé *et al.*, 1990]. Ein Geschlechtsdimorphismus zeigt sich auch bei verschiedenen Krankheiten, einschließlich Infektionskrankheiten. So konnte in dieser Arbeit übereinstimmend mit älteren Ergebnissen bei C57BL/10-Mäusen [Wunderlich *et al.*, 1988; Benten *et al.*, 1991] gezeigt werden, daß bei weiblichen C57BL/6-Mäusen ein resistenter Phänotyp gegen eine *Plasmodium chabaudi*-Infektion durch vorherige Behandlung mit Testosteron in einen suszeptiblen Phänotyp umgewandelt werden kann. Daraus und aus

der Tatsache, daß kastrierte Männchen im Gegensatz zu unbehandelten Tieren eine Infektion überleben [Wunderlich *et al.*, 1988], läßt sich erkennen, daß Testosteron eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Wirtsabwehr gegen Malaria spielt.

Es ist aber noch völlig ungeklärt, durch welche Vorgänge oder Mechanismen dieser Wechsel der Wirtsabwehr von Resistenz zu Suszeptibilität vollzogen wird. Ein möglicher Grund für die testosteroninduzierte Konversion der Wirtsabwehr könnte eine mangelhafte Ausbildung von protektiven Immunmechanismen sein. So könnte Testosteron die Ausbildung protektiver Immunmechanismen supprimieren oder eine Aufhebung bewirken. Eine andere Möglichkeit könnte das Ausbilden von Immunmechanismen trotz Testosteronbehandlung darstellen, die aber nicht zur Wirkung kommen.

Während einer Malariainfektion kommt es zu deutlichen Veränderungen der Milz. Es konnte gezeigt werden, daß Testosteron einen direkten und/oder indirekten Einfluß auf die Milz hat. Zum einen zeigt die Milz im Vergleich zu anderen Lymphorganen eine relativ hohe Bindungskapazität für Testosteron [Stimson, 1987], zum anderen konnte beobachtet werden, daß die Anzahl der Milzzellen bei Testosteronbehandlung abnimmt [Ahmed *et al.*, 1985; Benten *et al.*, 1991].

Um einen Aufschluß über den Einfluß von Testosteron auf die Wirtsabwehr zu bekommen, wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Testosteron auf die Immuneffektormechanismen der Milz untersucht.

Bei histologischen Betrachtungen der Milz nach einer dreiwöchigen Behandlung mit Testosteron zeigen sich anhand von lichtmikroskopischen Präparaten keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu vehikelbehandelten Mäusen. Auch bei der Lokalisation der untersuchten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der B220<sup>+</sup> B-Zellen, Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten, dem ER-TR7<sup>+</sup> retikulären Netzwerk und den F4/80<sup>+</sup>, ER-TR9<sup>+</sup> und MOMA-1<sup>+</sup>/CD169<sup>+</sup> Makrophagenpopulationen ergab sich kein Unterschied zwischen testosteron- und vehikelbehandelten Tieren.

Im Gegensatz zu Beobachtungen bei C57BL/10-Mäusen [Benten *et al.*, 1991] führte die Testosteronbehandlung bei C57BL/6-Mäusen zu keiner signifikanten Änderung der Gesamtmilzlymphozytenanzahl. Auch bei einer durchflußzytometrischen Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den untersuchten Lymphozyten-

populationen, wohingegen es bei C57BL/10-Mäusen durch Testosteronbehandlung zu einem niedrigeren CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Quotienten kommt [Benten *et al.*, 1991]. Bei der Untersuchung der Anzahl der apoptotischen Zellen dieser Lymphozytenpopulationen war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu beobachten.

Es gibt Hinweise darauf, daß T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Ausbildung einer schützenden Immunität gegen *Plasmodium chabaudi* spielen. So führt eine Aktivierung von T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Produktion von schützenden IgG Antikörpern durch B-Zellen [Langhorne, 1989; Stevenson & Tam, 1993; Taylor-Robinson *et al.*, 1993]. Es konnte auch gezeigt werden, daß Testosteron eine Antwort von T<sub>H</sub>2-Zellen beeinträchtigt und damit eine Verstärkung der Pathogenität von *Coxsackievirus*-infektionen in weiblichen Mäusen auslöst [Huber & Pfaeffle, 1994]. Deshalb wäre es ebenfalls möglich, daß bei der durch Testosteron ausgelösten Suszeptibilität gegen *Plasmodium chabaudi*-Malaria eine beeinträchtigte T-Zell-Antwort beteiligt ist. Übereinstimmend mit dieser Annahme beobachteten Benten *et al.* [1991], daß T-Zellen der Milz sofort nach Testosteronbehandlung einen suszeptiblen Phänotyp annehmen.

Die von B-Zellen produzierten IgG Antikörper sind in erster Linie für die Herbeiführung einer schützenden Immunität gegen *Plasmodium chabaudi* [Langhorne *et al.*, 1984; Falanga *et al.*, 1987; Wunderlich *et al.*, 1992] wie auch gegen andere *Plasmodium*-Arten inklusive *Plasmodium falciparum* [Cohen *et al.*, 1961; Groux & Gysin, 1990; Bouharoun-Tayoun & Druihle, 1992] wichtig. Sofort nach einer Testosteronbehandlung wird die Gesamt-IgG Antikörperkonzentration in nicht-infizierten Mäusen um ca. 50 % reduziert, und die Tiere überleben eine anschließende Malariainfektion nicht mehr [Benten *et al.*, 1997].

Einen weiteren Effektor gegen Malaria stellen die phagozytischen Zellen dar. Die Phagozytose der infizierten Erythrozyten wird durch an der Oberfläche dieser Erythrozyten gebundene IgG Antikörper gesteigert [Arese *et al.*, 1991]. Wie mikroskopische- und durchflußzytometrische-Analysen der vorliegenden Arbeit zeigen, hat Testosteron keinen Einfluß auf die Lokalisation und Anzahl der Makrophagen und Granulozyten in der Milz. So zeigen testosteronbehandelte Mäuse in allen Arealen der

Milz dieselben Muster der Zellmigration wie vehikelbehandelte Mäuse. Auch auf die "gating"-Funktion der Milz hat Testosteron keinen Einfluß. Es zeigt sich aber, daß die aufgenommenen Erythrozyten mit Makrophagen kolokalisiert sind.

Um ein genaueres Bild über die mögliche Einflüsse von Testosteron auf die Phagozytose von Makrophagen zu erlangen, wurden in dieser Arbeit RAW 264.7 Makrophagen mit rotfluoreszierenden, PKH26-markierten Erythrozyten bzw. grünfluoreszierender *Saccharomyces cerevisiae* (YSH19-GFP) inkubiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß bei dem aktiven, temperaturabhängigen Prozeß der Phagozytose die Aufnahme von nicht-infizierten PKH26-markierten Erythrozyten viermal niedriger war, als die von infizierten PKH26-markierten Erythrozyten. Dies stimmt damit überein, daß in der Maus bzw. Ratte infizierte Erythrozyten schneller als nicht-parasitierte Erythrozyten aus der Zirkulation entfernt werden [Quinn & Wyler, 1979; Smith *et al.*, 1982]. Der Fc-Rezeptor der Makrophagen erkennt die Bindung von IgG auf der Oberfläche von Erythrozyten. Eine Aktivierung benötigt jedoch Tausende IgG Moleküle pro Zelle [Hunt *et al.*, 1981]. Die Phagozytose von opsonisierten Zellen wird außerdem vom Komplement herbeigeführt [Wright, 1985], wobei der Fc-Rezeptor die Aufnahme initiiert, während der Komplementrezeptor das feste Binden der Partikel auslöst. Beide Wege sind nur gemeinsam wirksam [Kurlander & Rosse, 1979]. Erythrozyten, die von reifen Stadien von "knob"-produzierenden *Plasmodium falciparum* befallen sind, binden mehr IgG aus naivem Serum als nicht-infizierte Erythrozyten [Winograd *et al.*, 1987]. So käme es zu stärkerer Phagozytose von parasitierten Erythrozyten.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß *Saccharomyces cerevisiae* (YSH19-GFP) Hefen in hitzeinaktiviertem Serum, im Gegensatz zu nicht inaktiviertem Serum, nicht innerhalb von drei Stunden von RAW 264.7 Makrophagen phagozytiert werden. Daraus läßt sich eine starke Präferenz von RAW 264.7 Zellen für an Infektionserreger oder parasitierte Erythrozyten gebundene IgG Antikörper ableiten.

Aus allen bisher bekannten Hinweisen ließ sich vermuten, daß Veränderungen der Lymphozyten-Subpopulationen der Milz, wie sie z.B. auch von Ahmed *et al.* [1985]

beschrieben wurden, eine Ursache für die testosteroninduzierte Immunsuppression sein könnte. So wäre es möglich, daß Suppressor-T-Zellen die B-Lymphozyten bei der Ausbildung bestimmter Antikörper hemmen oder daß es zu Störungen bei der Antigenpräsentation kommt. In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, daß es bei C57BL/6-Mäusen im Gegensatz zu C57BL/10-Mäusen durch Testosteronbehandlung zu keinen signifikanten Änderungen der Lymphozytenpopulationen der Milz während einer *Plasmodium chabaudi*-Infektion kommt. Es dürften daher noch andere Mechanismen bei der Konversion der Wirtsabwehr von Resistenz zu Suszeptibilität eine Rolle spielen. So wird diese Konversion wahrscheinlich durch ein Zusammenspiel von verschiedenen Zellpopulationen und Subpopulationen des Immunsystems verursacht. Dabei wäre es möglich, daß Testosteron bereits im Verlauf der Differenzierung einzelner Zellpopulationen Einfluß nimmt und diverse Veränderungen bewirkt.

### 4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Milz nicht direkt an der massiven Zerstörung von parasitierten Erythrozyten bei C57BL/6-Mäusen beteiligt ist. Vor allem während der Präkrise und der Krise müssen andere lymphatische Organe an der Entfernung der infizierten Erythrozyten beteiligt sein. So müßten diese sowie andere phagozytisch aktive Organe, wie z.B. die Leber, in Hinblick auf Aufnahme und Phagozytose von parasitierten Erythrozyten untersucht werden.

Ein weiteres Ziel genauerer Untersuchungen müßten die  $LT\beta R$ - und  $TNFR1$ -abhängigen Signalwege und die Wirkung von  $TNF\alpha$  sein, die für eine optimale Filtrationsfunktion der Milz wichtig und am Schließen der Milz beteiligt zu sein scheinen.

Ferner ist der genaue Weg für die Konversion der Wirtsabwehr von Resistenz zu Suszeptibilität durch Testosteron weiter zu untersuchen, wobei vor allem das Zusammenspiel von Immunzellen und die möglichen "targets" für Testosteron in der Milz und anderen Lymphorganen beobachtet werden müßte. Dabei wäre ebenfalls interessant, ob Testosteron eine direkte Auswirkung auf die Effektororgane hat oder ob es vielleicht auch über indirekte Kaskaden einen Einfluß auf die Immunantwort gibt.



## 5 Zusammenfassung

Die Milz spielt eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Blutstadien der Malaria im Wirt. So dient sie (i) als Filter, der beschädigte oder immunologisch modifizierte Erythrozyten aussortiert, (ii) als Umgebung für die Interaktion von Parasiten mit Immunzellen und ihren Produkten, sowie (iii) als Ort der Hämatopoese. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Rolle der Milz als Effektor gegen *Plasmodium chabaudi* Malaria zu untersuchen.

Weibliche C57BL/6-Mäuse sind resistent gegen Infektionen mit *Plasmodium chabaudi* Blutstadien. Dagegen sterben über 50 % splenektomierter C57BL/6-Mäuse und 100 % milzloser Hox11<sup>-/-</sup>-Mäuse, die für diese Infektion besonders empfindlich sind. Die überlebenden Mäuse entwickeln eine schützende Immunität, wobei die Milz als Anti-Malaria Effektor fungiert. Analysen der Milzzellen und der apoptotischen Milzzellen mittels Durchflußzytometrie zeigten, daß die Anzahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der B220<sup>+</sup> B-Zellen, der F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, der Gr-1<sup>+</sup> Granulozyten und der 2B4<sup>+</sup> NK-Zellen sich während der ersten acht Tage mehr als verdoppelt. Außerdem verursacht Malaria dramatische Veränderungen in der Filtrationskapazität der Milz, die durch Quantifizierung der Aufnahme fluoreszierender intravenös injizierter Mikropartikel bzw. PKH26-markierter Erythrozyten nachgewiesen wurden. In der ersten Phase der Infektion (frühe Präkrise) ist die Milz geöffnet und nimmt eine große Anzahl von Partikeln und Erythrozyten auf. In dieser Phase der Infektion beginnen die F4/80<sup>+</sup> Makrophagen der roten Pulpa in die weiße Pulpa einzuwandern, und es lassen sich keine ER-TR9<sup>+</sup> Marginalzonenmakrophagen (MZM) mehr nachweisen. Die Marginalzone der Milz löst sich während einer Infektion mit *Plasmodium chabaudi* auf. In der späten Präkrise werden die filtrierenden Bereiche der Milz verschlossen, so daß praktisch keine Mikropartikel bzw. Erythrozyten mehr aufgenommen werden. Bei Lymphotoxin  $\beta$  Rezeptor  $\gamma$  (LT $\beta$ R $\gamma$ <sup>-/-</sup>)-Mäusen fehlen alle Zellpopulationen der marginalen Zone, und die Aufnahme ist stark beeinträchtigt. Bei TNFR1 $\gamma$ <sup>-/-</sup>- und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mäusen ist die Struktur der Marginalzone nur leicht desorganisiert, und die Aufnahme bleibt unverändert. Während der Infektion mit *Plasmodium chabaudi* zeigt sich bei LT $\beta$ R $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen keine und bei TNFR1 $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen eine verminderte Abnahme in der Filtrationskapazität. Dies deutet darauf hin, daß sowohl LT $\beta$ R- als auch TNFR1-abhängige Signalwege, sowie die TNF $\alpha$ -Konzentration, beim malariainduzierten Schließen der Milz beteiligt sind.

Testosteron hat bei C57BL/6-Mäusen keinen Einfluß auf die Zunahme von Lymphozytenpopulationen der Milz, die Zellmigration dieser Lymphozytenpopulationen oder die Filtrationskapazität, obgleich es den Phänotyp von Resistenz zu Suszeptibilität konvertiert.

Das malariainduzierte Verschließen der Milz beginnt vor dem Parasitämie maximum und bleibt während der gesamten Krisephase bestehen, wenn die infizierten Erythrozyten massiv zerstört werden. Daraus läßt sich schließen, (i) daß die Anti-Malaria Effektorfunktion der Milz während der Krise nicht in der Phagozytose von infizierten Erythrozyten bestehen kann, und (ii) daß das hochentwickelte Sequestrierungssystem der *Plasmodium* Parasiten nicht entwickelt wurde, um der Entfernung durch die Milz zu entgehen.



## 6 Literatur

- Achtman A.H., Khan M., MacLennan I.C.M. und Langhorne J.** [2003]: *Plasmodium chabaudi chabaudi* Infection in Mice Induces Strong B Cell Responses and Striking But Temporary Changes in Splenic Cell Distribution: *J. Immunol.*; **171**: 317-324
- Ahmed S.A., Dauphinée M.J. und Talal N.** [1985]: Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice: *J. Immunol.*; **134**: 204-210
- Ahmed S.A., Talal, N., and Christadoss, P.** [1987]: Genetic-Regulation of Testosterone-Induced Immune Suppression: *Cell. Immunol.* **104**, 91-98
- Aichel P., Zinke J., Grode L., Schwendener R.A., Kaufmann S.H.E. und Seiler P.** [2003]: Macrophages of the Splenic Marginal Zone Are Essential for Trapping of Blood-Borne Particulate Antigen but Dispensable for Induction of Splenic T Cell Responses: *J. Immunol.*; **171**: 1148-1155
- Alexander J. und Stimson W.H.** [1988]: Sex Hormones and the Course of Parasite Infection: *Parasitol. Today*; **4**: 189-193
- Allison A.C. und Eugui E.M.** [1983]: The role of cell-mediated immune responses in resistance to malaria, with special reference to oxidant stress: *Ann. Rev. Immunol.*; **1**: 361-392
- Alves H.J., Weidanz W. und Weiss L.** [1996]: The spleen in murine *Plasmodium chabaudi adami* malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; **55**: 370-378
- Amante F.H. und Good M.F.** [1997]: Prolonged Th1-like response generated by a *Plasmodium yoelii*-specific T cell clone allows complete clearance of infection in reconstituted mice: *Parasite Immunol.*; **19**: 111-126
- A Med-World AG** [2004]: *Malaria*: Internetseite der A Med-World AG, Aktiengesellschaft zur Darstellung von Medizin und Gesundheit im Internet, Berlin [www.medicine-worldwide.de](http://www.medicine-worldwide.de)
- Arese P., Turrini F. und Ginsburg H.** [1991]: Erythrophagocytosis in malaria: Host defence or menace to the macrophage?: *Parasitol Today*.; **7**: 25-28

- Artavanis-Tsakonas K., Tongren J.E. und Riley E.M.** [2003]: The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology: *Clin. Exp. Immunol.*; **133**: 145-152
- Baruch D.I., Gormley J.A., Ma C., Horward R.J. und Pasloke B.L.** [1996]: *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intracellular adhesion molecule 1: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **93**: 3497-3502
- Baruch D.I., Ma X.C., Singh H.B., Bi X., Paslaske B.L., Howard R.J.** [1997]: Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequences: *Blood*; **90**: 3766-3775
- Baruch D.I., Rogerson S.J. und Cooke B.M.** [2002]: Asexual blood stages of malaria antigens: cytoadherence: *Chem Immunol.*; **80**: 144-162
- Bayer AG** [2002]: Süßer Wermut bringt Hoffnung: *Research – Das Bayer Forschungsmagazin*; **14**: 74-79
- Beeson J.G., Rogerson S.J., Cooke B.M., Reeder J.C., Chai W., Lawson A.M., Molyneux M.E. und Brown G.V.** [2000]: Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria: *Nature Med.*; **6**: 86-90
- Benten W.P., Bettenhäuser U., Wunderlich F., Van V.E. und Mossmann H.** [1991]: Testosterone-induced abrogation of self-healing of *Plasmodium chabaudi* malaria in B10 mice: *Infect. Immun.*; **59**: 4486-4490
- Benten W.P., Wunderlich F., Herrmann R. und Kuhn V.W.** [1993]: Testosterone-induced compared with oestradiol-induced immunosuppression against *Plasmodium chabaudi* malaria: *J. Endocrin.*; **139**: 487-494
- Benten W.P., Ulrich P., Kuhn-Velten W.N., Vohr H.W. und Wunderlich F.** [1997]: Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: persistence after withdrawal of testosterone: *J Endocrin.* ;**153**: 275-281
- Berendt A.R., Simmons D., Tansey J., Newbold C.K. und Marsh K.** [1989]: Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is an endothelial cytoadherence receptor for *Plasmodium falciparum*: *Nature*; **341**: 57-59
- Bolad A. und Berzins K.** [2000]: Antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* and antibody-mediated parasite neutralization: *Scand. J. Immunol.*; **52**: 233-239

- Bommer W., Christophel E.M., Dupont W., Kuhlencord A. und Mergeryan H.** [1990]: [Imported malaria infections. Experiences with more than 100 malaria patients in Gottingen and Kassel 1986 to February 1990. Guidelines for diagnosis, therapy and prevention]: *Med Klin (Munich)*; **85**:310-318
- Bouharoun-Tayoun H., Attanath P., Sabchareon A., Chongsuphajaisiddhi T. und Druilhe P.** [1990]: Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro*, but act in cooperation with monocytes: *J. Exp. Med.*; **172**: 1633-1641
- Bouharoun-Tayoun H. und Druilhe P.** [1992]: *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity: *Infect. Immun.*; **60**: 1473-1481
- Bowdler A. J.** [1990]: The Spleen. Structure, Function and Clinical Significance: *Chapman and Hall Medical, London*: 515 ff
- Brabin L. und Brabin B.J.** [1992]: Parasitic infections in women and their consequences: *Adv. Parasitol.*; **31**: 1-81
- Brinkmann V., Kaufmann S.H.E., Simon M.M. und Fischer H.** [1984]: Role of Macrophages in Malaria: O<sub>2</sub> Metabolite Production and Phagocytosis by Splenic Macrophages During Lethal *Plasmodium berghei* and Self-Limiting *Plasmodium yoelii* Infection in Mice: *Infect. Immun.*; **44**: 743-746
- Brown A.R.** [1992]: Immunological function of splenic B lymphocytes: *Crit. Rev. Immunol.*; **11**: 395-417
- Brown H., Turner G., Rogerson S., Tembo M., Mwenechanya J., Molyneux M. und Taylor T.** [1999]: Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria: *J. Infect. Dis.*; **180**: 1742-1746
- Bull P.C. und Marsh K.** [2002]: The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria: *Trends Microbiol.*; **10**: 55-58
- Butcher G.A.** [1996]: Models for Malaria: Nature knows best. *Parasitol. Today*; **12**: 378-382
- Cavacini L.A., Parke L.A. und Weidanz W.P.** [1980]: Resolution of acute malarial infections by T cell-dependent non-antibody mediated mechanisms of immunity: *Infect. Immun.*; **58**: 2940-2946

- Celada A., Cruchaud A. und Perrin L.H.** [1983]: Phagocytosis of *Plasmodium falciparum* parasitized-erythrocytes by human polymorphonuclear leukocytes: *J. Parasitol.*; **69**: 49-53
- Chang K.-H., Tam M. und Stevenson M.M.** [2004]: Inappropriately low reticulocytosis in severe malaria anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors: *Blood*; **103**: 3727-3735
- Chotivanich K., Udomsangpetch R., McGready R., Proux S., Newton P., Pukrittayakamee S., Looareesuwan S. und White N.J.** [2000]: Central role of the spleen in malaria parasite clearance: *J. Infect. Dis.*; **185**: 1538-1541
- Clark J.A.** [1987]: Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria: *Parasitol. Today*; **3**: 300-305
- Clark J.A., Chaudhri G. und Cowden W.B.** [1989]: Some roles of free radicals in malaria: *Free Radic. Biol. Med.*; **6**: 315-321
- Clark J.A. und Schofield L.** [2000]: Pathogenesis of malaria: *Parasitol. Today*; **16**: 451-454
- Coffman R.L., Leberman D.A. und Rothman P.** [1993]: Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching: *Adv. Immunol.*; **54**: 229-270
- Cohen S., McGregor I.A. und Carrington S.C.** [1961]: Gamma globulin and acquired immunity to human malaria: *Nature*; **192**: 733-737
- Connor J., Pak C.C. und Schroit A.J.** [1994]: Exposure of Phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells: *J. Biol. Chem.*; **269**: 2399-2404
- Dockrell H.M., Desouza J.B. und Playfair J.H.L.** [1980]: The Role of the Liver in Immunity to Blood-Stage Murine Malaria: *Immunology*; **41**: 421-430
- Dunkel L., Taino V.M., Savilahti E. und Eskola J.** [1985]: Effect of endogenous androgens on lymphocyte subpopulations: *Lancet.*; **2**: 440-441
- Eling W.M.C.** [1982]: Chronic, patent *Plasmodium berghei* malaria in splenectomized mice: *Infect. Immun.*; **35**: 880-886

- Engwerda C.R., Ata M., Cotterell S.E., Mypott T.L., Tschannerl A., Gorak-Stolinska P.M.A. und Kaye P.M.** [2002]: A Role for Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Remodeling the Splenic Marginal Zone during *Leishmania donovani* Infection: *Am. J. Pathol.*; **161**: 429-437
- Faber, H. von und Haid, H.** [1980]: Endokrinologie; Biochemie und Physiologie der Hormone; *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*: 74-83
- Falanga P.B., D'Imperio Lima M.R., Coutinho A. und Pereira da Silva L.** [1987]: Isotypic pattern of the polyclonal B cell response during primary infection by *Plasmodium chabaudi* and in immune-protected mice: *Eur. J. Immunol.*; **17**: 599-603
- Favila-Castillo L., Monroy-Ostria A., Kobayashi E., Hirunpecharat C., Kamada N. und Good M.F.** [1996]: Protection of rats against malaria by transplated immune spleen: *Parasite Immunol.*; **18**: 325-331
- Ferrante A., Kumaratilake L., Rzepczyk C.M. und Dayer J.-M.** [1990]: Killing of *Plasmodium falciparum* by cytokine-activated effector cells (neutrophils and macrophages): *Immunol. Lett.*; **25**: 179-188
- Fitch F.W., McKisic M.D., Lancki D.W. und Gajewski T.F.** [1993]: Differential regulation of murine T lymphocyte subsets; *Annu. Rev. Immunol.*; **11**: 29-48
- Flick K. und Chen Q.** [2004]: var genes, PfEMP1 and the human host: *Mol Biochem Parasitol.*; **134**: 3-9
- Fu Y.-X. und Chaplin D.D.** [1999]: Development and Maturation of secondary lymphoid tissues: *Annu. Rev. Immunol.*; **17**: 399-433
- Fütterer A., Mink K., Luz A., Kosco-Vilbois M.H. und Pfeffer K.** [1998]: The Lymphotoxin  $\beta$  receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues: *Immunity*; **9**: 59-70
- Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., Paulsen I.T., James K., Eisen J.A., Rutherford K., Salzberg S.L., Craig A., Kyes S., Chan M.-S., Nene V., Shallom S., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Pertea M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M.W., Vaidya A.B., Martin D.M.A., Fairlamb A.H., Fraunholz M.J., Roos D.S., Ralph S.A., McFadden G.I., Cummings L.M., Subramanian G.M., Mungall C., Venten J.C., Carucci D.J., Hoffman S.L., Newbold C., Davis R.W., Frasen C.M. und Barrell B.** [2002]: Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Nature*; **419**: 498-511

- Garnham P.C.** [1970]: The role of the spleen in protozoal infections with special reference to splenectomy: *Acta Trop.*; **27**: 1-14
- Gilks C.F., Walliker D. und Newbold C.I.** [1990]: Relationships between sequestration, antigenic variation and chronic parasitism in *Plasmodium chabaudi chabaudi* - a rodent malaria model: *Parasite Immunol.*; **12**: 45-64
- Gratepanche S, Gamain B, Smith JD, Robinson BA, Saul A, Miller LH.** [2003]: Induction of crossreactive antibodies against the *Plasmodium falciparum* variant protein: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; **100**: 13007-13012
- Green T.J., Morhardt M., Brackett R.G. und Jacobs R.L.** [1981]: Serum inhibition of merozoite dispersal from *Plasmodium falciparum* schizonts: indicators of immune status: *Infect. Immun.*; **31**: 1203-1207
- Greenwood B. und Mutabingwa T.** [2002]: Malaria in 2002: *Nature*; **415**: 670-672
- Groux H. und Gysin J.** [1990]: Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *P. falciparum*: functional role of IgG subclasses: *Res. Immunol.*; **141**: 529-542
- Grun J.L. und Weidanz W.P.** [1981]: Immunity to *Plasmodium chabaudi adami* in the B-cell-deficient mouse: *Nature*; **290**: 143-145
- Grun J.L., Long C.A. und Weidanz W.P.** [1985]: Effects of splenectomy on antibody-independent immunity to *Plasmodium chabaudi adami* malaria: *Infect. Immun.*; **48**: 853-858
- Helmby H., Jönsson G. und Troye-Blomberg** [2000]: Cellular Changes and Apoptosis in the Spleen and Peripheral Blood of Mice Infected with Blood-Stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS: *Infect. Immun.*; **68**: 1485-1490
- Heymann D.L.** [2000]: The Urgency of a Massive Effort against Infectious Diseases: *WHO*
- Ho M. und White N.J.** [1999]: Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria: *Am. J. Physiol.*; **276**: C1231-C1242
- Hoffman S.L., Franke E.D., Hollingdal M.R. und Druihle P.** [1996]: Attacking the infected hepatocyte: Malaria Vaccine Development: A Multi-immune Response Approach: *ASM Press, Washington DC (Hoffman S.L. (ed.))*: 105-143

Holt R.A., Subramanian G.M., Halpern A., Sutton G.G., Charlab R., Nusskern D.R., Wincker P., Clark A.G., Ribeiro J.M.C., Wides R., Salzberg S.L., Loftus B., Yandell M., Majoros W.H., Rusch D.B., Lai Z., Kraft C.L., Abril J.F., Anthouard V., Arensburger P., Atkinson P.W., Baden H., de Berardinis V., Baldwin D., Benes V., Biedler J., Blass C., Bolanos R., Boscus D., Barnstead M., Cai S., Center A., Chaturvedi K., Christophides G.K., Chrystal M.A., Clamp M., Cravchik A., Curwen V., Dana A., Delcher A., Dew I., Evans D.A., Flanigan M., Grundschober-Freimoser A., Friedli L., Gu Z., Guan P., Guigo R., Hillenmeyer M.E., Hladun S.L., Hogan J.R., Hong Y.S., Hoover J., Jaillon O., Ke Z., Kodira C., Kokoza E., Koutsos A., Letunic I., Levitsky A., Liang Y., Lin J.-J., Lobo N.F., Lopez J.R., Malek J.A., McIntosh T.C., Meister S., Miller J., Mobarry C., Mongin E., Murphy S.D., O'Brochta D.A., Pfannkoch C., Qi R., Regier M.A., Remington K., Shao H., Sharakhova M.V., Sitter C.D., Shetty J., Smith T.J., Strong R., Sun J., Thomasova D., Ton L.Q., Topalis P., Tu Z., Unger M.F., Walenz B., Wang A., Wang J., Wang M., Wang X., Woodford K.J., Wortman J.R., Wu M., Yao A., Zdobnov E.M., Zhang H., Zhao Q., Zhao S., Zhu S.C., Zhimulev I., Coluzzi M., della Torre A., Roth C.W., Louis C., Kalush F., Mural R.J., Myers E.W., Adams M.D., Smith H.O., Broder S., Gardner M.J., Fraser C.M., Birney E., Bork P., Brey P.T., Venter J.C., Weissenbach J., Kafatos F.C., Collins F.H. und Hoffman S.L. [2002]: The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: *Science*; **298**: 129-149

Huber S.A, und Pfaeffle B. [1994]: Differential Th<sub>1</sub> and Th<sub>2</sub> responses in male and female BALB/c mice infected with Coxsackievirus group B Type 3: *J. Virol.*; **68**: 5126-5132

Hunt J.S., Beck M.L. und Wood G.W. [1981]: Monocyte-mediated erythrocyte destruction. A comparative study of current methods: *Transfusion*; **21**: 735-738

Jacobs P., Radzioch D. und Stevenson M.M. [1995]: Nitric oxide expression in spleen, but not in liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice: *J. Immunol.*; **155**: 5306-5313

Jacobs P., Radzioch D. und Stevenson M.M. [1996]: *In vivo* regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood-stage malaria in mice: *Infect. Immunol.*; **64**: 44-49

Jensen J.B. [1989]: Malaria crisis forms: intraerythrocytic development derangement: Malaria: Host Response to Infection: *CRC Press, Boca Raton, Fla* (Stevenson M.M. (ed.))

Kamis A.B. und Ibrahim J.B. [1987]: Effects of Testosterone on Blood Leukocytes in *Plasmodium berghei*-Infected Mice: *Parasitol. Res.*; **75**: 611-613

- Kean B., Matt K. und Russel A.** (eds.) [1987]: Tropical Medicine and Parasitology: Vol 1: Classical Investigations. Ithaca: *Cornell University Press*
- Klein J.** [1975]: In: Biology of the mouse histocompatibility-2 complex: *Springer-Verlag, Berlin*
- Korner H., Cook M., Riminton D.S., Lemckert F.A., Hoek R.M., Ledermann B., Kontgen F., Fazekas de St Groth B. und Sedgwick J.D.** [1997]: Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissues: *Eur. J. Immunol.*; **27**: 2600-2609
- Kotani M., Nawa Y. und Fujii H.** [1974]: Inhibition by testosterone of immune reactivity and of lymphoid regeneration in irradiated and marrow reconstituted mice: *Experientia.*; **30**: 1343-1345
- Kraal G.** [1992]: Cells in the Marginal Zone of the Spleen: *Int. Rev. Cyt.*; **132**: 31-74
- Krammer P.H., Behrmann I., Daniel P., Dhein J. und Debatin K.M.** [1994]: Regulation of Apoptosis in the Immune-System: *Cur. Opin. Immunol.*; **6**: 279-289
- Kumar S., Good M.F., Dontfraid F., Vinetz J.M. und Miller L.H.** [1989]: Interdependence of CD4<sup>+</sup> T cells and malarial spleen in immunity to *Plasmodium vinckei vinckei*: *J. Immunol.*; **143**: 2017-2023
- Kuramar S. und Miller L.H.** [1990]: Cellular mechanisms in immunity to blood stage infection: *Immunol. Lett.*; **25**: 109-114
- Kurlander R.J. und Rosse W.F.** [1979]: Monocyte-mediated destruction in the presence of serum of red cells coated with antibody: *Blood*; **54**: 1131-1139
- Kwiatkowski D.** [1992]: Malaria - Becoming More Specific About Nonspecific Immunity: *Cur. Opin. Immunol.*; **4**: 425-431
- Langhorne J., Evans C.B., Asofsky R. und Taylor D.W.** [1984]: Immunglobulin isotype distribution of malaria-specific antibodies produced during infection with *Plasmodium yoelii*: *Cell. Immunol.*; **87**: 452-461
- Langhorne J.** [1989]: The role of CD4<sup>+</sup> T-cells in the immune response to *Plasmodium chabaudi*: *Parasitol. Today*; **5**: 362-364

- Langhorne J. und Simon-Haarhaus B.** [1991]: Different T cell response to *Plasmodium chabaudi chabaudi* in peripheral blood and spleens of C57BL/6 mice during infection: *J. Immunol.*; **146**: 2771-2775
- Langhorne J., Mombaerts P. und Tonegawa S.** [1995]:  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T cells in the immune responses to the erythrocytic stages of malaria in mice: *Int. Immunol.*; **7**: 1006-1011
- Langhorne J., Quin S.J. und Sanni L.A.** [2002]: Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology: *Chem Immunol.*; **80**: 204-228
- Li C., Seixas E. und Langhorne J.** [2001]: Rodent malaras: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite: *Med. Microbiol. Immunol.*; **189**: 115-126
- Lucius und Loos-Frank** [1997]: Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner: *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin*
- McGilvray I.D., Serghides L., Kapus A., Rotstein O.D. und Kain K.C.** [2000]: Non-opsonic monocyte / macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance: *Blood*; **96**: 3231-3240
- Meding S.J. und Langhorne J.** [1991]: CD4<sup>+</sup> T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi*: *Eur. J. immunol.*; **21**: 1433-1438
- Mehlhorn H. und Piekarski G.** [1995]: Grundriß der Parasitenkunde: *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*
- Miller L.H., Aikawa M.A. und Dvorak J.A.** [1975]: Malaria (*Plasmodium knowlesi*) merozoites: immunity and the surface coat: *J. Immunol.*; **144**: 1237-1241
- Missinou M.A., Borrmann S., Schindler A., Issifou S., Adegnika A.A., Matsiegui P.B., Binder R., Lell B., Wiesner J., Baranek T., Jomaa H. und Kremsner P.G.** [2002]: Fosmidomycin for malaria: *Lancet*; **360 (9349)**: 1941-1942
- Moghimi S.M.** [1995]: Mechanisms of splenic clearance of blood cells and particles: towards development of new splenotropic agents: *Adv. Drug Deliv. Rev.*; **17**: 103-115

- Mohan K. und Stevenson M.M.** [1998]: Acquired Immunity to asexual Blood Stages: Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection: *ASM Press, Washington DC*: 467-493
- Moore K.W., O'Garra A., Waal Malefyt R. de; Vieira P. und Mosmann T.R.** [1993]: Interleukin-10: *Annu. Rev. Immunol.*; **11**: 165-190
- Morton J.I., Weyant D.A., Siegel B.V. und Golding B.** [1981]: Androgen sensitivity and autoimmune disease. I. Influence of sex and testosterone on the humoral immune response of autoimmune and non-autoimmune mouse strains to sheep erythrocytes: *Immunol.*; **44**: 661-669
- Mota M.M., Brown K.N., Holder A.A. und Jarra W.** [1998]: Acute *Plasmodium chabaudi chabaudi* Malaria Infection Induces Antibodies which Bind to the Surface of Parasitized Erythrocytes and Promote Their Phagocytosis by Macrophages *in Vitro*: *Infect. Immun.*; **66**: 1080-4086
- Neumann, F.** [1991]: Androgene und Antiandrogene; *PZ*: **16**: 959-969
- Nicholson D.W. und Thornberry N.A.** [1997]: Caspases: killer proteases. *Trend. Biochem. Sci.*; **22**: 299-306
- Nolte M.A., Arens R., Kraus M., van Oers M.H.J., Kraal G., van Lier R.A.W. und Mebius R.E.** [2004]: B Cells Are Crucial for Both Development and Maintenance of the Splenic Marginal Zone: *J. Immunol.*; **172**: 3620-3627
- Norman, A.W. und Litwack, G.** [1987]: Hormones; *Academic Press Inc.*: 486-508
- Ockenhouse C.F., Magowan C. und Churlay J.D.** [1989]: Activation of monocytes and platelets by monoclonal antibodies or malaria infected erythrocytes binding to the CD36 surface receptor *in vitro*: *J. Clin. Invest.*; **89**: 468-475
- Ockenhouse C.F., Ho M., Tandan N.N., Van Seventer G.A., Show S., White N.J., Jamieson G.A., Chulay J.D. und Webster H.K.** [1991]: Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1: *J. Infect. Dis.*; **164**: 163-169
- Oquenda P., Hundt E., Lowler J. und Seed B.** [1989]: CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes: *Cell*; **58**: 95-101

- Quinn T.C. und Wyler D.J.** [1979]: Intravascular clearance of parasitized erythrocytes in rodent malaria: *J. Clin. Invest.*; **63**: 1187-1194
- Reinboth, R.** [1980]: Vergleichende Endokrinologie; *Thieme-Verlag, Stuttgart*: 95-163
- Rifé S.U., Marquez M.G., Escalante A. und Velich T.** [1990]: The effect of testosterone on the immune response. I. Mechanism of action on antibody-forming cells: *Immunological Invest.*; **19**: 259-270
- Roberts C.W.M., Shutter J.R. und Korsmeyer S.J.** [1994]: *Hox11* controls the genesis of the spleen: *Nature*; **368**: 747-749
- Pagola S., Stephens P.W., Bohle D.S., Kosar A.D. und Madsen SK.** [2000]: The structure of malaria pigment beta-haematin: *Nature*; **404**: 307-310
- Pasloske B.L. und Howard R.J.** [1994]: Malaria, the red cell, and the endothelium: *Annu. Rev. Med.*; **45**: 283-295
- Pasparakis M., Kousteni S., Peschon J. und Kollias G.** [2000]: Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles: *Cell. Immunol.*; **201**: 33-41
- Phillips R.S.** [2001]: Current Status of Malaria and Potential for Control: *Clin. Microbiol. Rev.*; **14**: 208-226
- Piebarski M. und Hill A.V.S.** [2000]: The immunology of malaria infection: *Cur. Opin. Immunol.*; **12**: 437-441
- Playfair J.H.L., Taverne J., Bate C.A.W. und Desouza J.B.** [1990]: The Malaria Vaccine - Antiparasite or Antidisease: *Immunol. Today*; **11**: 25-27
- Podoba J.E. und Stevenson M.M.** [1991]: CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood stage *Plasmodium chabaudi* AS: *Infect. Immun.*; **59**: 51-58
- Robert Koch-Institut** [2003]: Epidemiologisches Bulletin Nr. 49

- Roberts D.D., Sherwood J.A., Spitalnik S.L., Panton L.J., Howard R.J., Dixit V.M., Frazier W.A., Miller L.H. und Ginsburg V.** [1985]: Thrombospondin binds *falciparum* parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence: *Nature*; **318**: 64-66
- Röllinghoff M., Bogdan C., Gessner A. und Lohoff M.** [2001]: Immunity to Protozoa: *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-7: [www.els.net](http://www.els.net)
- Rosenberg R., Wirtz R.A., Schneider I. und Burge R.** [1990]: An Estimation of the Number of Malaria Sporozoites Ejected by a Feeding Mosquito: *Trans. R. Soc. Tro. Med. Hyg.*; **84**: 209-212
- Sachs J.D.** [2002]: A New Global Effort to Control Malaria: *Science*; **298**: 122-124
- Salvesen G.S. und Dixit V.M.** [1997]: Caspases: intracellular signaling by proteolysis: *Cell*; **91**: 443-446
- Sanchez-Torres L., Rodriguez-Ropon A., Aguilar-Medina M. und Favila-Castillo** [2001]: Mouse splenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection: *Parasite Immunol.*; **23**: 617-626
- Sayles P.C. und Wassom D.L.** [1991]: *Plasmodium yoelii*: antibody response in resistance and susceptible mouse strains: *Exp. Parasitol.*; **73**: 241-248
- Schmidt E.E., McDonald I.C. und Groom A.C.** [1993]: Comparative aspects of splenic microcirculatory pathways in mammals: the region bordering the white pulp: *Scanning Microscopy*; **7**: 613-628
- Schmitt W.H., Fiebig S., Wunderlich F., Benten W.P., Bettenhäuser U., Boden K. und Mossmann H.** [1991]: Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: Variant protein expression in functionally changed splenic non-T-cells: *Mol. Cell. Endocrin.*; **76**: 207-214
- Schofield L., Novakovic S., Gerold P., Schwarz R.T., McConville M.J. und Tachado S.D.** [1996]: Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increase leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction: *J. Immunol.*; **156**: 1886-1896

- Schwarzer E., Turrini F., Ulliers D., Giribaldi G., Ginsburg H. und Arese P.** [1992]: Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malaria pigment: *J. Exp. Med.*; **177**: 1033-1041
- Seder R.A. und Paul W.E.** [1994]: Acquisition of lymphokine producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells: *Annu. Rev. Immunol.*; **12**: 635-673
- Shear H.L.** [1989]: The role of macrophages in resistance to malaria: Malaria: Host Responses to Infection: *CRC Press, Boca Taton, Fla. (Stevenson M.M. (ed.))*: 87-109
- Sherman I.W.** [2001a]: Plasmodium: *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-6: [www.els.net](http://www.els.net)
- Sherman I.W.** [2001b]: Malaria: *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-5: [www.els.net](http://www.els.net)
- Siano J.P., Grady K.K., Millet P. und Wick T.M.** [1998]: Short report: *Plasmodium falciparum*: cytoadherence to  $\alpha_v\beta_3$  on human microvascular endothelial cells: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; **59**: 77-79
- Smith L.P., Hunter K.W., Oldfield E.C. und Strickland G.T.** [1982]: Murine malaria: Blood clearance and organ sequestration of *Plasmodium yoelii*-infected erythrocytes: *Infect. Immun.*; **38**: 162-167
- Smith T.G., Ayi K., Serghides L., McAllister C.D. und Kain K.C.** [2002]: Innate immunity to malaria caused by *Plasmodium falciparum*: *Clin. Invest. Med.*; **25**: 262-272
- Stevenson M.M. und Kraal G.** [1989]: Histological changes in the spleen and liver of C57BL/6 and A/J mice during *Plasmodium chabaudi* AS infection: *Exp. Mol. Pathol.*; **51**: 80-95
- Stevenson M.M., Tam M.F. und Rae D.** [1990]: Appearance of crisis forms during *Plasmodium chabaudi* infection: dependence on cell mediated mechanisms: *Microb. Pathogenesis*; **9**: 303-314
- Stevenson M.M. und Tam M.F.** [1993]: Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice: *Clin. Exp. Immunol.*; **92**: 77-83
- Stimson W.H.** [1987]: Sex steroids, steroid receptors and immunity: Hormones and Immunity: *MTP Press (Berczi j. und Kovacs K. (eds.))*: 43-53

- Su Z., Fortin A., Gros P. und Stevenson M.M.** [2002]: Opsonin-Independent Phagocytosis: An Effektor Mechanism against Acute Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* AS Infection: *JID*; **186**:1321-1329
- Taylor-Robinson A.W., Phillips R.S., Severn A., Moncada S. und Liew F.Y.** [1993]: The role of T<sub>H1</sub> and T<sub>H2</sub> cells in a rodent malaria infection: *Science*; **260**: 1931-1934
- Taylor-Robinson A.W. und Phillips R.S.** [1994]: B Cells Are Required for the Switch from Th<sub>1</sub>- to Th<sub>2</sub>-Regulated Immune Responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* Infection: *Infect. Immun.*; **62**: 2490-2498
- Trubowitz S. und Masek B.** [1968]: *Plasmodium falciparum*: phagocytosis by polymorphnucleas leukocytes: *Science*; **162**: 273-275
- Turrini F., Ginsburg H., Bussolino F., Pesoarmona G.P., Serra M.V. und Arese P.** [1992]: Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and non-immune determinats and dependance on parasite development stage: *Blood*; **80**: 801-808
- Udheinya I.J., Schmitt J.A., Aikawa M.A., Miller L.H. und Green L.** [1981]: *Falciparum*-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells: *Science*; **213**: 555-557
- Van Parijs L.P. und Abbas A.K.** [1998]: Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning the lymphocytes off: *Science*; **280**: 243-248
- Von der Weid T., Honarva N. und Langhorne J.** [1996]: Gene-Targeted Mice Lacking B Cells are Unable to Eliminate a Blood Stage Malaria Infection: *J. Immunol.*; **156**: 2510-2516
- Weidanz W.P. und Long C.A.** [1988]: The role of T cells in immunity to malaria: *Prog. Allergy*; **41**: 215-252
- Weinstein Y. und Berkovich Z.** [1981]: Testosterone effect on bone marrow, thymus, and suppressor T cells in the (NZB × NZW)F<sub>1</sub> mice: its relevance to autoimmunity: *J. Immunol.*; **126**: 998-1002
- Weiss L., Geduldig U. und Weidanz W.** [1986]: Mechanisms of splenic control of murine malaria: reticular cell activation and the development of a blood-spleen barrier: *Am. J. Anat.*; **176**: 251-285

- Weiss L.** [1989]: Mechanisms of splenic control of murine malaria: cellular reactions of the spleen in lethal (strain 17XL) *Plasmodium yoelii* malaria in BALB/c mice, and the consequences of pre-infective splenectomy: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; **41**: 144-160
- Weiss L.** [1990]: The spleen in malaria: the role of barrier cells: *Immunol. Letters*; **25**: 165-172
- White W.I., Evans C.B. und Taylor D.W.** [1991]: Antimalarial antibodies of the immunoglobulin G2a isotype modulate parasitemias in mice infected with *Plasmodium yoelii*: *Infect. Immun.*; **59**: 3547-3554
- WHO** [2002]: Roll Back Malaria: Children and malaria: [www.rbm.who.int](http://www.rbm.who.int)
- WHO** [2004]: International Travel and Health (2004)
- Winograd E., Greenan J.R. und Sherman I.W.** [1987]: Expression of senescent antigen on erythrocytes infected with a knobby variant of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; **84**: 1931-1935
- Wunderlich F. und Schmitt H.-P.** [1988]: Malaria Vakzine: Erste Versuche am Menschen: *BIUZ*; **6**: 189-195
- Wunderlich F., Mossmann H., Helwig M. und Schillinger G.** [1988]: Resistance to *Plasmodium chabaudi* B10 Mice: Influence of the H-2 Complex and Testosterone: *Infect. Immun.*; **56**: 2400-2406
- Wunderlich F., Marinovski P., Benten W.P., Schmitt W.H. und Mossmann H.** [1991]: Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to *Plasmodium chabaudi* malaria: *Parasite Immunol.*; **14**: 307-320
- Wunderlich F., Benten W.P.M., Bettenhäuser U., Schmitt-Wrede H.-P. und Mossmann H.** [1992]: Testosterone-unresponsiveness of existing immunity against *Plasmodium chabaudi* malaria: *Parasite Immunol.*; **14**: 307-320
- Wright S.D.** [1985]: Cellular strategies in receptor-mediated phagocytosis: *Rev. Infect. Dis.*; **7**: 395-397
- Wyer D.J., Oster C.N. und Quinn T.C.** [1979]: The role of the spleen in malaria infections: Role of the spleen in the immunology of parasitic diseases: Tropical Disease Research Series No. 1: *Schwabe & Co., Basel; Switzerland*: 183-204

- Wyler D.J., Quinn T.C. und Chen L.T.** [1981]: Relationship of the alterations in splenic clearance function and microcirculation to host defense in acute rodent malaria: *J. Clin. Invest.*; **67**: 1400-1404
- Yap G.S. und Stevenson M.M.** [1994]: Differential Requirements for an intact Spleen in Induction and Expression of B-Cell-Dependent Immunity to *Plasmodium chabaudi* AS: *Infect. Immun.*; **62**: 4219-4225
- Yap G.S., Jacobs P. und Stevenson M.M.** [1994]: Th cell regulation of host resistance to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS: *Res. Immunol.*; **145**: 419-422
- Yadava A., Kumar S., Dvorak J.A., Milon G. und Miller L.H.** [1996]: Trafficking of *Plasmodium chabaudi adami*-infected erythrocytes within the mouse spleen: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **93**: 4595-4599
- Zhang J., Krugliak M. und Ginsburg H.** [1999]: The fate of ferriprotophyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs: *Mol. Biochem. Parasitol.*; **99**: 129-141
- Zhang Z.-H., Chen L., Saito S., Kanagawa O. und Sendo F.** [2000]: Possible Modulation by Male Sex Hormone of Th1 / Th2 Function in Protection against *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS Infection in Mice: *Exp. Parasitol.*; **96**: 121-129

## Abkürzungen

7-AAD	7 Amino-Actinomycin D
AK	Antikörper
AR	Androgenrezeptor
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
CSCS	Aktivkohlebehandeltes fötales Kälberserum
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (Fluorescence activated cell sorter)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GFP	Green fluorescent proteine
GPI	Glykosylphosphatidyl-Inositol
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium
INF	Interferon
i.p.	intraperitoneal
IR	infrarotes Licht
LT $\beta$ R	Lymphotoxin Beta Rezeptor
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
MMM	marginale metallophile Makrophagen
mRNA	Messenger-RNA
MZ	Marginalzone
MZM	Marginalzonenmakrophagen

---

NK	Natürliche Killerzelle (natural killer)
NOS2	NO-Synthase 2
PALS	“periarteriolar lymphoid sheath”
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PfEMP-1	<i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
<i>p.i.</i>	post Infektion
pRBZ	parasitierte Erythrozyten
RBZ	nicht-infizierte Erythrozyten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
TCR	T-Zellrezeptor
Te	Testosteron
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor Rezeptor I
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UV	ultraviolettes Licht
v	Volumen
w	Gewicht
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wunderlich, Abteilung für molekulare Parasitologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, danke ich für die Überlassung des interessanten Thema und für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Mehlhorn, Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Jürgen Krücken danke ich für seine gute Betreuung, sowie seine konstruktiven Vorschläge und Hilfestellungen. Ein herzliches Dankeschön auch für die sehr sorgfältige und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Für die angenehme Atmosphäre und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor danke ich allen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Parasitologie, insbesondere

Frau Andrea Grunwald für die Hilfe bei den Tierversuchen,

Herrn Predrag (Piet) Marinovski und Herrn Peter Benten für die nette Zeit am FACScan und am Konfokalen Lasermikroskop,

sowie Frau Nadine Tillmanns, Frau Stefanie Mühlfeld und der restlichen Besetzung aus dem „Kinderzimmer“ für die unterhaltsame Zeit in der Mensa.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, ohne deren Unterstützung das Studium gar nicht möglich gewesen wäre.



# Lebenslauf

## Persönliches:

Name: Liv Inga Mehnert  
Geburtsdatum: 12.06.1976  
Geburtsort: Mülheim an der Ruhr  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulische Ausbildung:

08.1982-07.1986 Grundschule an der Barbarastraße  
09.1989-06.1995 Gymnasium Heißen, Mülheim an der Ruhr  
Abschluß: Abitur

## Hochschulausbildung:

10.1995-09.2001 Hochschulstudium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Abschluss: Diplom Biologin  
07.2000-09.2001 Diplomarbeit in der Abteilung für molekulare Parasitologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf:  
Zur Isolation Testosteron-bindender Proteine  
seit 10.2001 Promotion in der Abteilung für molekulare Parasitologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf:  
Effekt von Testosteron auf die Anti-Malaria Effektorfunktion der Milz