

Aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Direktor: Professor Dr. Bernhard Fleischer

Induktion und Funktion von CTLA-4, einem negativen Regulator
der T-Zellfunktion, in einem Mausmodell der Malaria

Promotion

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin,
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Tanja Plate
aus Hamburg

2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 19.02.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. B. Fleischer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. A. Lohse

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Haag

Für meine Eltern
Danke, Ihr seid einmalig!

Ob eine Sache gelingt, erfährst Du nicht, wenn Du nur darüber nachdenkst,
sondern wenn Du es ausprobierst.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Malaria	4
1.2.1 Humanpathogene Erreger der Malaria	5
1.2.2 Lebenszyklus der Plasmodien	6
1.2.3 Pathogenese und Immunologie von <i>P. falciparum</i> -Infektionen	7
1.2.4 Zerebrale Malaria	9
1.2.5 Mausmodell der Malaria	10
1.2.6 <i>Plasmodium berghei</i> -Infektion und die Induktion von CTLA-4	10
1.3 Die Histologie der gesunden Leber	11
1.4 Das Phänomen der peripheren Toleranz einer <i>Plasmodium berghei</i> -Infektion	14
1.5 Die Immunbiologie der Leber und die Rolle der Leber als immuntolerantes Organ	16
1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit	20
 2 Material & Methoden	 21
2.1 Herkunft häufig verwendeter Materialien und Reagenzien	21
2.1.1 Lebende Organismen	21
2.1.2 Antikörper	21
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.4 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	24
2.1.5 Laborgeräte und Hilfsmittel	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 Arbeiten mit <i>Plasmodium berghei</i>	28
2.2.1.1 Infektion von Mäusen mit <i>Plasmodium berghei</i>	28
2.2.1.2 <i>In vivo</i> -Blockade von CTLA-4	28
2.2.1.3 Bestimmung der Parasitämie	28
2.2.2 (Maus-) und Zellpräparation	29
2.2.2.1 Gewinnung einzelner Organe aus der Maus	29

2.2.2.2 Gewinnung von Milzzellsuspensionen	29
2.2.2.3 Zellzählung	29
2.2.2.4 T-Lymphozyten Isolation aus der Leber	30
2.2.2.5 Messung der Zellproliferation (Proliferationstest)	30
2.2.3 Gewebe und deren Aufbereitung	31
2.2.3.1 Aufbereitung der Organpräparate	31
2.2.3.2 Kryostatschnitte	32
2.2.3.3 Beschichtung der Objektträger	32
2.2.3.4 Paraffinschnitte	32
2.2.3.5 Hämatoxilin-Eosin-Färbung	32
2.2.4 Immunhistochemie	33
2.2.4.1 Indirekte immunhistologische Doppelfärbung	33
2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung von Einzellsuspensionen	34
2.2.5.1 Cytospin (Immunfärbung von Cytozentrifugationen)	34
2.2.5.2 Durchflusszytometrie (FACS)	35
2.2.6 Enzym-gekoppelter-Immunsorbent-Assay (ELISA)	36
2.2.7 Enzymbestimmung GOT/GPT aus Mausserum	37
2.2.8 Auswertung und Dokumentation	38
2.2.8.1 Auswertung der immunhistologischen Präparate	38
2.2.8.2 Fotografische Dokumentation	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Eine CTLA-4-Blockade führt zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes, mit schweren histologischen Veränderungen, während einer <i>Plasmodium berghei</i> -Infektion.	39
3.1.1 Messung der Leberenzyme von <i>Plasmodium berghei</i> -infizierten C57Bl/6-Mäusen	40
3.1.2 Analyse des Körpergewichts <i>Plasmodium berghei</i> -infizierter Mäuse	41
3.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD4 ⁺ -T-Zellen in der Leber <i>Plasmodium berghei</i> -infizierter Mäuse	42
3.2.1 Analyse von α : β - und γ : σ T-Zellen in der Leber	43
3.2.2 Nachweis der CTLA-4-Expression auf CD4 ⁺ -T-Zellen in der Leber	44
3.3 Einfluss der Zytokine auf die Pathologie in der Leber	47

3.3.1 Nachweis von CD4 ⁺ -T-Zellen im Lebergewebe verschiedener Zytokin-defizienter Mäuse	48
3.4 Isolation von Lymphozyten aus der Leber während einer <i>Plasmodium berghei</i> -Infektion und CTLA-4-Blockade	49
3.4.1 Nachweis der Zytokinproduktion von Lymphozyten aus der Leber unter <i>Plasmodium berghei</i> -Infektion und CTLA-4-Blockade	49
3.4.2 Nachweis der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten aus Leber und Milz unter <i>Plasmodium berghei</i> -Infektion und CTLA-4-Blockade	50
4 Diskussion	53
4.1 Eine CTLA-4 Blockade verstärkt die Leberpathologie während einer <i>Plasmodium berghei</i> -Infektion	53
4.2 Welche Zellen des Immunsystems lassen sich bei einer <i>Plasmodium berghei</i> -Infektion in der Leber detektieren?	55
4.3 Einfluß der Zytokine auf die Pathologie in der Leber	57
4.4 Die Immunbiologie und die periphere Toleranz der Leber	60
4.5 Das Phänomen der peripheren Toleranz. Ein Ausblick in die Zukunft	64
5 Zusammenfassung	65
6 Literaturverzeichnis	66
7 Lebenslauf / Veröffentlichung	79
8 Danksagung	81
9 Erklärung	82

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Gefüge von Effektor- und Regulationsmechanismen. Es hat die Aufgabe, den Organismus vor pathogenen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu schützen sowie maligne körpereigene Zellen zu entfernen, ohne dabei körpereigenes gesundes Gewebe zu schädigen. Eine zentrale Fähigkeit des Immunsystems ist es deshalb, zwischen körpereigenen Strukturen und fremden Antigenen beziehungsweise zwischen „gefährlich“ und „ungefährlich“ zu unterscheiden.

Die Abwehr des Immunsystems basiert dabei auf zwei Säulen: der unspezifischen, gebildet durch das mononukleäre phagozytäre System, polymorphkernigen Granulozyten, Lysozym, NK-Zellen und dem Komplementsystem, und der spezifischen Abwehr, gebildet durch B- und T-Zellen. Diese reagieren im Gegensatz zu Makrophagen und NK-Zellen in einer antigenspezifischen Weise. B-Zellen binden direkt mit ihrem membranständigen B-Zellrezeptor lösliches Antigen und werden so aktiviert. Sie differenzieren sich weiter zu Plasmazellen und produzieren antigenspezifische Antikörper.

T-Zellen können nur durch antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert werden. Die APC nehmen das Antigen auf, prozessieren es und präsentieren es gebunden an transmembranäre Glycoproteine des Major Histocompatibility Complex (MHC). Dieser Komplex aus MHC und Peptid interagiert mit dem für ihn spezifischen T-Zellrezeptor. Dadurch wird die antigenspezifische Aktivierung der T-Zelle erreicht. Diese Vorgänge finden hauptsächlich in den peripheren lymphatischen Organen statt, zum Beispiel in den Lymphknoten.

Die T-Zellen teilt man ihrer Funktion nach in verschiedene Subpopulationen ein. Die Zytotoxischen T-Zellen sind für die Lyse von virusinfizierten Zellen und transformierten Zellen zuständig und tragen als Merkmal das CD8-Membranprotein (CD = Cluster of Differentiation) auf ihrer Oberfläche. Ihr T-Zellrezeptor ist MHC-Klasse-I-restringiert, das heißt, er bindet an Peptide, die an MHC-I-Moleküle gebunden sind.

Die T-Helferzellen tragen das CD4-Protein auf ihrer Oberfläche und sezernieren nach ihrer Aktivierung Zytokine mit unterschiedlicher Wirkung. Zuerst bei der Maus und später auch beim Menschen wurden verschiedene Subpopulationen dieser T-Zellen entdeckt: die T_H1 -

Zellen, die hauptsächlich Interferon- γ , TNF- α - und GM-CSF produzieren und dadurch Makrophagen aktivieren, und die T_H2-Zellen, die vor allem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und CD40L (CD154) produzieren und dadurch B-Zellen stimulieren (Seder *et al.* 1994).

Der T-Zellrezeptor beider Subpopulationen ist MHC-Klasse-II-restringiert. T-Zellen werden auch noch durch ihren T-Zellrezeptor unterschieden. Die Hauptpopulationen der T-Zellen besitzt einen T-Zellrezeptor mit einer α -Kette und einer β -Kette (α : β -TCR).

Eine kleine Population der T-Zellen besitzt einen T-Zellrezeptor mit einer γ -Kette und einer δ -Kette (γ : δ -TCR), (Raulet 1989, Ashwell *et al.* 1990). Für diese Zellen konnte nachgewiesen werden, dass sie sich hauptsächlich im peripheren Blut befinden (Ho *et al.* 1990, Perera *et al.* 1994) und dort zu einer systemischen Zytokinfreisetzung beitragen können. Es gibt Untersuchungen, die für γ : δ -T-Zellen eine Rolle bei der frühen, nicht antigenspezifischen Immunantwort spielen (Hayday *et al.* 2000). Andere Befunde sehen dagegen die Funktion eher bei der antigenspezifischen zellvermittelten Immunantwort, wobei eine Aktivierung der γ : δ -T-Zellen erst über die von CD4-Zellen freigesetzten Zytokine erfolgen soll (van der Heyde *et al.* 1995). Der T-Zellrezeptor ist mit dem sogenannten CD3-Komplex assoziiert, der nach Aktivierung der T-Zelle über den TCR die Signale ins Zellinnere vermittelt. Man findet auf T-Zellen weitere akzessorische Moleküle, die bei der Aktivierung der T-Zelle eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören die schon erwähnten CD4, CD8-Moleküle, die mit dem MHC-Komplex der Klasse I bei CD8-positiven Zellen und mit dem MHC-Komplex der Klasse II bei CD4-positiven Zellen in Verbindung treten. Diese Moleküle sind sowohl in die Signaltransduktion als auch in die Stabilisierung der Bindung des TCR und des MHC-Komplexes involviert (Übersicht bei Janeway 1999).

Zusätzlich findet man auf ruhenden T-Zellen einen weiteren, sehr wichtigen Co-Rezeptor, das CD28. Er gehört, wie die Immunglobuline, der T-Zellrezeptor und die MHC-Komplexe, zur Immunglobulinsuperfamilie. Die Liganden für CD28 sind B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), welche auf Antigen-präsentierenden Zellen zu finden sind. Der zusätzliche Stimulus über den Co-Rezeptor CD28 induziert in der Zelle Proliferation und Zytokinproduktion (June *et al.* 1994). Der über CD28 vermittelte Co-Stimulus ist entscheidend für die Interleukin-2- (IL-2-)Produktion (Fraser *et al.* 1991) und für die klonale Expansion (Allison *et al.* 1995). Antigenerkennung durch den TCR ohne Engagement von CD28 führt bei T-Zellen zum Zustand der Anergie (Boussiotis *et al.* 1994).

Es gibt noch einen zweiten Rezeptor auf T-Zellen, der an B7.1 und B7.2 bindet: **das cytotoxic T lymphocyte associated molecule 4 (CTLA-4, CD152)**. Dieses Molekül wurde ursprünglich im Genom von CD8-positiven T-Zellen entdeckt (Brunet *et al.* 1987) und wurde später auch auf CD4-positiven T-Zellen nachgewiesen (Freeman *et al.* 1992). Im Gegensatz zu CD28 befindet sich CTLA-4 nur auf aktivierten Zellen. CTLA-4 gehört wie CD28 zur Immunglobulinsuperfamilie, auch der zytoplasmatische Teil der beiden Rezeptoren zeigt eine große Homologie (Harper *et al.* 1991). CTLA-4 bindet mit einer 20- bis 50fach höheren Affinität an seine Liganden als CD28 (Linsley *et al.* 1994).

Die Funktion von CTLA-4 ist noch nicht endgültig geklärt. Erste Versuche beschreiben eine Co-Stimulation von T-Zellen bei Inkubation mit anti-CTLA-4 Antikörpern, man sprach von einem Synergismus mit CD28 (Linsley *et al.* 1992). Spätere Arbeiten beschrieben andere Effekte, sowohl intakte Antikörper als auch Fab-Fragmente von anti-CTLA-4-Antikörpern verstärkten eine T-Zellproliferation; doch bei Inkubation mit Fc-Rezeptor-positiven Zellen kam es zur Inhibition (Walanus *et al.* 1994). Dies legte die Vermutung nahe, dass ein über CTLA-4 vermitteltes negatives Signal durch die CTLA-4 Antikörper blockiert wird. Gribben *et al.* (1995) zeigte, dass Antigen-induzierter Zelltod durch CTLA-4 vermittelt war.

Seit längerem ist bekannt, dass CTLA-4, mit negativ regulierenden Eigenschaften, zur Terminierung der T-Zellantwort beitragen kann. Zu vermuten ist, dass die Beendigung vorwiegend über eine Inhibition der IL-2-Sekretion, die abhängig vom Aktivierungszustand der Zelle zu einer Blockade des Zellzyklus oder zum programmierten Zelltod führen kann (Scheipers *et al.* 1998, Rafaei *et al.* 1998). Damit stellt CTLA-4 einen Gegenspieler zu CD28, einem positiv co-stimulierenden Molekül, dar und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Eine Expression von CTLA-4 erfolgt im Gegensatz zu CD28 erst nach einer Zellaktivierung und kann aufgrund der gleichen Liganden B7.1 und B7.2, aber mit einer höheren Aktivität, mit CD28 konkurrieren (Freeman *et al.* 1992; Linsley *et al.* 1994, Linsley *et al.* 1992, Krummel & Allison, 1995; Walanus *et al.* 1994). CTLA-4 soll die T-Zellaktivierung auch unabhängig von CD28 durch einen direkten Einfluss auf die vom TCR vermittelten Signale beeinflussen können (Lee *et al.* 1998). Weitere Aufschlüsse über die Bedeutung von CTLA-4 konnten durch vielfältige *ex vivo*- und *in vivo*-Versuche gewonnen werden. Ein direkter Nachweis der CTLA-4-Funktion konnte für CTLA-4-defiziente Mäuse erbracht werden, indem diese eine letal verlaufende Lymphoproliferation entwickelten (Waterhouse *et al.* 1995). Des Weiteren konnte in der Arbeit von (Sugita *et al.* 2003) gezeigt werden,

dass Irispigmentepithel des Auges CD86 (B7-2) exprimiert und über die Bindung an CTLA-4 eine T-Zellsuppression bewirkt. Diese T-Zellsuppression konnte folglich nicht in CTLA-4 Knock-out Mäusen, CD86 Knock-out Mäusen oder nach einer zusätzlichen Gabe von anti-CD86 nachgewiesen werden. Eine weitere wichtige Aufgabe von CTLA-4 soll die Vermittlung von Anergie sein, welcher eine bedeutende Funktion bei der Induktion und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz zukommt (Karandikar *et al.* 1996, Rafaei *et al.* 1998; Walanus *et al.* 1998). Dafür sprechen auch die Befunde, dass die Gabe von anti-CTLA-4 zu einer erhöhten Immunogenität von Proteinantigenen führen kann (Chambers *et al.* 1996). Mittels löslicher anti-CTLA-4-Antikörper konnte gezeigt werden, dass diese durch die Blockade von CTLA-4 eine T-Zellantwort fördern können. Im Gegensatz dazu konnte für immobilisierte und kreuzvernetzte Antikörper ein inhibitorischer Effekt auf die T-Zellaktivierung demonstriert werden. Durch eine *in vivo*-Blockade von CTLA-4 konnte für experimentelle Autoimmunkrankheiten demonstriert werden, welche Auswirkungen eine erhöhte T-Zellproliferation auf den Erkrankungsverlauf nimmt. So konnte zum Beispiel für den autoimmunbedingten Diabetes eine Exazerbation der Erkrankung nachgewiesen werden (Luhder *et al.* 1998).

Im Gegensatz dazu kann eine gesteigerte T-Zellproliferation auf Tumorantigene oder infektiöse Pathogene protektive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf nehmen. Für Tumoren, wie das Kolonkarzinom, konnte mittels *in vivo*-Gabe von anti-CTLA-4, im Mausmodell, eine erhöhte antigenspezifische T-Zellantwort mit einer Tumorremission erreicht werden (Leach *et al.* 1996).

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass CTLA-4 ein negativer Regulator der T-Zellfunktion ist und unter anderem auf T-Zellen während humaner Malaria (Schlotmann *et al.* 2000) sowie während *Plasmodium berghei*-induzierter Malaria exprimiert wird (Jacobs *et al.* 2002).

1.2 Malaria

Die Malaria ist eine durch Plasmodien (Protozoen) verursachte tropische Infektionskrankheit. Die natürliche Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt über die weibliche Stechmücke der Gattung *Anopheles*. Die geographische Verbreitung korreliert mit der Verbreitung von als Überträger geeigneten *Anopheles*-Arten. Ein sehr hohes Malariarisiko besteht im tropischen Afrika, ein hohes bis mittleres Risiko in Südostasien und Teilen Mittel- und Südamerikas. Nach Schätzungen der WHO treten jährlich etwa 300

Millionen klinische Fälle auf, und etwa 1,5 Millionen Menschen versterben infolge der Erkrankung (WHO, 1999).

1.2.1 Humanpathogene Erreger der Malaria

Die Erreger der Malaria sind Protozoen der Gattung *Plasmodium*. Bekannt sind vier humanpathogene Plasmodienarten, die sich morphologisch sowie im Verlauf der Malaria-Erkrankung unterscheiden (Übersicht Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Hahn *et al.* 1999).

Plasmodium falciparum, der Erreger der Malaria tropica, ist aufgrund seiner Häufigkeit und Gefährlichkeit der bedeutendste Malariaparasit. Die Malaria tropica ist die einzige tödlich verlaufende Malariaform. *Plasmodium vivax* und *ovale* sind die Erreger der Malaria tertiana, *Plasmodium malariae* verursacht die Malaria quartana.

Die Inkubationszeit nach der Übertragung der infektiösen Sporozoiten beträgt 8 bis 15 Tage, im Anschluss daran kommt es zum sogenannten Malariaanfall, der von hohem Fieber begleitet wird. Dieser periodische Anfall ist bei allen Formen der Malaria das Hauptsymptom und steht im Zusammenhang mit der Freisetzung von Merozoiten aus parasitierten Erythrozyten. Er tritt bei der Malaria tertiana und bei der Malaria quartana alle 48 bzw. 72 Stunden auf, während bei der Malaria tropica die Fieberanfälle häufig asynchron sind. Ferner kommt es im Verlauf der Infektion zu Vergrößerungen von Leber und Milz. Die Infektionen mit *P. malariae*, *P. vivax* und *P. ovale* haben häufig keine weiteren besonderen pathologischen Merkmale. Eine *P. falciparum*-Infektion kann jedoch schnell zu einer schweren, lebensbedrohlichen Malaria fortschreiten. Die zerebrale Malaria ist dabei eine der schwerwiegendsten pathologischen Prozesse. Charakteristisch dafür sind ödematöse Strukturen im Bereich der Meningen und der Hirnrinde sowie extensive Verstopfungen der Kapillaren durch parasitierte Erythrozyten mit ringförmigen Blutungen rund um die verstopften Gefäße. Infolge der Veränderungen im Gehirn kann es zu Bewusstseinsstörungen und Schockzuständen bis hin zum Koma kommen. Eine schwere Anämie, durch indirekte Schädigung der Erythrozyten sowie durch eine gestörte Erythropoese, ist eine weitere häufige Komplikation bei *P. falciparum*-Infektionen. Andere häufige Komplikationen sind das akute Nierenversagen sowie das Auftreten von Lungenödem.

1.2.2 Lebenszyklus der Plasmodien

Der komplexe Lebenszyklus der humanpathogenen Plasmodien umfasst eine asexuelle Vermehrung (Schizogonie) im menschlichen Wirt sowie einen sexuellen Vermehrungsschritt (Sporogonie) in der weiblichen *Anopheles*-Mücke.

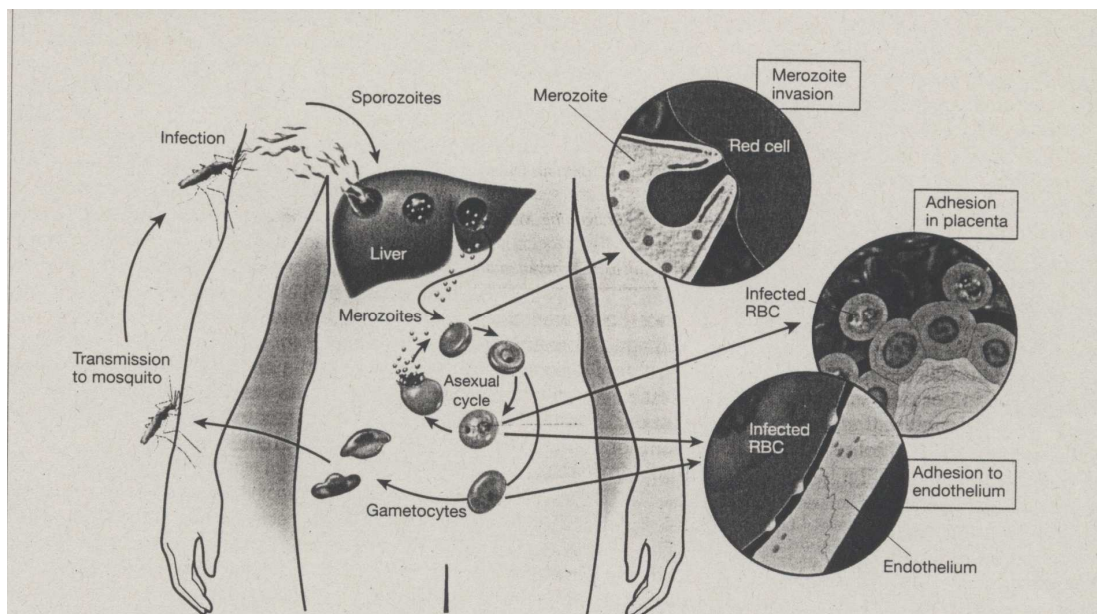


Abb. 1.1 Lebenszyklus der Plasmodien

In der *Anopheles*-Mücke vollzieht sich der sexuelle Zyklus (Sporogonie) der Plasmodien. Im Magen der Mücke kommt es zur Vereinigung der männlichen und weiblichen Gameten, welche sich zu Ookineten entwickeln, die die Magenzellen durchdringen und zu Oozysten ausreifen. Diese setzen Sporozoiten frei, die in die Speicheldrüsen gelangen und mit dem Speichel der Mücke bei einem Biss in das menschliche Blut übertragen werden.

Im Menschen vollzieht sich der asexuelle Zyklus der Plasmodien (Schizogonie). Die Sporozoiten dringen innerhalb kürzester Zeit in die Leberzellen ein und entwickeln sich zu Schizonten, die je bis zu 30.000 Merozoiten freisetzen. Diese befallen die Erythrozyten im peripheren Blut, welche sich anschließend an Endothelzellen oder in der Plazenta ablagern und so zur Pathogenese der zerebralen Malaria beitragen können. In den Erythrozyten bilden sich Ringformen aus, die sich zu Schizonten entwickeln und schließlich bis zu 30 neue Merozoiten freisetzen. Einige Merozoiten entwickeln sich zu weiblichen oder männlichen Gametocyten, die bei einem erneuten Biss wieder in den Magen der Mücke gelangen. (Abb. Miller *et al.*, 2002, *Nature*)

Die Infektion erfolgt durch den Stich einer mit Plasmodien infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke. Dabei kann es zu einer Inokulation von 8–15 bis zu maximal 100 asexuellen Sporozoiten in das subkutane Gewebe oder seltener in die Blutbahn kommen. Während des präerythrozytären Stadiums (intrahepatisches Stadium) erreichen die beweglichen Sporozoiten innerhalb der ersten 30 Minuten die Leberparenchymzellen (Übersicht Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Hahn *et al.* 1999). Dort werden erst mehrere Hepatozyten durchquert, ehe es zur weiteren Entwicklung des Parasiten in

einem Hepatozyten kommt (Mota *et al.* 2001). In einer Leberzelle entstehen aus einem einzelnen Sporozoit, durch asexuelle Teilungen, bis zu 30.000 Merozoiten, die dann durch Ruptur der Zelle nach 2–10 Tagen in die Blutbahn freigesetzt werden (Good *et al.* 1999). Diese gelangen in das periphere Blut und infizieren dort die Erythrozyten. Nach dem Befall der Erythrozyten entwickeln sich die Merozoiten zu Ringformen, die zu amöboiden Trophozoiten heranwachsen und schließlich zu erythrozytären Schizonten ausreifen. Diese setzen 10–30 Merozoiten frei, die erneut Erythrozyten befallen. Eine geringe Zahl der Merozoiten entwickelt sich zu Geschlechtsformen, den männlichen und weiblichen Gametozyten. Die Vereinigung der männlichen und weiblichen Gametozyten findet im Magen der Mücke statt. Nach der Befruchtung entwickeln sich die Gameten zu Zygoten und schließlich zu den beweglichen Ookineten, die nach Durchdringung der Magenwände zu Oozysten werden. Diese setzen Sporozoiten frei, die in die Speicheldrüse der Mücken gelangen und bei einem Stich einen neuen Wirt infizieren.

1.2.3 Pathogenese und Immunologie von *P. falciparum*-Infektionen

Im Gegensatz zu den meisten Bakterien- und Viren-Infektionen entwickelt der Mensch gegen eukaryotische Pathogene wie Protozoen und Helminthen häufig nur eine ungenügende und zeitlich begrenzte Immunität. Eine Erstinfektion mit *P. falciparum* kann nur schwer vom menschlichen Immunsystem kontrolliert werden. Die Ursachen dafür liegen vor allem in der komplexen genetischen Struktur des Parasiten, durch die eine Bekämpfung des Erregers erschwert wird (Lang, W. 1996).

Pathogenese: Das symptomatische Stadium der Malaria-Infektion beginnt erst mit der erythrozytären Phase. Die Symptomatik einer Malaria variiert zwischen den einzelnen Plasmodienarten und ist unter anderem abhängig vom Zustand des Immunsystems des Wirtes, dem Alter und genetischer Faktoren. Die Symptome scheinen dabei zum einen direkt durch den Befall und Zerstörung der Erythrozyten ausgelöst zu werden, zum anderen aber auch eine Folge der Immunantwort des Wirtes auf den Parasiten darzustellen. Etwa zwölf Tage nach der Infektion setzen erste Beschwerden wie Kopfschmerzen, Müdigkeit und Fieber ein. Der nicht therapierte Krankheitsverlauf wird durch eine Reihe typischer physiologischer Veränderungen begleitet. So kommt es zu schweren Anämien durch die Ruptur von Schizonten-infizierter Erythrozyten als auch durch die Wirkung der Erythropoese und der Wirkung autohämolytischer Antikörper (Miller *et al.* 2002).

Die Sequestrierung von infizierten Erythrozyten in kleinen Blutgefäßen sowie die reduzierte Deformierbarkeit der Zellen behindern die Blutzirkulation und tragen dazu bei, dass parasitierte Erythrozyten nicht in der Milz eliminiert werden. Durch den Abbau infizierter Blutzellen ist die Milz der Patienten stark vergrößert und dunkel gefärbt. Die behinderte Blutzirkulation führt letztendlich zu einer verringerten Durchblutung des Gehirns, was zu schweren Komplikationen einer zerebralen Malaria beiträgt. Eine untherapierte, akute *P. falciparum*-Malaria verläuft aufgrund schwerer Organschädigungen meist letal, da das Immunsystem den Parasiten in der Regel nicht ausreichend bekämpfen kann.

Immunologie: Bei der oben beschriebenen Zerstörung der parasitierten Erythrozyten werden sogenannte Malaria-Toxine und Antigene freigesetzt, die eine vermehrte endogene Synthese von proinflammatorischen Zytokinen in pathologischen Mengen hervorrufen. Geringe Mengen von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren haben dabei einen protektiven, d. h. antiparasitären Effekt, während die Überproduktion dieser Zytokine ursächlich an der Pathologie der Malaria-Infektion beteiligt ist. So führen zu hohe Konzentrationen an TNF- α , IFN- γ , IL-2 und IL-6 zu Fieber, komatösen Bewusstseinsstörungen, einer abnormen Erythropoese sowie einer erhöhten Zytoadhärenz (Riley *et al.* 1999; Lang *et al.* 2000). Bei dem Malaria-Toxin handelt es sich um ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI). Es wurde gezeigt, dass GPI von *P. falciparum* in Makrophagen die Produktion an TNF- α und anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 sowie die Synthese der iNOS stimulieren kann (Schofield *et al.* 1993). Dabei beruht der Effekt des GPI auf der Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie und der Protein-Kinase C- ϵ , die Transkriptionsfaktoren der c-rel Familie und NF- κ B aktivieren. Diese induzieren die Expression von TNF- α , IL-1, iNOS, aber auch von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 (Tachado *et al.* 1997).

In niedrigen Konzentrationen konnte für TNF- α sogar eine verstärkende Wirkung auf die Parasiteneleminierung beobachtet werden (Riley *et al.* 1999), zu hohe Konzentrationen an TNF- α bewirken allerdings eine verstärkte Entwicklung der Pathologie. Andere Studien konnten zeigen, dass zusätzlich zu dem Malaria-Toxin IFN- γ als zweiter Stimulus notwendig ist, um Makrophagen zur TNF- α -Produktion anzuregen. Eine frühe Quelle für IFN- γ stellen NK-Zellen dar. Des Weiteren tragen auch aktivierte, Antigen-spezifische T-Zellen erheblich zur Pathologie der Malaria-Erkrankung bei, indem sie große Mengen an IFN- γ freisetzen und Makrophagen zur Produktion von TNF- α -Produktion stimulieren (Riley *et al.* 1999).

Ferner führt eine starke Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) zu hohen Konzentrationen an NO im Gewebe, welches unter anderem mit der Entstehung zerebraler Symptome und mit immunsuppressiven Effekten im Verlauf der Erkrankung in Verbindung gebracht wird (Rockett *et al.* 1994, Clark *et al.* 1992).

1.2.4 Zerebrale Malaria

Wie in der Einleitung unter 1.2.1 beschrieben, ist die zerebrale Malaria eine der schwerwiegendsten pathologischen Prozesse, die man häufig bei einer *Plasmodium falciparum*-Infektion im Endstadium findet. Charakteristisch sind ödematöse Strukturen im Bereich der Meningen und der Hirnrinde sowie extensive Verstopfungen der Kapillaren durch parasitierte Erythrozyten mit ringförmigen Blutungen rund um die verstopften Gefäße. Infolge der Veränderungen im Gehirn kann es zu Bewusstseinsstörungen und Schockzuständen bis hin zum Koma kommen.

Die *Plasmodium berghei*-Infektion zeigt als schwere letale Komplikation eine zerebrale Manifestation, die eine große Ähnlichkeit zur humanen zerebralen Malaria aufweist (Hearn *et al.* 2000). Dabei sollen aktivierte CD4-positive Zellen an der Vermittlung der Pathogenese beteiligt sein (Yanez *et al.* 1996; Hirunpetcharat *et al.* 1999; Riley *et al.* 1999). Mäuse im *Plasmodium berghei*-Modell, die mit anti-CD4 behandelt wurden, entwickelten keine zerebrale Malaria (Jacobs *et al.* 2002). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass dem Effektorzytokin INF- γ eine entscheidende Rolle für die Pathologie zukommt (Rudin *et al.* 1997, Riley *et al.* 1999). In der Arbeit von (Grau *et al.* 1989) konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass monoklonale Antikörper gegen INF- γ die Ausbildung einer zerebralen Malaria verhindern können. Eine große Rolle bei der Vermittlung der Pathologie wird im Rahmen einer *Plasmodium berghei*-Infektion auch für $\gamma\delta$ -T-Zellen diskutiert, die ebenfalls Produzenten von IFN- γ sind. In *in vitro*-Kulturen von peripherem Blut konnten diese Zellen mit als Hauptproduzenten von IFN- γ identifiziert werden. Für $\gamma\delta$ -T-Zellen wird vermutet, dass sie schon zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion, vor Ausbildung einer antigenspezifischen Immunantwort, an der Begrenzung der Parasitämie beteiligt sind (Troye-Blomberg *et al.* 1989) Es konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen durch lebende Parasiten primär aktiviert werden können und ihre weitere Aktivierung von der Sekretion von IL-2 durch CD4-positive Zellen abhängt. Daher scheinen die Zellen auch eine Rolle bei der zellvermittelten Immunität auszuüben und könnten über die Sekretion von Zytokinen zur Regulation der Immunantwort beitragen. In

der Arbeit von (Yanez *et al.* 1999) konnte gezeigt werden, dass den Zellen durch die frühe Beteiligung während einer Infektion eher eine Aufgabe bei der Stimulation anderer Zellen zukommt, als dass sie als Effektorzellen wirken und damit direkt an der Pathologie beteiligt sind.

Bei einer *Plasmodium berghei*-Malaria im zerebralen Stadium konnten $\gamma\delta$ -T-Zellen in Hirn und Milz nachgewiesen werden (Haque *et al.* 2001).

1.2.5 Mausmodell der Malaria

Um Untersuchungen hinsichtlich der Immunologie der Malaria-Infektion durchführen zu können, stehen verschiedene Plasmodien-Spezies zur Verfügung, die pathogen für Mäuse sind. Es handelt sich hierbei lediglich um Modellsysteme, die im Ausmaß und Krankheitsverlauf nicht einer Malaria-Infektion im Menschen entsprechen. Diese Modelle bieten dennoch eine gute Möglichkeit, um die Pathogenese oder die Immunantwort im Verlauf der Erkrankung zu untersuchen. (Übersicht bei Li *et al.* 2002).

Plasmodium berghei-Infektionen in Mäusen, die auch in dieser Arbeit durchgeführt wurden, dienen insbesondere als ein Modell zur Erforschung der zerebralen Malaria sowie der Erprobung von Impfstoffen.

1.2.6 *Plasmodium berghei*-Infektion und die Induktion von CTLA-4

Durch eine experimentelle Infektion mit *Plasmodium berghei*-infizierten Erythrozyten ließ sich eine Expression von CTLA-4 auf Milzzellen von C57BL/6-Mäusen induzieren (Jacobs *et al.* 2002). Es konnte durch eine Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden, dass CTLA-4-Moleküle sowohl an der Zelloberfläche als auch intrazellulär auftreten können. Dies stimmt auch mit der Arbeit von (Metz *et al.* 1998) überein, in welcher für Effektorzellen gezeigt werden konnte, dass CTLA-4 vom Zellinneren an die Oberfläche und zurück zirkuliert. Für die *Plasmodium berghei*-Infektion ließ sich nachweisen, dass sowohl die Anzahl an CTLA-4-exprimierenden Zellen als auch die Menge an CTLA-4 pro Einzelzelle zunimmt. Die CTLA-4-Expression wurde dabei fast ausschließlich auf CD4-positiven T-Zellen gefunden. Somit konnte gemäß bisheriger Befunde, welche CTLA-4 als sehr sensitiven Marker für die T-Zellaktivierung ausweisen, die Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen im Verlauf einer *Plasmodium berghei*-Infektion bestätigt werden.

Auch für die humane Malaria konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der Infektion zu einer Zunahme von CTLA-4 positiven Zellen kommt (Schlotmann *et al.* 2000). Auch hier wurde eine Expression fast ausschließlich auf CD4-positiven Zellen gefunden. In der Arbeit von (Schlotmann *et al.* 2000) konnte eine Korrelation zwischen der Höhe der CTLA-4-Expression, der Parasitämie und der Schwere der Erkrankung nachgewiesen werden. Die Korrelation zwischen Parasitämie und Höhe der CTLA-4-Expression lässt vermuten, dass eine Freisetzung von Plasmodien-Antigen eine T-Zellaktivierung bewirkt und damit zu einer Expression von CTLA-4 beitragen kann.

Wie bereits unter 4.1 angesprochen, wird CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen exprimiert und konkurriert mit CD28 um die B7-Liganden, zu denen es eine 20- bis 50fach höhere Affinität als CD28 besitzt (Linsley *et al.* 1994). Durch Endotoxine, wie Lipopolysaccharide (LPS), kann es zur Aktivierung von APC mit vermehrter Expression von B7 kommen und damit zum Überwiegen einer CD28-B7-Interaktion (Liu *et al.* 1991; Khoruts *et al.* 1998). Durch die Zunahme der CD28-B7-Ligation, mit der Vermittlung positiver Signale, kommt es zur gesteigerten T-Zellproliferation. Die durch die T-Zellaktivierung induzierte CTLA-4-Expression könnte dann im Verlauf durch eine vermehrte negative Co-Stimulation über die CTLA-4-B7-Ligation zur Terminierung der T-Zellantwort beitragen (Oosterwegel *et al.* 1999).

1.3 Die Histologie der gesunden Leber

Wie bei (Junqueira *et al.* 2002) beschrieben, ist die Leber ein zentrales Stoffwechselorgan, in dem die im Verdauungstrakt resorbierten Nahrungsstoffe umgesetzt, zum Teil gespeichert und über die Blutbahn für andere Organe bereitgestellt werden. Die Leber ist mit einem Gewicht von 1,5 kg die größte Drüse des Menschen und befindet sich im Oberbauch unter dem Zwerchfell. 70–80 % des der Leber zugeführten Blutes kommen aus der Pfortader (Vena portae, nährstoffreiches, O₂-armes Blut), der Rest aus der Leberarterie (Arteria hepatica propria, nährstoffarmes, O₂-reiches Blut). Alle im Darm resorbierten Stoffe erreichen die Leber durch die Pfortader mit Ausnahme der Chylomikronen, die hauptsächlich über Lymphgefäße und den Ductus thoracicus in die V. subclavia und damit in den systemischen Kreislauf gelangen. Chylomikronen enthalten hauptsächlich resorbierte Triazylglyzerine der Nahrung. Das von der Leber abfließende Blut gelangt über die Lebervenen in die Vena cava inferior. Die Leber befindet sich somit in einer zentralen

Position für die Aufnahme, den Metabolismus und die Anhäufung von Stoffwechselprodukten sowie deren Verteilung über die Blutbahn. Die exokrine Ausscheidung von Stoffen aus der Leber findet über die Galle statt, ein Vorgang der auch für die Verdauung der Lipide von großer Bedeutung ist. Die Leber ist von einer dünnen bindegewebigen Kapsel (Glisson-Kapsel) umgeben, die im Bereich der Leberpforte (Porta hepatis) verstärkt ist. Hier treten Pfortader, Leberarterie und Nerven ein sowie Gallenwege und Lymphgefäße aus. Die sich in der Leber verzweigenden Gefäße und Gänge sind von Bindegewebe umgeben. Sie reichen bis an die Leberläppchen.

Leberläppchen: Das Leberläppchen besitzt einen Durchmesser von etwa 1 mm. Im Leberläppchen sind die Hepatozyten in Form von radialen, sich verzweigenden Platten angeordnet (siehe Abbildung 1.2). Wo drei oder mehrere Leberläppchen zusammenstoßen, befinden sich die Periportalfelder, die auch Glisson-Trias genannt werden. Sie enthalten neben Lymphgefäßen und Nervenfasern eine Venole, eine Arteriole und einen Gallengang. Die Venole hat normalerweise den größten Durchmesser dieser Strukturen. Der Gallengang, von kubischen Epitheln ausgekleidet, nimmt Gallenflüssigkeit der Parenchymalzellen auf und führt sie im Ductus choledochus dem Duodenum zu. Zwischen den Hepatozyten der Läppchen finden sich die sogenannten Sinusoide, die in der Peripherie von zwei verschiedenen Gefäßen gespeist werden, den Venolen, die aus Verzweigungen der Pfortader und den Arteriolen, die aus der Leberarterie hervorgehen. Sie laufen auf das Läppchenzentrum zu und münden dort in die Vena centralis ein. Bei den Sinusoiden handelt es sich um weite Kapillaren (Durchmesser 10–30 μm) vom diskontinuierlichen Typ mit gefensterten Endothelzellen. Die Fenster (Durchmesser etwas 100 nm) bilden charakteristische Gruppen und erscheinen im Elektronenmikroskop wie ein Sieb. Unter dem Endothel befindet sich der Disse-Raum, in den die Mikrovilli der Hepatozyten hineinragen. Blutplasma kann aus den Sinusoiden durch die Endothelfenster in den Disse-Raum gelangen und so mit der Oberfläche der Hepatozyten in Kontakt treten (siehe Abb. 1.2)

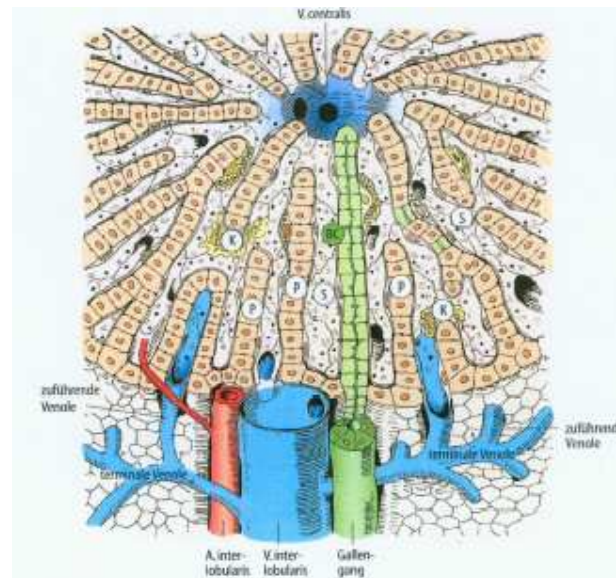


Abb. 1.2 Dreidimensionale Darstellung eines Leberläppchens

Die Abbildung zeigt eine Dreidimensionale Darstellung eines Leberläppchens mit der V. centralis im Zentrum und einem periportalen Zentrum und einem periportalen Feld (in der unteren Bildmitte), zwischen denen die Sinusoide (S) und die Leberzellplatten (P) verlaufen. Auch die Kupferzellen (K) sind zu erkennen. Die grün dargestellten Leberzellen stellen schematisch den Kontakt der Hepatozyten mit den Gallenkapillaren (BC) dar, die in den Gallengang münden. (Nach Junqueira *et al.* 1996)

Makromoleküle wie Lipoproteine, Albumin oder Fibrinogen werden über den Disse-Raum von der Leberzelle in das Blut abgegeben. Andere Stoffe wie Glukose werden je nach Stoffwechselsituation entweder von den Hepatozyten aufgenommen oder freigesetzt. Den Endothelzellen der Sinusoide sitzen auf der luminalen Seite stellenweise Makrophagen – die Kupffer-Zellen – auf, die u. a. am Abbau von gealterten Blutzellen beteiligt sind. Im Disse-Raum finden sich auch einzelne spezielle Zellen, die bei Speicherung und dem Stoffwechsel von Vitamin A eine Rolle spielen, sogenannte Vitamin-A-Speicherzellen.

In der Peripherie der Leberläppchen wird am Beginn der Sinusoide arterielles Blut mit Blut aus der Vena portae gemischt. Dadurch enthalten die Hepatozyten Sauerstoff und Nahrungsstoffe. Im Zentrum der Leberläppchen wird das in seiner Zusammensetzung veränderte Blut in den Zentralvenen gesammelt und über Läppchenvenen und die Vena hepaticae in die Vena cava inferior transportiert. Dieser Blutfluss durch das Leberläppchen hat zur Folge, dass Sauerstoff und im Gastrointestinaltrakt resorbierte Substanzen zuerst mit den peripheren Zellen in Kontakt kommen und dann mit den Hepatozyten im Zentrum des Leberläppchens. Dadurch können die peripheren Hepatozyten mit dem vorhandenen Sauerstoff Fettsäuren und Glukose oxidativ abbauen. Die Hepatozyten im Läppchenzentrum führen dagegen bevorzugt anaerobe Glycolyse durch. Die oben beschriebenen klassischen Leberläppchen teilen die Leber in Gebiete ein, die einen gemeinsamen Blutfluss über die Zentralvene haben. Eine andere Sicht fasst Gebiete

zusammen, die einen gemeinsamen Gallenabfluss besitzen. Das so definierte Portalläppchen reicht bis zu den Zentralvenen. Betrachtet man die Versorgungsgebiete der Venolen und Arteriolen als Grundeinheit der Leber, dann ist so der Leberazinus definiert. In diesem kann man Zonen unterscheiden, die zuerst mit sauerstoff- und nährstoffreichem Blut versorgt werden (Zone I). In der Zone III erhalten die Hepatozyten Blut, welches bereits in den Zonen I und II verändert wurde.

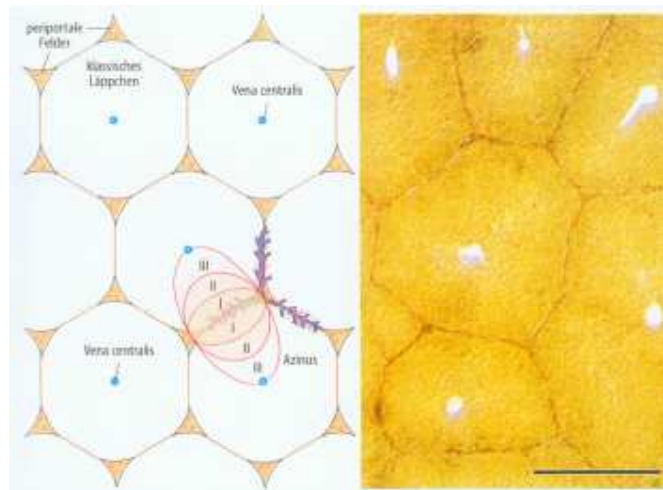


Abb. 1.3 Aufbau des klassischen Leberläppchens und der Leberazini.

Das klassische Läppchen hat eine V. centralis im Mittelpunkt und wird von Linien begrenzt, die die periportal Felder verbinden (*ausgezogene Linien*). Rechts ein Schnitt durch eine Schweineleber, der den Aufbau der Leber aus Läppchen besonders gut deutlich macht, weil hier die Läppchen mit etwas mehr Bindegewebe wie beim Menschen abgegrenzt sind. Zu einem Leberazinus gehört das Gebiet, das von einem terminalen Gefäßbündel versorgt wird. Das Lebergewebe in der Umgebung einer terminalen Gefäßachse gliedert sich in die Zonen I, II und III. Balken=1mm. (Aus Junqueira *et al.* 1996)

1.4. Das Phänomen der peripheren Toleranz bei einer *Plasmodium berghei*-Infektion

In der Arbeit von (Wick *et al.* 2002) konnte gezeigt werden, dass die Leber periphere Toleranz induziert, die T-Zell-Homöostasis reguliert und intrahepatische T-Zellantworten unterstützt. Die zweischneidige Rolle der Leber, zum einen als ein Organ, welches systemische oder lokale T-Zellantworten toleriert, als auch als ein Organ, welches verstärkt T-Zellen aktiviert und Gedächtniszellen bildet, macht diverse Forschungsgruppen neugierig. Ein Beispiel für die ausgeprägte Toleranz der Leber sind Infektionen durch das Hepatitis-B- oder C-Virus, in beiden Fällen kann sich eine chronische Variante der Erkrankung ausbilden. In verschiedenen Arbeiten konnte hierzu nachgewiesen werden (Lai *et al.* 2003; Poynard *et al.* 2003; Bertoletti *et al.* 2003), dass der Leberschaden nicht durch das Virus selbst hervorgerufen wird, sondern durch die darauf folgende Immunreaktion.

Dagegen existieren ebenfalls diverse Erkrankungen, ein Beispiel hierfür wäre die primär biliäre Zirrhose, wo die Leber scheinbar kaum periphere Toleranz ausbildet und folglich autoimmune Prozesse die Pathologie verstärken. Diese verschiedenen Wege der Immunregulation zu verstehen ist wichtig, um die klinische Relevanz dieses Organs als auch anderer Organe erfassen zu können. Kenntnisse über die Mikroanatomie und die Funktion der Immunbiologie der Leber sind daher unabdingbar (vgl. 1.3 und 1.4). Die Leber besteht aus parenchymatösen Zellen (Hepatozyten) und sogenannten „nicht“ parenchymatösen Zellen (NPC). Die NPC bestehen zu 40 % aus sinusoidal-endothelial-Zellen (SEC), 20 % Kupffer-Zellen (KC) und 20 % intrahepatischen Lymphozyten (IHL). Die intrahepatischen Lymphozyten wiederum lassen sich zu 25 % in NK-Zellen unterteilen, 65 % T-Zellen (90 % davon sind $\alpha:\beta$ -T-Zellen, 10 % $\gamma:\delta$ -T-Zellen), 5 % dendritische Zellen (DC), B-Zellen (<5 %) sowie sehr wenigen Sternzellen (<1 %). Das Verhältnis von CD4 zu CD8 Zellen der $\alpha:\beta$ -TCR-T-Zellen beträgt 1 : 3 in der Leber, im Blut beträgt das Verhältnis 2 : 1. Die CD4-Helferzellen werden unterteilt in T_H1 - und T_H2 -Untergruppen, abhängig von ihrer Produktion an Zytokinen. Die T_H1 -Helferzellen produzieren hauptsächlich IFN- γ , während die T_H2 -Helferzellen hauptsächlich IL-4 produzieren.

In der Arbeit von (Parker *et al.* 2005) wurde die Funktion der angeborenen und erworbenen Immunabwehr der Leber beschrieben. Aufgabe der angeborenen Immunabwehr ist unter anderem die Produktion an Akut-Phase-Proteine, die unspezifische Pino- und Phagozytose, die unspezifische Tötung von Antigenen sowie die Beseitigung von Fremdmaterial. Dagegen ist die Aufgabe der erworbenen Immunabwehr die Vernichtung von aktivierten T-Zellen, die Induktion von Toleranz für eingewanderte und gewebespezifische Antigene, die extrathymische Proliferation von T-Zellen und die Vernichtung von Fremdmaterial.

Nach Ermittlung der Immunbiologie der Leber und somit der Anwesenheit bestimmter Zellgruppen stellt sich nun die Frage, welche Zellart bzw. welche Pathways hauptsächlich für die Induktion der peripheren Toleranz in der Leber verantwortlich sind. Diese Frage wird im Diskussionsteil behandelt.

1.5. Die Immunbiologie der Leber und die Rolle der Leber als immuntolerantes Organ.

In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich während der Erythrozytenphase einer Malaria-Infektion eine Leberschädigung entwickeln kann, obwohl die Merozoiten (die Pathogene der erythrozytären Phase) nicht direkt die Zellen der Leber infizieren (Adachi *et al.* 2001). Phagozyten der Leber und der Milz sind eingebunden in die Aufnahme infizierter Erythrozyten und freier Merozoiten, welche nach Aufbruch der Erythrozyten frei werden (Singh *et al.* 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Immunzellen, T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen unter der *Plasmodium berghei*-Infektion stark ansteigt, während sich die Anzahl der Immunzellen in der Milz gleichzeitig verringert. Die stationären Makrophagen, die sogenannten Kupffer'schen Sternzellen der Lebersinusoiden, nehmen eine hohe Dosis des parasitären Antigens auf (Dockrell *et al.* 1980; Nobes *et al.* 2002).

2001 konnte nachgewiesen werden, dass Moleküle, die aus den Merozoiten frei werden, das Immunsystem über den Toll-like-rezeptor (TLR)-myeloid-differentiation factor 88 (MyD88) pathway aktivieren, und diese dann IL-12 produzieren. Dieses Zytokin scheint involviert zu sein an der Leberschädigung von Mäusen, die durch *Plasmodium berghei* infiziert waren (Adachi *et al.* 2001).

Die Bedeutung der Leber als ein Organ, welches periphere Toleranz induziert, rückt immer mehr in den Vordergrund aktueller Forschung. So werden regelmäßig Antigene aus dem Intestinaltrakt (z. B. Bakterien oder Nahrungsantigene) über die Pfortader durch die Leber geschleust, welche dann den zirkulierenden T-Zell-Pool aktivieren. Dennoch sind inflammatorische Antworten eher gering (Crispe, 2003). In der Geschichte der Transplantation fiel schon früh auf, dass die Leber ein Organ ist, welches nur selten nach einer Transplantation abgestoßen wird, im Gegensatz zur Haut und Niere. Des Weiteren finden sich häufig Metastasen, zum Beispiel von malignen Melanomen, Lungen- oder Mammakarzinomen in der Leber, welche Antigene in Form der Tumorzellen präsentieren, während inflammatorische Abläufe gering ausfallen. Das Phänomen der Induktion der peripheren Toleranz lässt sich, wie Studien zeigen, unter anderem mit dem ausgeprägten antiinflammatorischen Mikroenvironment begründen (Limmer *et al.* 2000). Zu diesem Mikroenvironment zählen die Kupffer'schen Sternzellen der Lebersinusoiden sowie die Leber-sinusoidal-endothelial-Zellen. Hierbei handelt es sich um ortsständige Makrophagen, die durchaus auch in den 'Disse-Raum' auswandern können und die

Antigene aufnehmen und präsentieren, welches anschließend zur T-Zellproliferation und Zytokinproduktion führt (Crispe, 2003). So konnte gezeigt werden, dass unter einer Infektion mit *Propionibacterium acnes* die Anzahl der NKT-Zellen in der Leber sinkt, während die Anzahl an CD4- und CD8-T-Zellen steigt. Die gleichen Ergebnisse wurden auch bei Mäusen mit einer Fettleber gefunden (Matsui *et al.* 1997; Guebre *et al.* 2000). Auch bei einer viral bedingten Hepatitis konnte immunologisch ein Anstieg an CD4- und CD8-Zellen in der Leber nachgewiesen werden, wobei die CD8-T-Zellen CD45RO exprimieren und hauptsächlich in den Sinusoiden lokalisiert sind, während die CD4-T-Zellen, die CD45RA exprimieren, überwiegend in den Portalgefäßen angesiedelt sind (Fiore *et al.* 1997). Des Weiteren ist die Anzahl an $\gamma\delta$ T-Zellen bei einer viralen Hepatitis in der Leber erhöht (Tseng *et al.* 2001). Das Zusammenspiel der Zellen des Immunsystems in der Leber wurde bereits schon in Studien untersucht (Crispe 2001). Zirkulierende T-Zellen in den Leber-Sinusoiden können mit Kupffer-Zellen und Leber-sinusoidal-endothelial-Zellen (LSECs) interagieren. Antigene werden von den dendritischen Zellen den CD4- und CD8-T-Zellen präsentiert. Ebenfalls können LSECs- und Kupffer-Zellen Antigene präsentieren. An dieser Stelle könnte nun die ganze Kaskade ablaufen, die man bei aktivierten T-Zellen findet, aber stattdessen wurde eine ausgeprägte T-Zellapoptose in der Leber gefunden (Crispe *et al.* 2000). Bei einer viralen Hepatitis konnte gezeigt werden, dass es neben einer T-Zellaktivierung auch zu einer verstärkten Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen (ICAM1), MHC-Klasse-II-Molekülen (Volpes *et al.* 1990), vaskulären Zelladhäsionsmolekülen (VCAM1) (Garcia-Monzon *et al.* 1995) sowie co-stimulatorischen Molekülen der B7-Familie kommt (Mochizuki *et al.* 1997). Das Zusammenspiel dieser Moleküle könnte für die Induktion der peripheren Toleranz in der Leber verantwortlich sein. In Experimenten, wo den Mäusen zu einer Infektion zusätzlich CTLA-4 gegeben wurde, konnte eine noch höhere Anzahl an apoptotischen CD4- und CD8-T-Zellen in der Leber gefunden werden (Li *et al.* 2001).

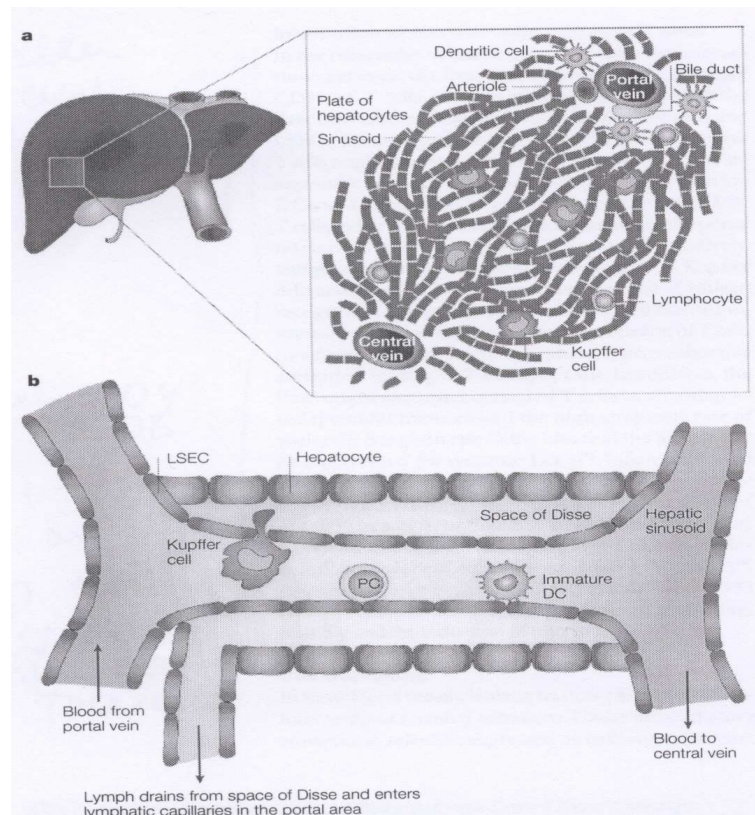


Abb. 1.4 Das hepatische Mikroenvironment

Die Abbildung a) zeigt den Aufbau eines Leberlobulus. Histologisch gehören zu einem Leberlobulus das Lebergewebe, welches von den portalen Gefäßen (Lebervenen und Arterien) sowie einem Gallengang eingeschlossen wird. Dieser Bereich wird auch Glisson'sche Trias genannt. Ein anastomosierendes Netzwerk von arteriellen und venösen Kapillaren fließt zur Ernährung der Hepatozyten durch die Leber-Sinusoid. In den Lebersinusoiden ist eine Population von Makrophagen ansässig, bekannt als Kupffer'sche Sternzellen. b) Abbildung B zeigt die Organisation der Sinusoide. Die Sinusoide werden von Endothelzellen (Lebersinusoidal-endothelial-Zellen (LSECs)), die eine gefensterte Membran haben, umgeben. Ferner findet man Kupffer-Zellen, Lymphozyten und dendritische Zellen in den Leber-Sinusoiden. Die Kupffer-Zellen befinden sich hauptsächlich im Lumen, können aber auch mit den Hepatozyten in Kontakt treten. Der subendotheliale Raum, bekannt als Disse-Raum, ist der Ort, an dem die Lymphe abfließt in die lymphatischen Kapillaren in dem Gebiet um die Zentralvene. (Abb. Cripe, 2003)

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Induktion der peripheren Toleranz gegen Antigene hauptsächlich innerhalb der Vena portae stattfindet (Sugiura *et al.* 1997; Wrenshall *et al.* 2001). Diese Mechanismen müssten auch dazu beitragen, dass die Leber Antigene zum Beispiel von Nahrung, Bakterien sowie von zirkulierenden Plasmodium-infizierten Blutzellen tolerieren kann. Selbst bei den Experimenten, wo keine körpereigenen Antigene über leberspezifische Promotoren exprimiert wurden, sondern Fremd-Antigene, konnten keine inflammatorischen Prozesse gefunden werden. Selbst passiv transferierte T-Zellen, die spezifisch sind für Antigene, die in der Leber exprimiert werden, ignorieren diese Antigene, obwohl gezeigt werden konnte, dass diese T-Zellen die

Leber über die Sinusoide mehrfach passieren und sie auch auf APC-Zellen ansprechen (Limmer *et al.* 1998; Voehringer *et al.* 2000). Die periphere Toleranz konnte lediglich gebrochen werden bei sehr starken inflammatorischen Stimuli, wie zum Beispiel sehr starken infektiösen Agenzien wie das CpG- (Cytosine-phosphorothioate-guanine-)reiche oligodeoxynukleotides (ODN). Das Applizieren von CpG-ODN ist in der Lage, das Phänomen der Toleranz zu brechen und eine starke CD8-T-Zell-Akkumulation zu bewirken, welche anschließend autoaggressiv gegen die Hepatozyten wirken (Sacher *et al.* 2002).

Wie bereits unter 1.1. beschrieben, konnte in Studien gezeigt werden, dass CTLA-4 ein negativer Regulator der T-Zellfunktion ist, welcher auf T-Zellen während humaner Malaria (Schlotmann *et al.* 2000), sowie auch durch *Plasmodium berghei*-induzierter Malaria im Mausmodell exprimiert wird (Jacobs *et al.* 2002). Eine Blockade von CTLA-4 bewirkt eine starke Akkumulation und Aktivierung an T-Zellen, wodurch eine Exazerbation der Pathogenese bewirkt wird, welche letztendlich im Stadium der zerebralen Malaria endet. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine Bindung durch CTLA-4 die Hirnpathologie, welche durch T-Zellen hervorgerufen wird, verhindern kann. Beispiele von Modellen der Autoimmunität und oraler Toleranz-Induktion bestätigen auch, dass die Bindung von CTLA-4 ein Schlüsselprozess ist in der Induktion der peripheren Toleranz (Chambers *et al.* 2001).

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte an *Plasmodium berghei*-infizierten Mäusen die Funktion von CTLA-4 insbesondere hinsichtlich histologischer Veränderungen in der Leber untersucht werden. Ein Schwerpunkt lag dabei in der Fragestellung, ob $\gamma\delta$ -T-Zellen während der Blutphase einer *Plasmodium berghei*-Infektion verstärkt in der Leber akkumulieren und ob diese über CTLA-4 gesteuert werden. Des Weiteren sollte die Produktion der Zytokine (IFN- γ , IL-12, IL-18) aus Lymphozyten und deren Einfluss auf die Pathologie in der Leber ermittelt werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass CTLA-4 auf T-Zellen während der Blutphase *Plasmodium berghei*-infizierter Mäuse anwesend ist. Eine Blockade von CTLA-4 führt zu schweren Veränderungen in der Histologie, über das Stadium der Fettleber bis hin zum Stadium einer Hepatitis, kombiniert mit einer hohen Infiltration an IFN- γ -produzierenden Zellen. Die Daten zeigen, dass CTLA-4 während einer *Plasmodium berghei*-Malaria die T-Zellfunktion in peripheren Organen wie der Leber kontrolliert und somit einen wichtigen Mechanismus für die Kontrolle der Pathologie unter einer T-Zellinflammation darstellt.

2 Material & Methoden

2.1 Herkunft häufig verwendeter Materialien und Reagenzien

2.1.1 Lebende Organismen

Mäuse:

Als Mäuse dienten im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin gezüchtete, weibliche C57BL/6- (Haplotyp H2-b-)Mäuse im Alter von 6–8 Wochen.

Ein Tierversuchsantrag der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Hansestadt Hamburg lag vor.

Parasiten:

Parasiten zur experimentellen Infektion wurden aus einer C57BL/6-Maus, die mit *Plasmodium berghei* ANKA infiziert war und eine hohe Parasitämie aufwies, gewonnen. Zur Aufbewahrung wurde infiziertes Blut mit dem Stabilat (0,9% NaCl, 4,6% Sorbitol und 35% Glycerol) in flüssigem Stickstoff eingefrohren.

2.1.2. Antikörper

Antikörper für Immunfluoreszenzen und FACS-Analysen:

Hamster anti-Maus CTLA-4 (UC10-U4F10-Überstand) *BNI, Hamburg*

Anti-CD4 (L3T4, dilution 1/50

Anti CD8 (Ly-2, dilution 1/50

Anti- $\gamma\delta$ TCR, Hamster anti-mouse

Caltag Laboratories

Anti- $\gamma\delta$ TCR, Hamster anti-mouse, fitc-conjugated

Caltag Laboratories

Biotin anti-hamster IgG (G70-204,G94-56)

Pharmingen, Becton Dickinson

Anti-rat IgG, fitc-conjugated

Jackson ImmunoResearch

Laboratories, INC

Anti-rat IgG Rhodamine, tritc-conjugated

Jackson ImmunoResearch

Laboratories, INC

Rhodamine (tritic)-conjugated, Streptavidin	<i>Jackson ImmunoResearch</i>
	<i>Laboratories, INC</i>
Rat anti-mouse CD4-Fitc, Klon: CT-CD4	<i>Caltag Laboratories</i>
Rat anti-mouse CD8a-Fitc, Klon: CT-CD8a	<i>Caltag Laboratories</i>

Antikörper für ELISA:

Ratte anti-Maus IFN- γ (R4-6A2)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
Biotin Ratte anti-Maus IFN- γ (XMG1.2)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
Ratte anti-Maus IL-2 (JES6-1A12)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
Biotin Ratte anti-Maus IL-2 (JES6-5H4)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
Ratte anti-Maus IL-10 (JES5-2A5)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
Biotin Ratte anti-Maus IL-10 (SXC-1)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
Ratte anti-Maus IL-12 p40/p70 (C15.6)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
Biotin Ratte anti-Maus IL-12 p40/p70 (C17.8)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Die Bezugsquellen hier nicht aufgeführter spezieller Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden vermerkt.

Anti-Fade-Lösung	<i>BiomedDia,</i>
	<i>Zweibrücken</i>
BSA	<i>Serva Feinbiochemika,</i>
	<i>Heidelberg</i>
Cohn-II (humane gamma-Globuline)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Fötales Kälberserum (FCS)	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
Gentamycin	<i>PAA, Linz, Österreich</i>
3H-Thymidin	<i>Amersham,</i>

[1 mCi/ml]	<i>Buckinghamshire, UK</i>
L-Glutamin (100x)	<i>PAA, Linz, Österreich</i>
Puffer für FACS	<i>Becton Dickinson</i>
	<i>Immunocytometry Systems</i>
	<i>San Jose, CA, USA</i>
murines IL-2 (rekombinant)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
murines IL-10 (rekombinant)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
murines IL-12 (rekombinant)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
murines IFN- γ (rekombinant)	<i>PharMingen, BD, Hamburg</i>
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	<i>PAA, Linz, Österreich</i>
Reflotron [®] GOT (AST), 30 Tests	<i>Roche Diagnostics</i>
	<i>GmbH, Mannheim</i>
Reflotron [®] GPT (ALT), 30 Tests	<i>Roche Diagnostics</i>
	<i>GmbH, Mannheim</i>
Szintillationsflüssigkeit für β -Counter	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich Chemie</i>
	<i>GmbH, Steinheim</i>
Trypanblau	<i>Serva Feinbiochemika,</i>
	<i>Heidelberg</i>
Tween 20	<i>Sigma-Aldrich Chemie</i>
	<i>GmbH, Steinheim</i>
Wachsstift	<i>DAKO, Glostrup, Dänemark</i>

2.1.4 Kulturbedien, Puffer und Stammlösungen

Sämtliche Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und für zelluläre Arbeiten vor Gebrauch sterilfiltriert oder autoklaviert.

Fötale Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung des Komplementsystems für 30 min auf 56 °C erhitzt und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

Beschichtungs-Puffer	Lösung I	10 mM Na ₂ CO ₃
Für ELISA	Lösung II	20 mM NaHCO ₃
	Zu 70 ml Lösung I wird so viel Lösung II gegeben, bis sich ein pH von 9,6 eingestellt hat.	
Cohn-II-Stammlösung	10 mg/ml in 1x PBS	
Einfriermedium	FCS	50 % (v/v)
	RPMI 10 % FCS	40 % (v/v)
	DMSO	10 % (v/v)
Erythrozyten-Lysis-Puffer	0,1 M Tris/HCL (pH 7,5)	10 % (v/v)
	0,158 M Ammonium- chloridlösung	90 % (v/v)
FACS-Puffer	FCS	25 ml (Endkonz. 2,5 % (v/v))
	NaN ₃	1 g (Endkonz. 2,5 % (w/v))
	Ad 111 x PBS	
PBS (20x)	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	32 g
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5,3 g
	NaCl	164 g
	ad 1 l H ₂ O dest.	
	ergibt für 1x PBS dann pH 7,2	
PBS-Tween für ELISA	0,05 % (v/v) Tween 20 in 1x PBS	

RPMI-Medium	RPMI 1640	500 ml
	FCS	50 ml
	L-Glutamin 200 mM	5 ml
	Gentamycin [10 mg/ml]	2,5 ml
Saponin-FACS-Puffer	FACS-Puffer + 0,5 % (w/v) Saponin	
Stopp-Puffer für ELISA	2 M H ₂ SO ₄	
Substrat-Puffer für ELISA	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	13,8 g (Endkonz. 100 mM)
	NaOH konz.	bis pH 5,5
	Ad 1 l H ₂ O dest.	
Substratlösung für ELISA	TMB-Lösung	1 : 60
	H ₂ O ₂ , 30 %	1 : 10.000
	in Substrat-Puffer	
TMB-Lösung	Tetramethylbezidin (TMB)	60 mg
	DMSO	10 ml
Trypanblau-Stammlösung	2 mg in 100 ml x PBS	

2.1.5 Laborgeräte und Hilfsmittel

Tab. 2.1: Laborgeräte und Hilfsmittel mit Bezugsquelle

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
β-Szintillationszähler „1450 MicroBeta TriLux Liquid Scintillation & Luminescence Counter“	EG & G Wallac, Turku, Finnland
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau
Deckgläschen	Engelbrecht, Edermünde
Digitalwaage	Kern & Söhne, Alberstadt
ELISA-Reader „Lambda E“	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorfreaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
FACScan Flow Cytometer	Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA
FACS Sorter FACSCalibur	Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filter Top-Flaschen (50 ml, 25 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (10, 30 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Kanülen	Braun, Melsungen
Kippschüttler „DUOMAX 2030“	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Magnetrührer „IKAMAG RCT“	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
MICROLON-ELISA-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroskop „Wilovert“	Hund, Wetzlar
Mischgerät (Vortexer) „MS 1 Minishaker“	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Multipetten „Research pro“	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Petri-Schalen, beschichtet	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petri-Schalen, unbeschichtet	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe

pH-Meter „WTW pH 537“ Photomikroskop „Axioskop 2plus“ mit digitaler Kameraanlage	Labotec, Wiesbaden Carl Zeiss, Oberkochen; Kamera: Hamamatsu; Software „Openlab“, Improvision, Coventry, UK Gilson Medical Electronics, Frankreich; Eppendorf, Hamburg
Pipetten	
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen; Gilson, Villiers-le-bel, Frankreich; Sarstedt, Nümbecht Hirschmann, Eberstadt Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettierhilfe „pipetus-akku“ Plastikpipetten	Braun, Melsungen Heraeus Instruments, Hanau Millipore, Bedford, MA, USA Schleicher & Schuell, Dassel Brandt, Melsungen INOTECH AG, Dottikon, Schweiz
Spritzen Sterile Arbeitsbank „Lamin Air HB 2448“ Sterilfilter (Porengröße 0,2 μm) Sterilfilter (Porengröße 0,45 μm) Zählkammer nach Neubauer (0,1 x 0,0025 mm ²) Zellerntegerät „INOTECH Zellharvester-System“	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, Spitzboden (15, 50 ml) Zenrifugen:	
– Cytospin-Zentifuge „Cytospin 3“	Shandon-Life Sciences International GmbH, Frankfurt Eppendorf, Hamburg Heraeus-Sepatech, Hanau
– Tisch-/Mikrozentrifuge „Centrifuge 5415 C“ –Heraeus „Megafuge 1.0“, „Megafuge 1.0 R“, „Omnifuge 2.0 RS“	

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit *Plasmodium berghei*

2.2.1.1 Infektion von Mäusen mit *Plasmodium berghei*

Die Infektion der Mäuse erfolgte intraperitoneal mit einer Infektionsdosis von 1×10^5 mit Sporozoiten befallenen Erythrozyten.

2.2.1.2 *In vivo*-Blockade von CTLA-4

Am Tag der Infektion mit *Plasmodium berghei*-infizierten Erythrozyten wurde einer definierten Anzahl an Mäusen zusätzlich $500 \mu\text{g}$ eines monoklonalen Anti-CTLA-4-(4UF10-)Antikörpers in die Peritonealhöhle gespritzt. Alternativ bekam eine andere Versuchsgruppe an Mäusen nur $500 \mu\text{g}$ des monoklonalen Anti-CTLA-4-Antikörpers in die Peritonealhöhle injiziert.

Die Auswirkung der Blockade wurde anhand der Überlebenszeiten der infizierten Mäuse beobachtet.

2.2.1.3 Bestimmung der Parasitämie

Der Verlauf einer Infektion mit *Plasmodium berghei* wurde anhand der Anzahl an Parasiten im Blut der Maus verfolgt. Hierzu wurde der infizierten Maus die Schwanzvene punktiert, so dass ein Tropfen Blut heraustrat. Die Blutausrichthe wurden anschließend mit der Wright-Stain-Lösung gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Eine Bestimmung der Gesamtanzahl an Erythrozyten und davon infizierter Erythrozyten erfolgte bei einer Vergrößerung von 20x unter Öl. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden jeweils mindestens fünf Gesichtsfelder und mindestens 300 Zellen ausgezählt.

2.2.2 (Maus- und) Zellpräparation

2.2.2.1 Gewinnung einzelner Organe aus der Maus

Nach einer Inkubationszeit von zirka 8 Tagen wurde unter Narkose mit Metofane (Janssen, Neuss) durch Herzpunktion Blut entnommen, bevor die Mäuse getötet und die Leber sowie die Milz steril herauspräpariert wurden. Anschließend wurden die Organe zur Präparation von Milzzellen oder Leberlymphozyten weiterverarbeitet oder alternativ in Einfriermedium eingebettet und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.2.2.2 Gewinnung von Milzzellsuspensionen

Die steril herauspräparierte Milz der Maus wurde mit Hilfe einer $0,4\text{-}\mu\text{m}$ -Kanüle mit 5-ml-Erythrozyten-Lysis-Puffer gründlich durchgespült. Nach vollständiger Lyse der Erythrozyten wurde die Zellsuspension mit RPMI-Medium mit 5 % FCS gewaschen (1.200 rpm, 4°C , 10 min), bevor die Zellzahl bestimmt wurde. Die lebenden Zellen wurden bei Wartezeiten zwischen den einzelnen Arbeitsschritten auf Eis gelagert.

2.2.2.3 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Lebendzellzahl wurde durch den Trypan-Ausschlusstest bestimmt.

Lebende Zellen schließen den Farbstoff Trypanblau aktiv aus und sind so von toten Zellen, bei denen der Farbstoff ins Zellinnere eindringt, zu unterscheiden.

Eine Aliquot-Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung gemischt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei wurden jeweils vier Großquadrate (mit jeweils 16 Kästchen $= 0,1\text{ }\mu\text{l}$) ausgezählt und die Zellzahl der lebenden Zellen mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.2.4 T-Lymphozyten-Isolation aus der Leber

Zur Isolation von T-Lymphozyten aus der Leber musste die Leber zuerst ausreichend mit PBS 1 ml durchgespült werden, um möglichst eine große Anzahl an Erythrozyten zu entfernen. Dazu wurde die noch in der Maus vorhandene Leber mit einer Pinzette angehoben und so das große, in die Leber einziehende Blutgefäß (Vena cava) freigelegt. Anschließend wurde mit einer Spritze und einer Kanüle (grün) zirka 1 ml PBS in die Vena cava injiziert, bis die Leber maximal anschwell und blass wurde. Beim Herausziehen der Kanüle floss das Gemisch aus Blut und PBS aus der Leber ab.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen homogenisiert. Dazu wurde zuerst die Leber in Stücke geschnitten und zerdrückt, dann mit 25 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und erneut mit 25 ml PBS gewaschen. Danach wurde das im Falcon-Röhrchen verbleibende Pellet in 9 ml PBS resuspendiert, so dass man ein Endvolumen von 10 ml erhielt. Anschließend wurden 5 ml 80%iges Percoll (NaCl 80 g/l, Na₂HPO₄ 11,5 g/l, KCL 2 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l in 10x PBS-Puffer, 7,4) dazugegeben und gemischt. Diese Lösung wurde sehr vorsichtig und gleichmäßig auf zwei Falcon-Röhrchen verteilt, die zuvor mit 5 ml reiner Percoll-Lösung (80 %) aufgefüllt wurden. Dabei bildeten sich somit zwei Phasen in den Falcon-Röhrchen, die dann für 20 min bei 2.000 rpm zentrifugiert wurden. Anschließend wurde die durch Zentrifugieren entstandene Interphase, welche Lymphozyten, Erythrozyten und einige Hepatozyten enthielt, mit einer Eppendorf-Pipette abgesaugt. Die geernteten Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen, bevor mit Erythrozyten-Lysis-Puffer eine Depletion der Erythrozyten erfolgte. Nach einem zweiten Waschvorgang mit PBS-Puffer wurden die Zellen gezählt, wobei mindestens eine Zellzahl von 10⁶ erreicht werden sollte.

2.2.2.5 Messung der Zellproliferation (Proliferationstest)

Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, dass jede sich teilende Zelle DNA synthetisiert. Stellt man diesen Zellen radioaktiv markiertes Thymidin (³H-Thymidin), ein Baustein der DNA, zur Verfügung, wird dieses während des Teilungsvorgangs in die DNA der Zellen eingebaut. Je mehr Zellen proliferieren, desto mehr ³H-Thymidin bauen sie ein und desto höher ist demzufolge die Radioaktivität.

In der praktischen Durchführung sah der Arbeitsvorgang wie folgt aus:

Zuerst wurde der Überstand von in 96-Loch-Gewebekulturplatten kultivierten Zellen bis auf ein Restvolumen von 50 μl abgenommen. Dann wurden 50 μl frisches Medium sowie 20 μl ^3H -Thymidin-haltiges Medium [0,01 mCi/ml] zugegeben, so dass sich eine finale Konzentration von 0,2 μCi ^3H -Thymidin pro Ansatz ergab. Zwei Triplikate mit 50 μl Medium, die keine Zellen enthielten, dienten als Negativkontrollen. Die Proliferation der Zellen wurde nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden durch Einfrieren bei (-20°C) der Gewebekulturplatten gestoppt. Für die Bestimmung des Thymidin-Einbaus wurden die Zellen mit Hilfe eines automatischen Zellerntegeräts geerntet, wobei sie mit Aqua dest. lysiert und durch einen Glasfaserfilter gesaugt wurden. Die DNA wurde dabei in dem Filterpapier zurückgehalten, dieses wurde in einer Mikrowelle getrocknet und danach mit Szintillationsflüssigkeit getränkt in eine Plastikhülle eingeschweißt. Die Szintillationsflüssigkeit wandelte die nicht direkt messbare β -Strahlung in Lichtblitze um, schließlich konnte so die Radioaktivität in einem β -Szintillationszähler bestimmt werden. Die gemessene Radioaktivität wurde in Zerfällen pro Minute (counts per minute, cpm) angegeben.

2.2.3 Gewebe und deren Aufbereitung

2.2.3.1 Aufbereitung der Organpräparate

Die frisch entnommenen Präparate wurden in kleine ($0,5\text{ cm}^3$) große Stücke geschnitten, auf Cryotubes (Roth, Karlsruhe) gelegt und mit Einbettmedium (Jung, Heidelberg) eingedeckelt.

Anschließend wurden die so vorbereiteten Präparate für fünf Minuten in flüssigen Stickstoff gelegt und schockgefroren. Zur weiteren Verwendung wurden sie bei -70°C gelagert.

2.2.3.2 Kryostatschnitte

Die eingefrorenen Gewebeböcke wurden bei -25°C bis -30°C im Cryostaten (2800-Frigocut E, Reichert-Jung, Heidelberg) geschnitten. Die $5\text{--}9\text{ }\mu\text{m}$ starken Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgenommen und über Nacht getrocknet. Nach Fixation für zehn Minuten im eisgekühlten Aceton, trockneten die Objektträger für weitere 24 Stunden, bis sie direkt benutzt werden konnten, oder wurden bei -70°C gelagert.

2.2.3.3 Beschichtung der Objektträger

Die staubfreien Objektträger wurden in ein Gemisch aus 5 ml Silan (Fluka, Neu-Ulm) und 245 ml Aceton (Roth, Karlsruhe) für zehn Sekunden eingetaucht und viermal mit aqua dest. gewaschen. Die beschichteten Objektträger trockneten über Nacht und wurden bis zur weiteren Verwendung staubfrei gelagert.

2.2.3.4 Paraffinschnitte

Die Paraffinschnitte von Leber und Milzgewebe wurden mit freundlicher Genehmigung von der Abteilung für Pathologie unter der Leitung von Prof. Dr. Paul Racz, Tropeninstitut Hamburg, bereitgestellt.

2.2.3.5 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Für zwei Minuten wurden die fixierten Präparate in Hämalun-Lösung (1 Hämatoxilin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kalialun, 50 g Chlorhydrat, 1 g Zitronensäure auf 1.000 ml aqua dest.; alles Fa. Merck, Darmstadt) gelegt und anschließend zehn Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Danach wurden die Präparate für 40 Sekunden in Eosin-Lösung (1 g Eosin auf 100 ml aqua dest. Sigma, Deisenhofen) getaucht, in aqua dest. eine Minute gespült und dann in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zum Schluss musste das Präparat drei Minuten in Xylol liegen, bevor der feuchte Schnitt mit Eukit (Kindler, Freiburg) eingedeckt und das Deckglas aufgelegt wurde.

2.2.4 Immunhistochemie

2.2.4.1 Indirekte immunhistologische Doppelfärbung

In dieser Arbeit wurde die Methode der immunhistologischen Doppelfärbung benutzt, um CTLA-4 und weitere Moleküle darzustellen. Hierbei war es entscheidend, auch die schwache Expression von CTLA-4 sichtbar zu machen. Dazu wurden die fixierten Präparate auf dem Objektträger mit einem Wachsstift (Dako, Glostrup, Dänemark) umkreist, um so definierte Volumina an Färbelösung einsetzen zu können. Anschließend wurden die Präparate mit 20 μ l Cohn-II für 15 min blockiert, um unspezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren von Monozyten und Makrophagen während der weiteren Schritte zu verhindern. Dieser Arbeitsgang sowie die darauf folgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt, um das Austrocknen zu verhindern.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden 25 μ l des monoklonalen anti-CTLA-4 (4UF10, anti-Hamster IgG) sowie 25 μ l anti-CD4 (L3T4, Ratte IgG 1:100) als Primärantikörper auf die Präparate gegeben. Um das Ausmaß unspezifischer Bindung der Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper beurteilen zu können, wurde stets eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper mitgeführt. Nach einer Inkubation von 45 min wurde erneut dreimal gewaschen, bevor 25 μ l des biotinylierten anti-Hamster IgG 1:100 sowie 25 μ l des anti-Ratte IgG 1:50, FITC konjugiert, für 45 min auf die Präparate gegeben und im Dunkeln gelagert wurde. Der Einsatz von biotinylierten Antikörpern gegen Antikörperbestandteile des Primärantikörpers führt zu einer Verstärkung, da mehrere Biotinreste sich auf den Antikörpern befinden. Dies wird erreicht, indem Biotinreste in der Nähe des Primärantikörpers durch eine nachfolgende Gabe von TRITC-markiertem Streptavidin, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, sichtbar gemacht werden können. Die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin garantiert eine hohe Spezifität. Daher wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS im nächsten Färbeschritt 50 μ l Streptavidin-Tritc 1:200 verdünnt für weitere 45 min als Tertiärantikörper auf die Präparate gegeben. Anschließend wurden die Präparate nach erneutem Waschen mit Antifade-solution eingedeckelt und wie in (2.2.8.1) beschrieben ausgewertet und dokumentiert (2.2.8.2).

In einigen Experimenten wurden von den Präparaten Schichtaufnahmen erstellt und mit Hilfe der digitalen Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Diese ermöglicht eine bessere Darstellung der einzelnen optischen Ebenen.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung von Einzelzellsuspensionen

2.2.5.1 Cytospin (Immunfärbung von Zytozentrifugationen)

Die Zytozentrifugation ist eine Methode, um eine Zellsuspension in bestimmter Konzentration auf einen Objektträger zu bringen, ohne dass sich Salzkristalle bilden. Dazu wurden 100–200 μl Zellsuspension, die etwa 1×10^4 bis 1×10^5 Zellen enthielten, in einen Trichter gegeben und durch Zentrifugation in der Zytospinzentrifuge (600 rpm, 10 min) auf den Objektträger transferiert. Das Medium, in dem sich die Zellen befanden, wurde bei diesem Vorgang von dem Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) aufgesogen.

Die Objektträger mit den Zellen wurden über Nacht getrocknet, anschließend zehn Minuten mit Aceton fixiert und zum Trocknen einige Stunden stehen gelassen. Die sogenannten Cytospins wurden entweder sofort gefärbt oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Vor der Färbung wurden die auf den Objektträger aufgebrachten Zellen mit einem Wachsstift umfahren und anschließend mit 20 μl Cohn-II für mindestens 15 min blockiert. Auf diese Weise können unspezifische Bindungen an die Fc-Rezeptoren der Zellen von Monozyten und Makrophagen verhindert werden. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt, um Austrocknen zu verhindern.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem jeweiligen Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 100 bis 1 : 500 in PBS für 60 min inkubiert, danach dreimal in einem mit PBS gefüllten Objektträgerständer für 5–10 min gewaschen und im Falle der indirekten Immunfluoreszenz mit dem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper (1 : 100 bis 1 : 500 Verdünnung in PBS) inkubiert. Nach dieser sechzigminütigen Inkubation im Dunkeln wurden die Objektträger erneut dreimal in PBS gewaschen, bevor die Zellen mit einem Tropfen Anti-Fade-Solution und einem Deckgläschen bedeckt wurden. Im Falle der direkten Immunfluoreszenz wurde ohne einen zweiten Färbeschritt eingedeckt.

Es wurde stets eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper mitgeführt, um das Ausmaß unspezifischer Bindung der Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper beurteilen zu können.

Die Auswertung wurde am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

2.2.5.2 Durchflusscytometrie (FACS)

Durch eine FACS-Analyse können fluoreszenzmarkierte Einzelzellen auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht werden. Hierzu werden die Zellen mit Detektionsmolekülen inkubiert, die entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen das bindende Molekül identifiziert werden. Die an die Zelloberfläche gebundenen, fluoreszierenden Detektionsmoleküle werden in einem FACS-Gerät (FACScan oder FACSCalibur Flow Cytometer) an einem Laserstrahl vorbeigeführt, und ihr emittiertes Licht wird gemessen.

Die einzelnen Färbeschritte erfolgten auf Eis bzw. wurden bei 4 °C durchgeführt, da die Zellen noch unfixiert waren.

Bei jeder Färbung wurden 1×10^5 bis 1×10^6 der zu untersuchenden Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und die Fc-Rezeptoren der Zellen mit 25 μ l des B-Zell-Hybridoms Cohn-II für mindestens 15 Minuten blockiert. Anschließend wurde pro Ansatz 1 μ l Primärantikörper in 25 μ l FACS-Puffer oder 50 μ l eines konzentrierten Hybridoma-Kultur-Überstandes auf die Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert, mit FACS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang musste zweimal wiederholt werden. Falls der Primärantikörper nicht Fluoreszenz-markiert war, wurde nun der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Sekundärantikörper (1 μ l) in 100 μ l FACS-Puffer für 30 min (Lagerung im Dunkeln) zu den Zellen gegeben.

Anschließend wurde dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und die gefärbten Zellen schließlich mit 300 μ l Paraformaldehyd-Lösung in PBS-Puffer fixiert.

Die Messung der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte in einem FACScan oder FACSCalibur Flow Cytometer. Die aufgenommenen Daten wurden mit Hilfe des Computerprogrammes CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Histogrammen, in denen die Zellzahl gegen die Fluoreszenz aufgetragen wurde. Im Falle der indirekten Immunfluoreszenz wurde stets eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper durchgeführt, dazu wurden Fluoreszenz-

markierte unspezifische Antikörper (Isotypenkontrolle) oder Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden, verwendet.

2.2.6 Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay (ELISA)

Mit dieser Methode können lösliche Moleküle mit hoher Empfindlichkeit spezifisch nachgewiesen werden. Dabei bindet das gesuchte Antigen an einen immobilisierten Antikörper und wird anschließend durch einen zweiten Antikörper detektiert. Durch die Verwendung von biotinylierten sekundären Antikörpern kommt es zu einer Amplifikation des Signals. In den hier durchgeführten ELISAs wurden die Konzentrationen an IFN- γ , IL-2, IL-10 und IL-12 gemessen.

Tab. 2. :Konzentrationen der beim ELISA eingesetzten Antikörper

<u>Zytokin</u>	<u>Capture-Antikörper</u>	<u>Biotin-Antikörper</u>
IFN- γ	2 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$
IL-2	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
IL-10	2 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
IL-12	2 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$

Für die hier durchgeführten ELISAs wurden 96 well-ELISA-Platten mit einem für das nachzuweisende Zytokin spezifischen Capture-Antikörper in Coating-Puffer (50 μl pro Loch) beschichtet. Die Bindung des Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen mit der Materialoberfläche. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween entfernt. Anschließend wurden noch freie Oberflächenbindungsstellen mit Blockpuffer über zwei Stunden blockiert, um unspezifische Bindungen der folgenden Antigene und Antikörper zu verhindern. Nach erneutem Waschen wurden jeweils 50 μl der Kulturüberstände in die entleerten Plattenvertiefungen pipettiert. Auf jeder Platte wurde zusätzlich eine Standardreihe mit Doppelwerten mitgeführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde viermal mit PBS-Tween gewaschen und im Anschluss der zweite biotinylierte Antikörper in 0,1 % (w/v) BSA in PBS (1 : 10.000) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde erneut fünfmal gewaschen, bevor ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1 : 10.000

in Coating-Puffer) in die Vertiefungen gegeben wurde. Biotin bindet mit einer sehr hohen Affinität spezifisch an Avidin, eine Stunde später bei Raumtemperatur haben sich somit stabile Komplexe zwischen den biotinylierten Antikörper und dem Enzym-markierten Streptavidin gebildet. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS-Tween wurde schließlich die 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin- (TMB-)Substratlösung zugegeben. Dabei wird durch die Peroxidase, die proportional zu dem nachzuweisenden Zielmolekül im jeweiligen Ansatz vorhanden war, das farblose TMB in einen blauen Farbstoff umgewandelt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 10 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 25 μ l Stopp-Lösung beendet. Bei diesem Vorgang erfolgte ein Farbumschlag zu Gelb. Die Detektion erfolgte unmittelbar im Anschluss photometrisch mit Hilfe des ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 405 nm.

2.2.7 Enzymbestimmung GOT/GPT aus Mausserum

Die Bestimmung der Leberenzyme GOT und GPT erfolgte durch eine Analyse verschiedener Mausseren. Den C57BL/6-Mäusen wurde zuvor entweder nur Plasmodium berghei, anti-CTLA4 oder beide Komponenten gespritzt. Zirka 8 Tage nach der Infektion wurde den Mäusen 1–2 ml Blut unter Narkose mit Metofane (Janssen, Neuss) durch Herzpunktion entnommen, zentrifugiert, und mit Hilfe des Reflotron[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde das Serum der Mäuse analysiert. Dabei wurden 32 μ l des Serums direkt auf das Testfeld spezieller Reflotron[®]-GOT und GPT- Teststreifen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) pipettiert. Analysierte das Gerät nach 123 Sekunden einen Messwert im oberen Grenzbereich, so erschien in der Anzeige der Vermerk „Linearität ungeprüft“. In diesem Fall musste dann mit einer 1 : 2- bis 1 : 10-Verdünnung in 0,9 % NaCl gearbeitet werden. Die Enzymwerte wurden als Aktivität U/l angegeben und nach jedem Messvorgang automatisch ausgedruckt.

2.2.8 Auswertung und Dokumentation

2.2.8.1 Auswertung der immunhistologischen Präparate

Die Auswertung der Fluoreszenzpräparate erfolgte mit dem Photomikroskop „Axioskop 2plus“ (Carl Zeiss, Oberkochen). Jedes Präparat wurde einzeln ausgezählt, mindestens fünf Gesichtsfelder mit ca. 250 Zellen wurden dabei betrachtet und ausgewertet. Dies erfolgte bei einer Vergrößerung 20/1.000 sowie 40/1.000fachen Vergrößerung. Mit zwei verschiedenen Filtern ließen sich die beiden Fluoreszenzfarbstoffe FITC und TRITC getrennt anregen. Für FITC (Fluoresceinisothiocyanat) wurde ein Anregungsfilter von 450–490 nm und ein Sperrfilter von 515–565 nm benutzt. Für TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) wurden ein Anregungsfilter von 546 nm und ein Sperrfilter von 590 nm verwendet.

2.2.8.2 Fotografische Dokumentation

Auf dem Photomikroskop „Axioskop 2plus“ war eine Kleinbildkamera montiert (Hamamatsu), mit der die fotografische Dokumentation erfolgte. Die Fotos wurden mit der Software „Openlab“ (Improvision, Coventry, UK) bearbeitet und gespeichert. Anschließend auf eine Foto-CD eingescannt, mit dem Programm Adobe Photoshop nachbearbeitet und mit dem Apple Color Style Writer 2500 Tintenstrahldrucker mit Foto-Farbpatrone ausgedruckt.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte an *Plasmodium berghei*-infizierten Mäusen die Funktion von CTLA-4 insbesondere hinsichtlich der Regulation der Pathologie in der Leber untersucht werden. Eine Blockade von CTLA-4 führt zu schweren histologischen Veränderungen, über das Stadium der Fettleber bis hin zum Stadium einer Hepatitis, kombiniert mit einer hohen Anzahl an IFN- γ -produzierenden Zellen. Die Daten zeigen, dass CTLA-4 während einer *Plasmodium berghei*-Malaria die T-Zellfunktion in peripheren Organen wie der Leber kontrolliert und somit einen wichtigen Mechanismus für die organspezifische Pathologie unter einer T-Zellinflammation darstellt und an der Kontrolle beteiligt ist.

3.1 Eine CTLA-4-Blockade führt zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes, mit schweren histologischen Veränderungen, während einer *Plasmodium berghei*-Infektion.

Wie bereits nachgewiesen wurde, findet man während der Blutphase der Malaria in Leber und Milz eine starke Akkumulation von infizierten Erythrozyten, die sich durch eine charakteristische Anreicherung des Malariapigments in den betroffenen Organen auszeichnet (Jacobs *et al.* 2002). Mit Hilfe der HE-Färbung an Leberschnitten von *Plasmodium berghei*-infizierten C57Bl/6-Mäusen konnte gezeigt werden (Abb. 3.1A), dass sich in der Leber leichte morphologische Veränderungen zeigen, in Form von aktivierten Kupffer'schen Sternzellen und erweiterten Sinusoiden. Bei Mäusen hingegen, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, findet man schwere histologische Veränderungen, die auf den Zustand einer Fettleber hinweisen (Abb. 3.1.B).

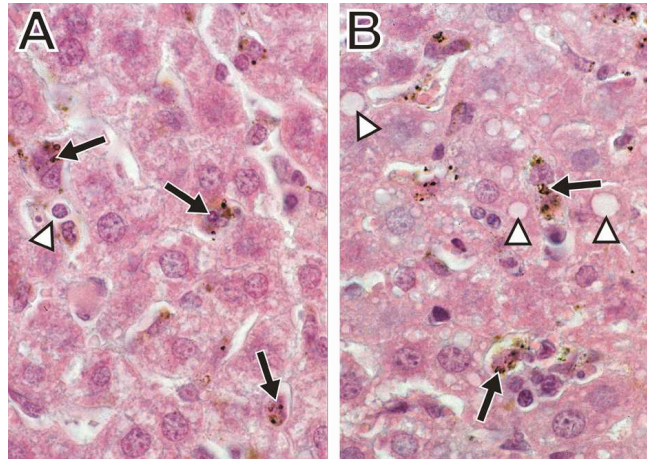


Abb. 3.1 CTLA-4 reguliert die Leberpathologie

Die pathologischen Veränderungen der Leber von infizierten Mäusen (A) und solchen, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden (B), wurde histologisch untersucht. Durch die histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von CTLA-4 durch einen monoklonalen Antikörper zu einer verstärkten Pathologie in der Leber führt. Auf beiden Fotos zeigen die weißen Dreiecke auf Fettvakuolen, die Pfeile dagegen auf aktivierte Kupffer-Zellen mit endozytiertem Malariapigment. Die deutlich höhere Anzahl an Fettvakuolen in Abbildung B weist auf den Zustand einer Fettleber hin. Charakteristische Veränderungen sind gezeigt (n = 4).

3.1.1 Messung der Leberenzyme von *Plasmodium berghei*-infizierten C57Bl/6-Mäusen

Um das Ausmaß der pathologischen Veränderungen in der Leber deutlicher quantifizieren zu können, wurden die Leberenzyme GOT und GPT im Serum der Mäuse analysiert. Die C57Bl/6-Mäuse wurden mit *Plasmodium berghei* infiziert. Eine Gruppe erhielt sowohl eine *Plasmodium berghei*-Infektion als auch eine CTLA-4-Blockade. Als Kontrollgruppe dienten nicht infizierte Mäuse, die mit anti-CTLA-4 behandelt wurden. Acht Tage nach Infektion wurde den Mäusen 1 ml Blut unter Narkose durch Herzpunktion entnommen, zentrifugiert und das Serum der Mäuse auf den Anstieg von GOT und GPT analysiert. Im Gegensatz zu den nicht infizierten Kontrollmäusen zeigten die nur mit *Plasmodium berghei* infizierten Mäuse einen leichten Anstieg der Leberenzyme. Bei den infizierten Mäusen allerdings, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, waren die Leberenzymwerte am höchsten. Generell konnte in jeder Gruppe festgestellt werden, dass die GOT-Werte stets höher als die GPT-Werte waren. Aufgrund der Lokalisation von GOT (70–80 % in Mitochondrien und 20–30 % im Zytoplasma) und GPT (85 % im Zytoplasma und 15 % in den Mitochondrien) weist dieses auf einen mitochondrialen Schaden der Leber hin.

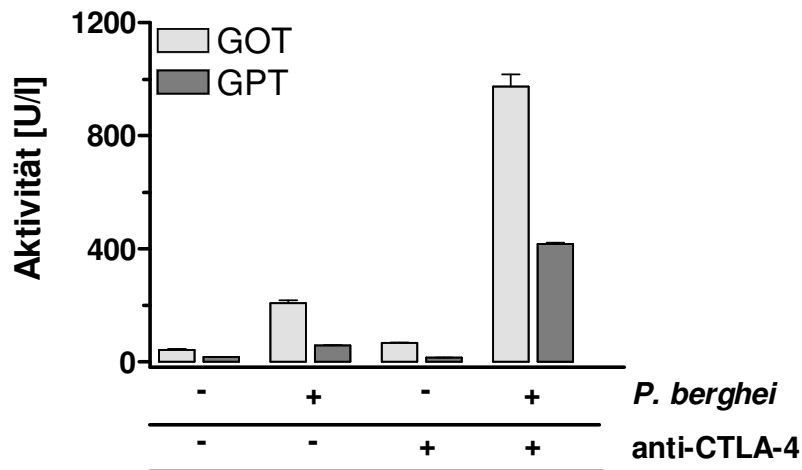


Abb. 3.2: CTLA-4 Blockade führt zu einer verstärkten Freisetzung von GOT und GPT

Die Bestimmung der spezifischen Leberenzyme GOT und GPT erfolgte durch eine Analyse der Mausseren. Die C57Bl/6-Mäuse wurden zuvor mit *Plasmodium berghei* infiziert oder mit anti-CTLA-4 behandelt. Eine Gruppe erhielt sowohl eine *Plasmodium berghei*-Infektion als auch eine CTLA-4 Blockade. Als Kontrollgruppe dienten nicht infizierte Mäuse, die mit CTLA-4 behandelt wurden. Acht Tage nach der Infektion wurde den Mäusen 1–2 ml Blut durch Herzpunktion entnommen, zentrifugiert und das Serum analysiert.

Im Gegensatz zu den Kontrollmäusen zeigten die mit *Plasmodium berghei*-infizierten Mäuse einen leichten Anstieg der Leberenzyme. Ein drastischer Anstieg der Enzyme konnte bei der zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelten Gruppe gezeigt werden. (n = 5)

3.1.2 Analyse des Körpergewichts *Plasmodium berghei*-infizierter Mäuse

Zusätzlich zu dem beobachteten Leberschaden konnte gezeigt werden, dass mit *Plasmodium berghei* infizierte Mäuse, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, einen deutlichen Gewichtsverlust im Laufe der Infektion aufwiesen. Dazu wurde bei zwei Gruppen, bestehend aus jeweils fünf Mäusen, sowohl an Tag null als auch an Tag fünf das Gewicht bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass der Gewichtsverlust bei den Mäusen, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, besonders stark war (Abb. 3.3).

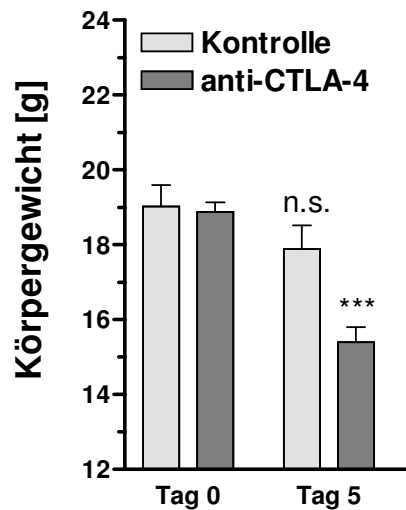


Abb. 3.3: Eine Blockade von CTLA-4 führt zu einer verstärkten Abnahme des Körpergewichts im Verlauf der Malaria-Infektion

An Tag 0 wurden die Mäuse mit *Plasmodium berghei* infiziert (hellgraue Balken Kontrollgruppe, ns = nicht signifikant) oder zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt (dunkelgraue Balken). Es konnte gezeigt werden, dass an Tag 0 kaum ein Gewichtsverlust vorlag, dagegen wurde an Tag 5 in beiden Gruppen (hellgraue und dunkelgraue Balken) ein Gewichtsverlust gemessen, welcher bei der mit anti-CTLA-4 behandelten Gruppe besonders stark war. (n = 5, p < 0,05)

3.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD4⁺-T-Zellen in der Leber *Plasmodium berghei*-infizierter Mäuse

Um die Ursache für die Pathologie in der Leber *Plasmodium berghei*-infizierter Mäuse besser verstehen zu können, wurden Leberschnitte fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Die Histologie zeigte eine dichte Infiltration an mononukleären Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher wurden einzelne Leberschnitte mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, um herauszufinden, ob der Leberschaden durch eine Infiltration an Lymphozyten verursacht wird. Färbungen von *Plasmodium berghei*-infizierten Mäusen und jenen, denen zusätzlich anti-CTLA-4 appliziert wurde, zeigten eine massive Infiltration an CD4⁺-T-Zellen in der Leber (Abb. 3.4).

Auch wenn unter der Infektion ebenfalls ein leichter Anstieg an CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen ermittelt werden konnte (Daten nicht gezeigt), so war dieser weitaus weniger stark im Vergleich mit dem Anstieg an CD4⁺-T-Zellen in der Leber. Betrachtet man die absoluten Zahlen von CD4⁺-T-Zellen in der Leber einer naiven Maus, so kann man im Mittel 4 CD4⁺-T-Zellen pro Gesichtsfeld nachweisen, während man bei einer mit *Plasmodium berghei* infizierten Maus im Mittel 53 CD4⁺-T-Zellen pro Gesichtsfeld zählt. Bei einer infizierten Maus, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurde, ergibt sich bei

den absoluten Zahlen im Mittel ein Wert von 68 CD4⁺-T-Zellen pro Gesichtsfeld. Der Anstieg der CD4⁺-T-Zellen ist somit von naiven Mäusen zu mit *Plasmodium berghei*-infizierten Mäusen hoch und noch höher bei *Plasmodium berghei*-infizierten Mäusen, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden.

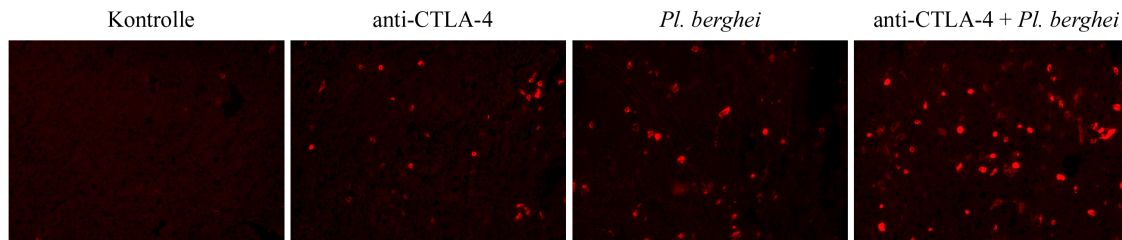


Abb.3.4: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von CD4⁺-T-Zellen in der Leber

Zur Darstellung der CD4⁺-T-Zellen in der Leber wurden Kryoschnitte angefärbt.

Die CD4⁺-T-Zellen wurden spezifisch mit einem monoklonalen Primärantikörper gegen CD4 gefärbt, gefolgt von einem Sekundärantikörper Tritic-konjugiert anti-Ratte IgG. Stets wurde eine Negativkontrolle mit einem Isotypantikörper mitgeführt. Die Aufnahme erfolgte bei 20facher Vergrößerung. Gezeigt ist ein Experiment von dreien mit jeweils typischen Ergebnissen.

3.2.1 Analyse von α : β - und γ : σ -T-Zellen in der Leber

Bereits in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die zerebrale Malaria durch *Plasmodium berghei* ANKA im Mausmodell eine Lymphozyten-vermittelte Erkrankung darstellt, wobei CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen die entscheidende Rolle spielen (Hermesen C. *et al.* 1997). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Mäuse, die mit *Plasmodium berghei* ANKA infiziert und zusätzlich mit IL-2 behandelt wurden, eine starke Akkumulation an γ : σ -T-Zellen im Maushirn aufweisen. Diese Mäuse zeigen bereits an Tag 6–8 nach Infektion zerebrale Symptome. Nach Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen den γ : σ -T-Zellrezeptor zeigten diese Mäuse an Tag 6–8 keine zerebralen Symptome, diese traten maximal an Tag 18 nach Infektion auf (Haque *et al.* 2001). Durch diese Studien konnte gezeigt werden, dass γ : σ -T-Zellen eine Rolle bei der Pathogenese der zerebralen Malaria spielen.

Aufgrund dieser Studien sollte nun untersucht werden, ob sich γ : σ -T-Zellen nach einer *Plasmodium berghei*-Infektion auch in der Leber nachweisen lassen.

Die Analyse der T-Zellen in der Leber zeigte, dass hauptsächlich α : β -T-Zellen in die Leber eingewandert sind. Zwar findet man auch eine steigende Anzahl an γ : σ -T-Zellen in der Leber unter der Infektion, der absolute Zahlenwert ist aber deutlich geringer verglichen mit der Anzahl an α : β -T-Zellen (Abb. 3.5).

Ähnlich wie in Abb. 3.4 gezeigt, findet man die stärkste Infiltration an T-Zellen bei den Mäusen, die zusätzlich zu der *Plasmodium berghei*-Infektion noch mit anti-CTLA-4 behandelt wurden.

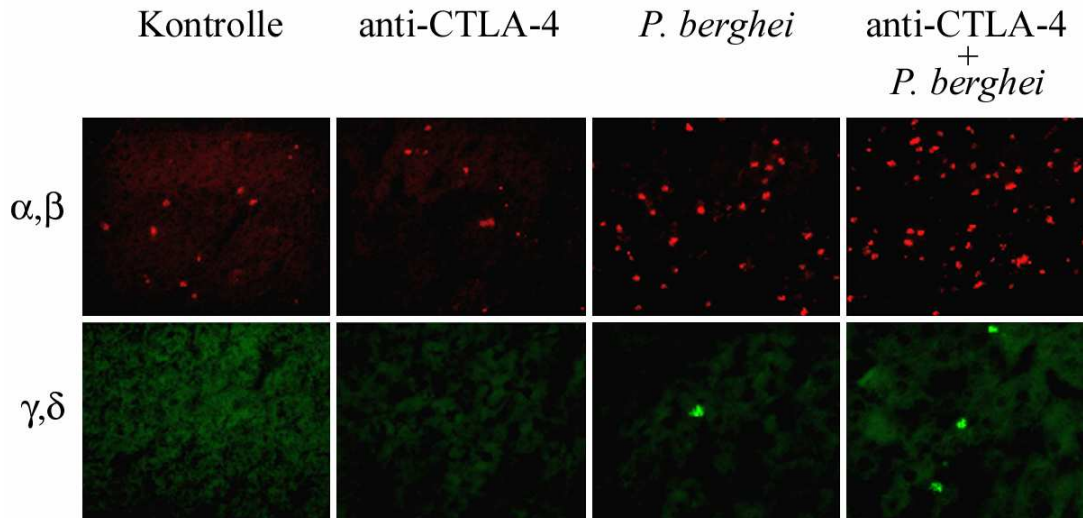


Abb. 3.5: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von $\alpha:\beta$ - und $\gamma:\delta$ -T-Zellen im Lebergewebe
Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von $\alpha:\beta$ - und $\gamma:\delta$ -T-Zellen erfolgte an Leberschnitten von C57Bl/6-Mäusen, die mit anti-CTLA-4 behandelt oder mit *Plasmodium berghei* infiziert worden waren. Eine Gruppe erhielt sowohl eine *Plasmodium berghei*-Infektion als auch eine CTLA-4-Blockade. Als Negativkontrolle wurden Leberschnitte von naiven Mäusen verwendet. Die Präparate wurden acht Tage nach der Infektion gewonnen, fixiert und die Zellen mit anti- $\alpha:\beta$ TCR-hamster anti-mouse als Primärantikörper und mit dem Tric-konjugierten Sekundärantikörper anti-Ratte IgG gefärbt. Die Färbung der $\gamma:\delta$ -T-Zellen erfolgte mit dem Fitc-konjugierten Antikörper gegen den $\gamma:\delta$ TCR. Stets wurde eine Negativkontrolle mit einem Isotypantikörper mitgeführt. Die Aufnahmen erfolgten bei 20facher Vergrößerung.

3.2.2 Nachweis der CTLA-4-Expression auf $CD4^+$ -T-Zellen in der Leber

Da es Befunde gibt, die zeigen, dass unter einer *Plasmodium berghei*-Infektion auf $CD4^+$ -T-Zellen in der Milz CTLA-4 exprimiert wird (Jacobs *et al.* 2002), sollte nachgewiesen werden, ob auch die $CD4^+$ -T-Zellen, die das Leberparenchym während der Infektion infiltrieren, ebenfalls CTLA-4 exprimieren. Zur quantitativen Bestimmung der CTLA-4-exprimierenden Zellen wurde die Methode der Immunfluoreszenzfärbung verwendet. Bei dieser wurde der für CTLA-4 spezifische monoklonale Antikörper 4F10 als unmarkierter Primärantikörper verwendet, der zunächst durch einen biotinylierten Antikörper markiert wurde und in einem dritten Schritt durch Streptavidin-TRITC detektiert wurde. Durch diesen Verstärkungsmechanismus konnte eine sensitive Darstellung der oft nur in geringen Mengen vorkommenden CTLA-4-Moleküle ermöglicht werden. Die Färbung von $CD4$

erfolgte zeitgleich, wobei als Primärantikörper anti-CD4 (L3T4, Ratte IgG) und als ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper anti-Ratte IgG verwendet wurde.

Die Spezifität für die Antikörper sowie für die gesamte Färbung wurde durch das Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen überprüft. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Primärantikörper, wodurch unspezifische Färbungen ausgeschlossen werden konnten. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der Zellen am Fluoreszenzmikroskop (2.2.4.1).

Wie in Abb. 3.6 ersichtlich, konnte mit Hilfe der immunhistologischen Doppelfärbung eine Co-Lokalisation von CTLA-4 und CD4 auf T-Zellen in der Leber nachgewiesen werden. Vergleicht man die absoluten Zahlenwerte der CTLA-4-positiven T-Zellen in Milz und Leber, so findet man in der Leber etwa 10 % doppelt positive Zellen. Eine ähnliche Anzahl an Zellen wurde auch in der Milz detektiert (Niknafs, S. 2004).

Da gezeigt werden konnte, dass bei der zerebralen Malaria im Mausmodell $\gamma\sigma$ -T-Zellen im Hirn verstärkt akkumulieren (Haque *et al.* 2001), sollte geklärt werden, ob die geringe Anzahl an $\gamma\sigma$ -T-Zellen in der Leber ebenfalls CTLA-4 exprimieren. Anhand verschiedener Färbungen in Leber- und Milzgewebe konnten allerdings keine $\gamma\sigma$ -T-Zellen, die CTLA-4 exprimieren, gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

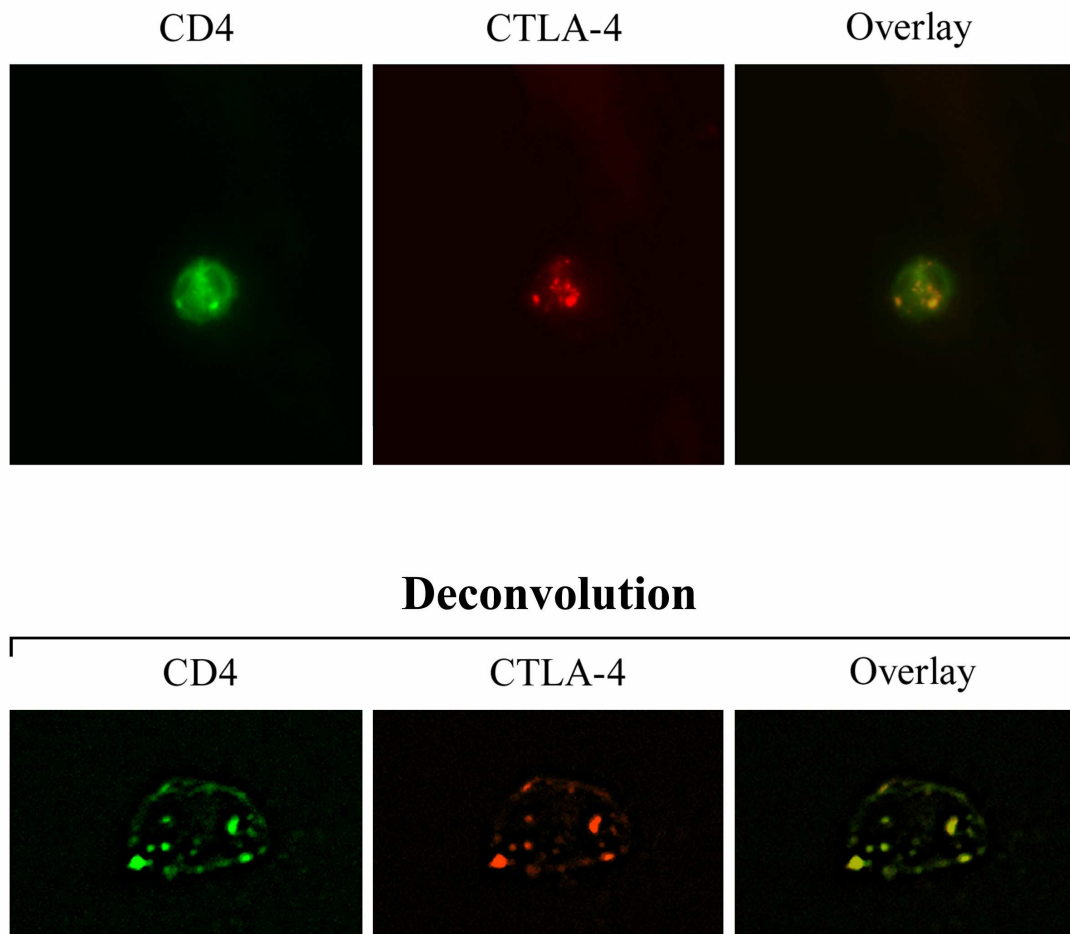


Abb.3.6: Nachweis von CTLA-4/CD4⁺- doppelt positiven Zellen in der Leber

Mit Hilfe der indirekten immunhistologischen Doppelfärbung konnte eine Co-Lokalisation von CTLA-4 und CD4 nachgewiesen werden. Die Färbung erfolgte in drei Schritten, wobei als Primärantikörper der monoklonale Antikörper 4F10 sowie ein Antikörper gegen CD4 (L3T4, Ratte IgG) eingesetzt wurden. Als Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper wurde für die CD4-Färbung der FITC-konjugierte anti Ratte IgG verwendet, und als Verstärkungsmechanismus für die CTLA-4-Färbung wurde der biotinylierte anti-Hamster IgG auf die Präparate gegeben. Im letzten Färbeschritt wurde Streptavidin-TRITC eingesetzt. Der „Overlay“ zeigt die CD4- und CTLA-4 Färbung übereinander gelagert. Mit Hilfe der digitalen Fluoreszenzmikroskopie ließ sich die Co-Lokalisation von CD4 und CTLA-4 nachweisen (2.2.4.1).

3.3 Einfluss der Zytokine auf die Pathologie in der Leber

Um genauer zu analysieren, ob CTLA-4 nicht nur Einfluss auf die Anzahl der CD4⁺-T-Zellen in der Leber hat, sondern auch deren Zytokinproduktion reguliert, wurden verschiedene Zytokin-defiziente Mäuse (IFN- γ ^{-/-}, IL-12^{-/-}, IL-18^{-/-}) mit *Plasmodium berghei* infiziert oder mit anti-CTLA-4 behandelt. Als Positivkontrolle wurde eine Wild-Typ-Gruppe, die mit *Plasmodium berghei* infiziert war und zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurde, eingesetzt, des Weiteren verwendeten wir eine Wild-Typ-Gruppe, die nur eine Infektion mit *Plasmodium berghei* aufwies. Nach einer Infektionsdauer von acht Tagen wurde diesen Mäusen 1 ml Blut unter Narkose mittels Herzpunktion entnommen, zentrifugiert und das Serum der Mäuse analysiert. In Abb. 3.7 konnte gezeigt werden, dass IFN- γ ^{-/-}-Mäuse, sowie IL-12^{-/-}-Mäuse die schwächste Aktivität an GOT und GPT aufwiesen, dagegen zeigten die IL-18^{-/-}-Mäuse leicht erhöhte Enzymwerte, diese waren allerdings dennoch niedriger, verglichen mit den infizierten Wild-Typ-Mäusen. Die Ergebnisse der Transaminasenbestimmung aus dem Serum korrelieren mit dem klinischen Bild der Mäuse. So machten die IFN- γ ^{-/-}-Mäuse und die IL-12^{-/-}-Mäuse acht Tage nach der Infektion noch einen normalen Eindruck, während die IL-18^{-/-}-Mäuse und insbesondere die Wild-Typ-Mäuse krank erschienen. Daraus folgt das nicht die T-Zellen sondern ihre T_H1 Zytokine die Pathologie verursachen.

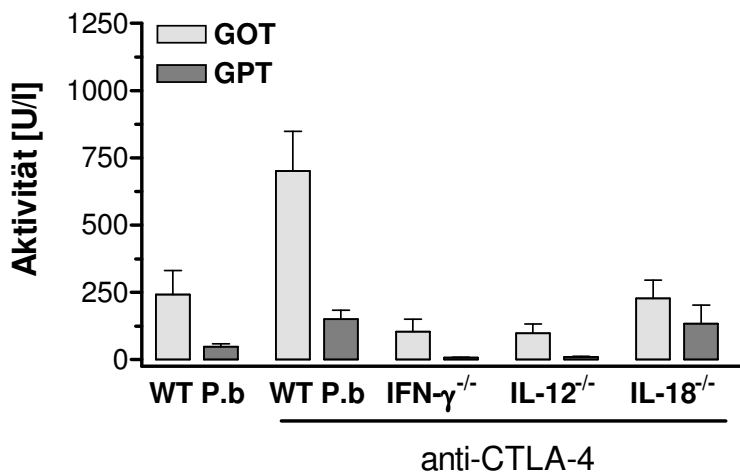


Abb. 3.7: GOT/GPT-Messung aus dem Serum verschiedener Zytokin-defizienter Mäuse

Acht Tage nach der Infektion wurde das Serum verschiedener infizierter Zytokin-defizienter Mäuse (IFN- γ ^{-/-}, IL12^{-/-}, IL-18^{-/-}) sowie infizierter Wild-Typ-Mäuse ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass das Serum sowohl bei den IFN- γ ^{-/-}-Mäusen als auch bei den IL-12^{-/-}-Mäusen, die geringste Enzymaktivität aufwies. Die IL18^{-/-} Mäuse zeigten leicht erhöhte Enzymwerte, diese waren dennoch deutlich niedriger, verglichen mit der Enzymaktivität der Wild-Typ-Mäuse. Die GOT-Aktivität war, wie in Ergebnis 3.1.1 beschrieben, stets höher als die GPT-Aktivität.

3.3.1 Nachweis von CD4⁺-T-Zellen im Lebergewebe verschiedener Zytokin-defizienter Mäuse

In dem vorherigen Experiment wurde die Pathologie der Leber anhand der spezifischen Leberenzymwerte analysiert. Um diese Befunde zu unterstützen, wurde untersucht, ob eine Korrelation der Leberenzymwerte und der Histologie besteht. Zu diesem Zweck wurden Zytokin-defiziente Mäuse (IFN- γ ^{-/-}, IL-12^{-/-}, IL-18^{-/-}) sowie infizierte Wild-Typ-Mäuse fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Da wir, wie unter 3.2 beschrieben, zu dem Ergebnis gekommen sind, dass mit *Plasmodium berghei*-infizierte Mäuse, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, eine besonders hohe Infiltration an CD4⁺-T-Zellen und eine Verstärkung der Pathologie im Lebergewebe aufweisen, färbten wir bei diesen Leberschnitten erneut mit anti-CD4 als Primärantikörper und mit anti-Ratte IgG, Tritic-konjugiert als fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper. Auch bei dieser Färbung konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den Mäusen, die nur mit *Plasmodium berghei* infiziert wurden (WT P.b.), eine noch stärkere Infiltration an CD4⁺-T-Zellen bei den Mäusen zu detektieren war, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden (WT P.b.+ anti-CTLA-4). Dagegen zeigen die IFN- γ ^{-/-}-Mäuse sowie die IL-12^{-/-}-Mäuse kaum eine Infiltration an CD4⁺-T-Zellen, was stark mit der Verhaltensweise der Mäuse an Tag acht nach Infektion sowie mit der Aktivität der Leberenzyme (3.3) korreliert. Bei den IL-18^{-/-}-Mäusen lässt sich im Vergleich zu den anderen Zytokin-defizienten Mäusen eine etwas stärkere Infiltration an CD4⁺-T-Zellen in das Leberparenchym nachweisen (Abb. 3.8).

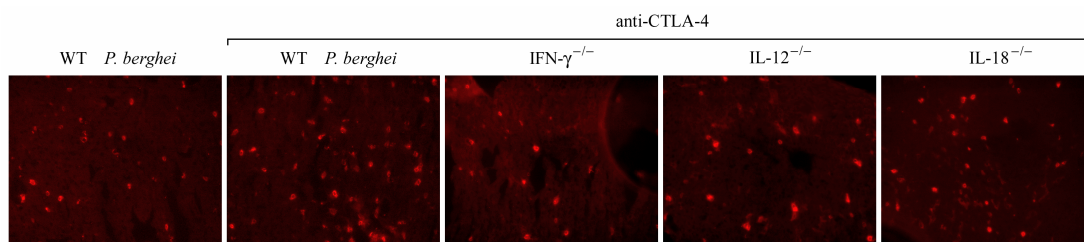


Abb. 3.8: Nachweis von CD4⁺ im Lebergewebe verschiedener Zytokin-defizienter Mäuse

Zur Darstellung der CD4⁺-T-Zellen in der Leber verwendeten wir erneut Kryoschnitte. Die CD4⁺-T-Zellen wurden spezifisch mit einem monoklonalen Primärantikörper gegen CD4 gefärbt, gefolgt von einem Sekundärantikörper TRITC-konjugiert anti-Ratte IgG. Stets wurde eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper mitgeführt. Die Aufnahme erfolgte bei 20facher Vergrößerung.

3.4 Isolation von Lymphozyten aus der Leber während einer *Plasmodium berghei*-Infektion und CTLA-4-Blockade

Anhand der bereits beschriebenen Ergebnisse zur Pathologie der Leber bei Zytokindefizienten Mäusen sollten an dieser Stelle die Stimulierbarkeit der Lymphozyten aus der Leber von infizierten Mäusen sowie ein möglicher Einfluss einer CTLA-4-Blockade auf die Proliferation und Zytokinproduktion untersucht werden. Dazu wurde zuerst die T-Lymphozyten-Isolation aus der Leber etabliert. Die Leber wurde an Tag acht sowohl von Mäusen, die mit *Plasmodium berghei* infiziert waren, als auch von Mäusen, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, über die Vena cava mit Hilfe einer Spritze mit PBS durchgespült. Anschließend wurden die Lymphozyten, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, isoliert und standen somit für weitere Versuche zur Verfügung.

Die Proliferation der Lymphozyten aus der Leber wurde anhand des Einbaus von ³H-Thymidin in die zelluläre DNA sich teilender Zellen gemessen. Interessanterweise proliferieren weder Lymphozyten aus der Leber von infizierten Mäusen ohne CTLA-4-Blockade, noch proliferieren solche von infizierten Mäusen, die mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, unter der Stimulation von anti-CD3 (Daten nicht gezeigt).

3.4.1 Nachweis der Zytokinproduktion von Lymphozyten aus der Leber unter *Plasmodium berghei*-Infektion und CTLA-4-Blockade

Um zu untersuchen, ob eine CTLA-4-Expression die Art der Immunantwort beeinflusst, wurden an Tag acht nach Infektion mit Hilfe eines ELISA in den Kulturüberständen 24 Stunden nach der Stimulation die für eine T_H1-Antwort typischen Zytokine, wie der T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 und das Effektorzytokin IFN- γ , gemessen. Des Weiteren bestimmten wir dabei die Auswirkung der CTLA-4-Blockade auf die Zytokinsekretion.

In diesem Experiment wurden die Überstände einer Kontrollmaus sowie von zwei Mäusen, die mit *Plasmodium berghei* infiziert waren, zwei Mäusen, die nur eine CTLA-4-Blockade erhielten, und einer Maus, die sowohl mit *Plasmodium berghei* infiziert war als auch mit anti-CTLA-4 behandelt wurde, untersucht. Zur Stimulation verwendeten wir anti-CD3, infizierte Erythrozyten sowie nicht infizierte Erythrozyten. Als Negativkontrolle wurde Medium verwendet. 24 Stunden später wurden die Überstände auf das Vorhandensein von IL-2 und IFN- γ hin untersucht (2.2.6).

In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse dieses Experimentes dargestellt, wobei nur die Konzentration an IFN- γ gemessen werden konnte. Der T-Zellwachstumsfaktor IL-2 ließ sich aus den Überständen in diesem Experiment mit Hilfe des ELISA nicht nachweisen. Bei den Lymphozyten aus der Leber, die mit *Plasmodium berghei* infiziert waren und zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, konnte die höchste IFN- γ -Sekretion nach einer Stimulation mit anti-CD3 in den Überständen nachgewiesen werden. Vergleichsweise war die IFN- γ -Sekretion bei Mäusen, die nur mit *Plasmodium berghei* infiziert waren oder nur eine CTLA-4-Blockade erhielten, deutlich geringer. Um zu überprüfen, ob man die Lymphozyten auch mit *Plasmodium berghei*-Antigen stimulieren kann, verwendeten wir in diesem Experiment auch infizierte Erythrozyten und als Negativkontrolle entsprechend nicht infizierte Erythrozyten. Wie aus Abbildung 3.9 ersichtlich, sind diese Werte nicht signifikant.

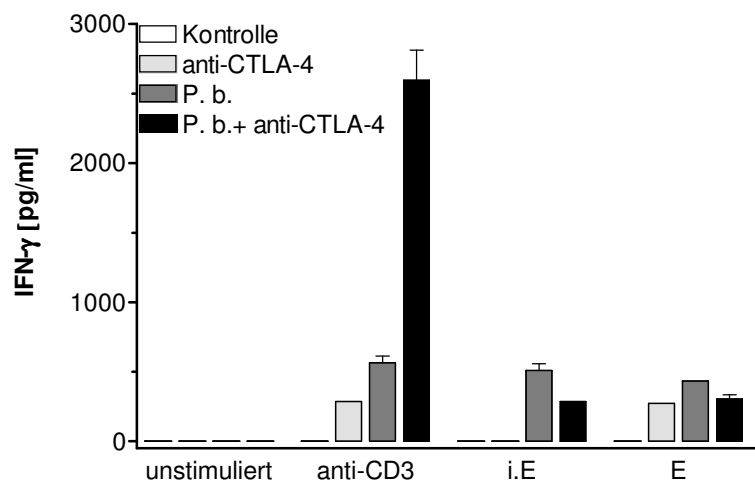


Abb. 3.9: Konzentration von IFN- γ aus Lymphozyten der Mausleber, acht Tage nach *Plasmodium berghei*-Infektion und CTLA-4-Blockade

2×10^5 Lymphozyten wurden mit anti-CD3, infizierten Erythrozyten sowie nicht infizierten Erythrozyten stimuliert. Dabei verwendeten wir Lymphozyten aus der Leber *Plasmodium berghei*-infizierter Mäuse (dunkelgraue Balken) sowie Lymphozyten aus der Leber von Mäusen, die zusätzlich mit CTLA-4 blockiert wurden (schwarze Balken) oder die nur anti-CTLA-4 erhielten (hellgraue Balken). Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte Mäuse bzw. Medium eingesetzt. Nach 24 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IFN- γ mit Hilfe des ELISA bestimmt.

3.4.2 Nachweis der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten aus Leber und Milz unter *Plasmodium berghei*-Infektion und CTLA-4-Blockade

Da T-Zellen aus der Milz an Tag fünf nach *Plasmodium berghei*-Infektion recht hohe Proliferationsraten aufweisen (Jacobs *et al.* 2002), verglichen wir die IFN- γ -Produktion an

Tag fünf nach Infektion aus den Überständen von Milz- und Leber T-Zellen. Wie im vorherigen Experiment wurden die Überstände pro Versuch von Mäusen, die nur mit *Plasmodium berghei* infiziert waren, oder von Mäusen, die nur eine CTLA-4-Blockade erhielten, untersucht. Eine Gruppe wurde sowohl mit *Plasmodium berghei* infiziert als auch mit anti-CTLA-4 behandelt. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte Mäuse eingesetzt. Zur Stimulation verwendeten wir in diesem Experiment anti-CD3, als Negativkontrolle wurde Medium eingesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Überstände auf das Vorhandensein von IFN- γ hin untersucht.

Wie in Abbildung 3.10A und B dargestellt, ließ sich die höchste IFN- γ -Produktion nach anti-CD3-Stimulation aus den Lymphozyten detektieren, die mit *Plasmodium berghei* infiziert waren und zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden. Dass diese Zellen auch unter der Behandlung mit Medium eine leichte Produktion an IFN- γ zeigen, lässt sich unter anderem durch eine starke Voraktivierung erklären. Generell zeigen die Lymphozyten aus der Leber eine vierfach höhere Produktion an IFN- γ im Vergleich zu den Lymphozyten aus der Milz. Betrachtet man die IFN- γ Sekretion aus den Überständen der Lymphozyten aus der Leber an Tag acht (3.4.1) und an Tag fünf, so wird ersichtlich, dass die Sekretion an Tag fünf deutlich höher ist. Dies lässt sich dadurch erklären, dass unter der Malaria-Infektion eine Immunsuppression durch CTLA-4 in der Leber erfolgt, die an Tag acht der Infektion deutlich stärker fortgeschritten ist als an Tag fünf der Infektion. Diese Immunsuppression kann in der Frühphase durch Blockade von CTLA-4 verhindert werden.

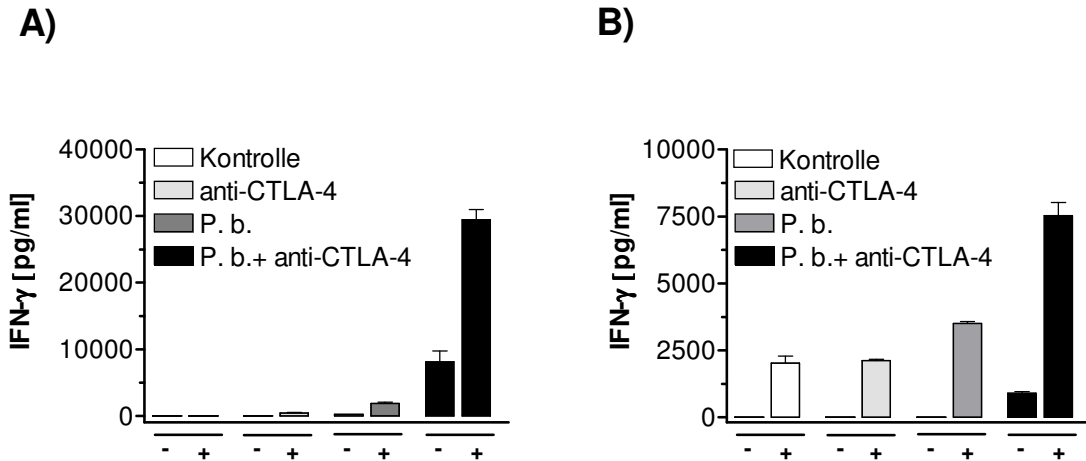


Abb. 3.10: Konzentration von IFN- γ aus Lymphozyten der Leber und Milz, fünf Tage nach Infektion mit *Plasmodium berghei* und CTLA-4 Blockade

Abb. A=Leber zeigt die Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit anti-CD3(+) aus Überständen von Lymphozyten aus der Leber, die entweder nur mit *Plasmodium berghei* infiziert wurden oder zusätzlich mit CTLA-4 blockiert wurden (dunkelgraue und schwarze Balken). Eine weitere Gruppe erhielt nur eine CTLA-4 Blockade (hellgraue Balken) oder blieb unbehandelt (Kontrolle, weiß). Abb. B=Milz zeigt die Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit anti-CD3 aus Überständen von Lymphozyten aus der Milz (Einteilung wie bei Abb. A). Als Negativkontrolle wurde Medium verwendet (-). Es wurden 2×10^5 Lymphozyten aus der Leber und 2×10^5 Lymphozyten aus der Milz stimuliert. Die Zytokinbestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt, pro Gruppe wurden jeweils zwei Mäuse analysiert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand der Zellkulturen abgenommen und die Konzentration von IFN- γ mit Hilfe des ELISA bestimmt.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass Lymphozyten aus der Milz von C57Bl/6-Mäusen, die mit *Plasmodium berghei* infiziert und zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, an Tag fünf hohe Proliferationsraten aufweisen, dagegen zeigen Lymphozyten aus der Leber von C57Bl/6-Mäusen unter denselben Bedingungen eine erhöhte Produktion an IFN- γ bei anti-CD3-Stimulation.

4 Diskussion

Die Malaria ist nach wie vor eine der häufigsten zum Tode führenden Infektionskrankheiten der Menschheit. Aufgrund zunehmender Ausbildung von Resistenzen gegen bisher gut wirksame Medikamente ist langfristig die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung der Erkrankung erforderlich. Grundlage für neue Strategien bei der Malariabekämpfung ist das genaue Verständnis der Pathologie. Eine entscheidende Rolle bei der Pathologie kommt den T-Zellen zu. Anhand eines Mausmodells sollte die Funktion der CTLA-4-Expression auf CD4-Zellen während des Blutstadiums einer Malaria-Infektion, insbesondere hinsichtlich der Pathologie in der Leber, analysiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob CTLA-4 die Funktion von T-Zellen organspezifisch modulieren kann. Des Weiteren sollte die Produktion der Zytokine (IFN- γ , IL-12, IL-18) aus Lymphozyten und deren Einfluss auf die Pathologie in der Leber ermittelt werden.

Zu diesem Zweck erfolgte bei C57BL/6-Mäusen eine experimentelle Infektion mit *Plasmodium berghei*-ANKA.

4.1 Eine CTLA-4 Blockade verstärkt die Leberpathologie während einer *Plasmodium berghei*-Infektion

Wie bereits in der Arbeit von (Jacobs *et al.* 2002) nachgewiesen wurde, findet man während der Blutphase der Malaria in Leber und Milz eine starke Akkumulation von infizierten Erythrozyten, die sich durch eine charakteristische Anreicherung des Malariapigments in den betroffenen Organen auszeichnet. Um zu untersuchen ob die Akkumulation an infizierten Erythrozyten in der Leber einen Gewebsschaden auslöst oder ob dieser durch die Folge der Aktivierung des Immunsystems hervorgerufen wird, untersuchten wir Leberschnitte von *Plasmodium berghei*-infizierten C57Bl/6-Mäusen nach HE-Färbung. Anhand der Histologie kamen wir zu dem Ergebnis, dass der Gewebsschaden verstärkt durch die Aktivierung der T-Zellen hervorgerufen wird, da die Mäuse die zusätzlich zu der *Plasmodium berghei*-Infektion noch mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, ausgeprägte histologisch sichtbare Veränderungen des Lebergewebes aufwiesen. Dies äußerte sich anhand der hohen Anzahl an aktivierten Kupffer'schen Sternzellen,

erweiterten Sinusoiden und zahlreichen Fettvakuolen, was letztlich auf den Zustand einer Fettleber hinwies.

Um das Ausmaß der Leberpathologie deutlicher quantifizieren zu können, wurden die Leberenzyme GOT und GPT im Serum der Mäuse analysiert. Im Gegensatz zu den Kontrollmäusen zeigten die mit *Plasmodium berghei*-infizierten Mäuse einen leichten Anstieg der Leberenzyme. Ein drastischer Anstieg der Enzyme konnte bei der zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelten Gruppe gezeigt werden. Da die GOT-Werte bei diesem Experiment stets höher als die GPT-Werte waren, konnte folglich auf einen mitochondrialen Schaden der Leber geschlossen werden.

Zusätzlich zu dem beobachteten Leberschaden konnte gezeigt werden, dass *Plasmodium berghei*-infizierte Mäuse, die mit anti-CTLA-4 behandelt worden waren, einen deutlichen Gewichtsverlust im Laufe der Infektion aufwiesen.

Diese Untersuchungen stimmen mit den Ergebnissen von (Adachi *et al.* 2001) überein, wo gezeigt werden konnte, dass sich während der Erythrozytenphase einer Malaria-Infektion eine Leberschädigung entwickeln kann, obwohl die Merozoiten (die Pathogene der erythrozytären Phase) nicht direkt die Zellen der Leber infizieren. Phagozyten der Leber und der Milz sind eingebunden in die Aufnahme infizierter Erythrozyten und freier Merozoiten, welche nach Aufbruch der Erythrozyten frei werden (Singh *et al.* 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Immunzellen, T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen im Laufe der *Plasmodium berghei*-Infektion stark ansteigt, während sich die Anzahl der Immunzellen in der Milz gleichzeitig verringert. Die stationären Makrophagen, die sogenannten Kupffer'schen Sternzellen der Lebersinusoiden, nehmen eine hohe Dosis des parasitären Antigens auf (Dockrell *et al.* 1980; Nobes *et al.* 2002). Dass der Leberschaden aber nicht allein durch die *Plasmodium berghei*-Infektion hervorgerufen wird, zeigten unsere Ergebnisse nach zusätzlicher Gabe von anti-CTLA-4. Sowohl in der Histologie, der Bestimmung der Leberenzyme und bei der Untersuchung des Körpergewichts konnte beobachtet werden, dass die Erkrankung nach Gabe von anti-CTLA-4 deutlich stärker fortgeschritten war. Dies ist erneut ein Hinweis dafür, dass eine Überreaktion des Immunsystems entscheidenden Einfluss auf die Pathologie hat. Für CTLA-4, mit negativ regulierenden Eigenschaften, ist seit längerem bekannt, dass es zur Terminierung der T-Zellantwort beitragen kann. Über welche Mechanismen die T-Zell-Proliferation dabei genau beendet wird, ist noch nicht abschließend geklärt. Wahrscheinlich erfolgt die Beendigung vorwiegend über eine Inhibition der IL-2-Sekretion, die abhängig vom Aktivierungszustand der Zelle zu einer Blockade des

Zellzykluses oder zum programmierten Zelltod führen kann (Scheipers *et al.* 1998, van Parijs *et al.* 1998). Somit stellt CTLA-4 einen Gegenspieler zu CD28, einem positiv co-stimulierendem Molekül, dar und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Ebenfalls unterstützt wird dies durch Arbeiten an CTLA-4-Knock-out Mäusen. Ein direkter Nachweis der CTLA-4-Funktion konnte für CTLA-4-defiziente Mäuse erbracht werden, indem diese eine letal verlaufende Lymphoproliferation entwickelten (Waterhouse *et al.* 1995). Des Weiteren konnte in der Arbeit von (Sugita *et al.* 2003) gezeigt werden, dass Irispigmentepithel des Auges CD86 (B7-2) exprimiert und über die Bindung an CTLA-4 eine T-Zellsuppression bewirkt. Diese T-Zellsuppression konnte folglich nicht in CTLA-4 Knock-out Mäusen nachgewiesen werden.

4.2 Welche Zellen des Immunsystems lassen sich bei einer *Plasmodium berghei*-Infektion in der Leber detektieren?

Um die Ursache für die Pathologie in der Leber und die Funktion von CTLA-4 im Verlauf einer *Plasmodium berghei*-Infektion besser verstehen zu können, wurden Leberschnitte fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Histologie zeigte eine dichte Infiltration an mononukleären Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher wurden einzelne Leberschnitte mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, um herauszufinden, ob der Leberschaden durch eine Infiltration an Lymphozyten verursacht wird. Färbungen von *Plasmodium berghei*-infizierten Mäusen und jenen, denen zusätzlich anti-CTLA-4 appliziert wurde, zeigten eine massive Infiltration an CD4⁺-T-Zellen in der Leber. In der Arbeit von (Hearn *et al.* 2000) konnte gezeigt werden, dass die *Plasmodium berghei*-Infektion als schwere letale Komplikation eine zerebrale Manifestation zeigt, die eine große Ähnlichkeit zur humanen zerebralen Malaria aufweist. Dabei sollen aktivierte CD4-positive Zellen an der Vermittlung der Pathogenese beteiligt sein (Yanez *et al.* 1996; Hirunpetcharat *et al.* 1999; Riley *et al.* 1999). Mäuse im *Plasmodium berghei*-Modell, die mit anti-CD4 behandelt wurden, entwickelten keine zerebrale Malaria (Jacobs *et al.* 2002). Eine große Rolle bei der Vermittlung der Pathologie wird im Rahmen einer *Plasmodium berghei*-Infektion auch für $\gamma\delta$ -T-Zellen diskutiert (Troye-Blomberg *et al.* 1989).

Bei einer *Plasmodium berghei*-Malaria im zerebralen Stadium konnten $\gamma\delta$ -T-Zellen in Hirn und Milz nachgewiesen werden (Haque *et al.* 2001). In dieser Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob $\gamma\delta$ -T-Zellen CTLA-4 exprimieren und ob diese im Verlauf

einer *Plasmodium berghei*-Infektion in der Leber vorhanden sind. Tatsächlich konnten geringe Mengen an $\gamma\delta$ -T-Zellen während der Infektion in der Leber gefunden werden, die Anzahl jedoch war äußerst gering. Anhand verschiedener Färbungen in Leber- und Milzgewebe konnten allerdings keine $\gamma\sigma$ -T-Zellen, die CTLA-4 exprimieren, gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Stattdessen wurde eine starke Akkumulation an CD4-positiven Zellen in der Leber beobachtet.

Da es Befunde gibt, die zeigen, dass unter einer *Plasmodium berghei*-Infektion auf CD4⁺-T-Zellen in der Milz CTLA-4 exprimiert wird (Jacobs *et al.* 2002), sollte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, ob auch die CD4⁺-T-Zellen, die das Leberparenchym während der Infektion infiltrieren, ebenfalls CTLA-4 exprimieren. Zur quantitativen Bestimmung der CTLA-4-exprimierenden Zellen wurde die Methode der Immunfluoreszenzfärbung angewandt. Aufgrund der nur sehr schwachen Expression von CTLA-4 musste ein Färbeverfahren angewendet werden, welches zur selektiven Verstärkung von Signalen, der durch Antikörper markierten CTLA-4-Moleküle, führte. Eine ausreichende Sensitivität konnte durch die Verwendung von monoklonalen Primärantikörpern, einem sekundären biotinylierten Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Streptavidin, im Rahmen einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung erreicht werden. Diese erlaubt im Gegensatz zur Durchflusszytometrie einen sensitiveren Nachweis der CTLA-4-exprimierenden Zellen. Zusätzlich kann eine Lokalisation des CTLA-4 innerhalb der Zelle, als Unterscheidung zu unspezifischen Hintergrundfärbungen, nachvollzogen werden. Des Weiteren ermöglicht die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung die Detektion von CTLA-4 und einen gleichzeitigen Nachweis eines anderen Oberflächenantigens. Somit konnte eine nähere Charakterisierung der CTLA-4-exprimierenden Zellen durchgeführt werden. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung schlechter quantifiziert werden kann. Tatsächlich wurde eine recht hohe Akkumulation an CD4⁺/CTLA-4⁺ T-Zellen in der Leber gefunden. Diese war besonders ausgeprägt im Rahmen einer *Plasmodium berghei*-Infektion und der zusätzlichen Gabe von anti-CTLA-4.

Dies warf die Frage auf, wie die Immunbiologie der Leber ohne eine Infektion aussieht und welche Rolle die Leber als ein immuntolerantes Organ einnimmt (siehe 1.3 und 1.4). Wie schon in der Einleitung beschrieben, besteht die Leber aus parenchymatösen Zellen (Hepatozyten) und sogenannten „nicht“ parenchymatösen Zellen (NPC). Die NPC bestehen zu 40 % aus Sinusoidal-endothelial-Zellen (SEC), 20 % Kupffer-Zellen (KC) und 20 % intrahepatischen Lymphozyten (IHL). Die intrahepatischen Lymphozyten wiederum lassen sich zu 25 % in NK-Zellen unterteilen, 65 % T-Zellen (90 % davon sind $\alpha\beta$ -T-

Zellen, 10 % $\gamma\delta$ -T-Zellen), 5 % dendritische Zellen (DC), B-Zellen (< 5 %) sowie sehr wenigen Sternzellen (< 1 %). Das Verhältnis von CD4- zu CD8-Zellen der $\alpha\beta$ -TCR-T-Zellen beträgt 1 : 3 in der Leber, im Blut beträgt das Verhältnis 2 : 1. Die CD4-Helferzellen werden unterteilt in T_H1 - und T_H2 -Untergruppen, abhängig von ihrer Produktion an Zytokinen. Die T_H1 -Helferzellen produzieren hauptsächlich IFN- γ , während die T_H2 -Helferzellen hauptsächlich IL-4 produzieren.

Um die Eigenschaften der T-Zellen in der Leber genauer zu analysieren, untersuchten wir den Einfluss der Zytokine auf die Pathologie in der Leber.

4.3 Einfluss der Zytokine auf die Pathologie in der Leber

Um genauer zu analysieren, ob CTLA-4 nicht nur Einfluss auf die Anzahl der $CD4^+$ -T-Zellen in der Leber hat, sondern auch deren Zytokinproduktion reguliert, wurden verschiedene Zytokin-defiziente Mäuse (IFN- $\gamma^{-/-}$, IL-12 $^{-/-}$, IL-18 $^{-/-}$) mit *Plasmodium berghei* infiziert oder mit anti-CTLA-4 behandelt. Es konnte bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (Rudin *et al.* 1997; Riley *et al.* 1999), dass dem T_H1 -Effektorzytokin IFN- γ eine entscheidende Rolle für die Vermittlung der Pathologie zukommt. So konnte zum Beispiel für monoklonale Antikörper gegen IFN- γ gezeigt werden, dass diese die Ausbildung einer zerebralen Malaria verhindern können (Grau *et al.* 1998). Man vermutet, dass IFN- γ zur Pathologie beiträgt, indem es über eine Aktivierung der Makrophagen zu einer vermehrten Freisetzung von TNF- α und NO führt. Die Funktion von TNF- α während der Infektion scheint dabei vom Zeitpunkt der Infektion abhängig zu sein. Für eine *Plasmodium chabaudi*-Infektion konnte eine Korrelation zwischen frühzeitigen hohen TNF- α und der Ausbildung einer Resistenz festgestellt werden. Für den späteren Verlauf wurde eine Korrelation zwischen hohen Spiegeln und dem vermehrten Auftreten von letalen Komplikationen nachgewiesen (Jacobs *et al.* 1996). In der Arbeit von (Chizzolini *et al.* 1990) konnte gezeigt werden, dass $CD4^+$ -T-Zellen von immunen Spendern in der Lage sind stark zu proliferieren und dabei geringere Mengen an IFN- γ zu bilden, als nicht immune Spender mit der gleichen Proliferationsrate. Niedrigere Mengen an IFN- γ könnten, neben einer erhöhten Proliferationsrate, bei klinisch Immunen möglicherweise durch eine verstärkte T_H2 -Antwort bedingt sein.

Auch in dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass dem Effektorzytokin IFN- γ eine entscheidende Rolle für die Vermittlung der Pathologie zukommt. So konnte in den Versuchen, bei denen bei Zytokin-defizienten Mäusen (IFN- $\gamma^{-/-}$, IL-12 $^{-/-}$, IL-18 $^{-/-}$) nach

Plasmodium berghei-Infektion und CTLA-4 Blockade die Leberenzyme GOT und GPT gemessen wurden, die schwächste Aktivität der Enzyme bei IFN- γ ^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Daraus folgt, dass nicht die T-Zellen sondern ihre T_H1-Zytokine, vor allem IFN- γ , die Pathologie verursachen.

Dies korreliert mit unserem Ergebnis zum Nachweis von CD4⁺-T-Zellen im Lebergewebe von IFN- γ ^{-/-}, IL-12^{-/-}, IL-18^{-/-}-Mäusen. Hier konnten wir feststellen, dass mit *Plasmodium berghei*-infizierte Mäuse, die zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, eine besonders hohe Infiltration an CD4⁺-T-Zellen und somit eine stärker veränderte Histologie in der Leberbiopsie aufwiesen. Dagegen zeigten IFN- γ ^{-/-}-Mäuse sowie die IL-12^{-/-}-Mäuse kaum eine Infiltration an CD4⁺-T-Zellen. Die Erkenntnis, dass IFN- γ ^{-/-}-Mäuse und IL-12^{-/-}-Mäuse nahezu resistent gegenüber einem Leberschaden, hervorgerufen durch eine *Plasmodium berghei*-Infektion, sind, obwohl eine T-Zellinfiltration auch bei diesen sichtbar ist, stimmt mit der Arbeit von (Adachi *et al.* 2001) überein, in der gezeigt werden konnte, dass Merozoiten das Immunsystem über den Toll-like-rezeptor (TLR)-myeloid-differentiation factor 88 (MyD88) pathway aktivieren, und diese dann IL-12 produzieren. Dieses Zytokin scheint involviert zu sein an der Leberschädigung von Mäusen, die durch *Plasmodium berghei* infiziert waren.

Zur Untermauerung der bereits beschriebenen Ergebnisse zur Pathologie der Leber bei Zytokin-defizienten Mäusen untersuchten wir im nächsten Schritt die Stimulierbarkeit der Lymphozyten aus der Leber von infizierten Mäusen sowie den Einfluß einer CTLA-4 Blockade auf die Proliferation und Zytokinproduktion. Dazu etablierten wir das Verfahren der T-Lymphozyten-Isolation aus der Leber. Die Proliferation der Lymphozyten aus der Leber wurde anhand des Einbaus von 3H-Thymidin in die zelluläre DNA sich teilender Zellen gemessen. Es zeigte sich, dass interessanterweise weder die Lymphozyten aus der Leber von infizierten Mäusen ohne CTLA-4-Blockade proliferieren, noch proliferieren solche von infizierten Mäusen, die mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, unter der Stimulation von anti-CD3 (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich konnte in der Arbeit von (Jacobs *et al.* 2002) gezeigt werden, dass Lymphozyten aus der Milz nach Stimulation stark proliferieren und IFN- γ produzieren, insbesondere bei den Mäusen, die vorher mit *Plasmodium berghei* infiziert und zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden. Für die erhöhte Anzahl an T-Zellen in der Leber wäre eine erhöhte Proliferationsrate eine mögliche Erklärung. Unsere Versuche zeigen allerdings, dass die T-Zellen in der Leber kaum proliferieren und das somit die erhöhte Anzahl in der Leber nach einer *Plasmodium berghei*-Infektion und einer zusätzlichen Gabe von anti-CTLA-4 höchstwahrscheinlich

durch eine verstärkte Migration von T-Zellen aus lymphatischen Organen zu stande kommt. Eine denkbare Möglichkeit dafür wäre, dass unter normalen Umständen in der Leber das hepatische Mikroenvironment ausreicht, um Antigene abzuwehren. Unter starken Stimuli wie der Infektion mit *Plasmodium berghei* und einer zusätzlichen Blockade von CTLA-4 zeigt sich eine schwere Pathologie in der Leber mit der Anwesenheit zahlreicher CD4⁺-T-Zellen.

Um neben der Proliferation der Lymphozyten in der Leber auch die Zytokinproduktion während einer *Plasmodium berghei*-Infektion und CTLA-4 Blockade zu untersuchen, wurde an Tag acht nach Infektion mit Hilfe eines Elisa's in den Kulturüberständen 24 Stunden nach der Stimulation die für eine T_H1-Antwort typischen Zytokine, wie der T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 und das Effektorzytokin IFN- γ , gemessen. Auch hier lag der Fokus auf der Auswirkung der CTLA-4 Blockade auf die Zytokinsekretion. Wir wählten für diesen Versuch Tag acht der Infektion aus, da bei (Jacobs *et al.* 2002) gezeigt werden konnte, dass sich ab Tag acht vereinzelt bei Mäusen zerebrale Symptome nachweisen ließen, diese Mäuse verstarben dann frühzeitig zwischen Tag acht bis neun der Infektion. Die meisten Mäuse verstarben zwischen dem 18. und 29. Tag nach der Infektion bei Parasitämien von bis zu 60% an den Komplikationen, wie zum Beispiel einer metabolischen Azidose und Anämie. In unserem Versuch konnte erneut festgestellt werden, dass bei den Lymphozyten aus der Leber, die mit *Plasmodium berghei* infiziert waren und zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden, die höchste IFN- γ Sekretion nach Stimulation mit anti-CD3 in den Überständen nachgewiesen werden konnte. Da T-Zellen aus der Milz an Tag fünf nach *Plasmodium berghei*-Infektion recht hohe Proliferationsraten aufweisen (Jacobs *et al.* 2002), verglichen wir die IFN- γ -Produktion an Tag fünf nach Infektion aus den Überständen von Milz- und Leber-T-Zellen. Hier ließ sich die höchste IFN- γ -Produktion nach anti-CD3-Stimulation aus den Lymphozyten detektieren, die mit *Plasmodium berghei* infiziert waren und zusätzlich mit anti-CTLA-4 behandelt wurden. Generell konnten wir zeigen, dass die Lymphozyten aus der Leber eine vierfach höhere Produktion an IFN- γ im Vergleich zu den Lymphozyten aus der Milz aufweisen.

Eine Erklärung für die geringere Produktion an IFN- γ in der Milz wäre die Beobachtung, dass bei experimentellen Malaria-Infektionen die Antigenmenge eine Auswirkung auf die Höhe der produzierten IFN- γ Menge hat (Amani *et al.* 2000). Eine denkbare Möglichkeit wäre auch, dass an Tag fünf nach der Infektion hauptsächlich naive Zellen vorlagen, für die nachgewiesen werden konnte, dass sie erst mehrere Zellteilungen durchlaufen müssen,

ehe sie in der Lage sind, Effektorzytokine, wie IFN- γ , zu produzieren (Bird *et al.* 1998). In der Arbeit von (Jacobs *et al.* 2002) konnte gezeigt werden, dass Mäuse an Tag neun nach der Infektion eine höhere Parasitämie (2 - 8%) zeigten als Mäuse am Tag fünf der Infektion. An Tag neun konnte bei T-Lymphozyten aus der Milz nach anti-CD3-Stimulation nur noch eine geringe Proliferation, sowie eine verminderte Sekretion von IL-2 nachgewiesen werden. Die Menge an IFN- γ hatte im Vergleich zu Tag fünf der Infektion stark zugenommen.

Betrachtet man die IFN- γ Sekretion aus den Überständen der Lymphozyten aus der Leber an Tag acht (3.4.1.) und an Tag fünf, so wird deutlich, dass die Sekretion an Tag fünf höher ist. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass unter der Malaria-Infektion eine Immunsuppression durch CTLA-4 erfolgt, welche an Tag acht weiter fortgeschritten ist als im Vergleich zu Tag fünf der Infektion. Diese Immunsuppression kann in der Frühphase durch Blockade von CTLA-4 verhindert werden.

Vergleichsweise konnte an Tag neun bei T-Lymphozyten aus der Milz nach anti-CD3-Stimulation nur noch eine geringe Proliferation, sowie eine verminderte Sekretion von IL-2 nachgewiesen werden (Jacobs *et al.* 2002). Die Menge an IFN- γ hatte im Vergleich zu Tag fünf der Infektion stark zugenommen. Diese Befunde könnten sich dadurch erklären, dass für eine Sekretion von IFN- γ bereits eine T-Helferzelldifferenzierung zu T_H1-Zellen erforderlich ist, während für die Auslösung einer Proliferation und IL-2 Sekretion allein, eine T-Zellaktivierung ausreichend ist. Des Weiteren ist es auch möglich, dass Zellgruppen wie NK- oder $\gamma\delta$ -T-Zellen, zur IFN- γ -Produktion beitragen.

Die Tatsache, dass die IFN- γ -Produktion an Tag acht nach Infektion in der Leber rückläufig ist, lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass wie oben beschrieben CTLA-4 bereits eine Immunsuppression in der Leber hervorruft, kann aber auch dadurch begründet werden, dass andere Zellen wie zum Beispiel die Leber-sinusoidal-endothelial-Zellen (LSECs) und Kupffer-Zellen (KC), für die Induktion peripherer Toleranz in der Leber verantwortlich sind (Limmer *et al.* 2000). Welche Zellen und Mechanismen noch für das Phänomen der peripheren Toleranz möglicherweise in der Leber sorgen, ist ein Bestandteil der Diskussion unter 4.4.

4.4 Die Immunbiologie und die periphere Toleranz der Leber

Unter physiologischen Bedingungen ist die Leber nahezu frei von Entzündungszellen. Daher wurde vielfach angenommen, dass die Antigen-präsentierenden Zellen (APC) für

die Erhaltung der hepatischen Immuntoleranz verantwortlich sind. So konnte in verschiedenen Arbeiten (Knolle *et al.* 1999; Lohse *et al.* 1996; Limmer *et al.* 2000; Hayashi *et al.* 1999) nachgewiesen werden, dass die ortsansässigen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die sogenannten Leber-sinusoidal-endothelial-Zellen (LSECs) und Kupffer-Zellen (KC), für die Induktion peripherer Toleranz in der Leber verantwortlich sind. Zusätzlich wurde diskutiert, dass Hepatozyten, welche den MHC-II-Komplex hochregulieren, unter einer Hepatitis als APC wirken und somit CD4⁺-T-Zellen aktivieren, welche ebenfalls periphere Toleranz induzieren (Dienes *et al.* 1987; Herkel *et al.* 2003; Bertolino *et al.* 2001). In der Arbeit von (Wiegard *et al.* 2005) konnte nachgewiesen werden, dass LSECs, KC und Hepatozyten CD4⁺-CD25⁺-T-Zellen (Treg) aktivieren. Die supprimierende Eigenschaft der Treg-Zellen wurde in der Anwesenheit von LSECs, KC und Hepatozyten untersucht. Waren Treg-Zellen abwesend, konnten alle drei genannten Zellarten die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen stimulieren. In Anwesenheit der Treg-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen unterdrückt wird. Das Treg-Zellen wichtige Mediatoren der peripheren Toleranz sind, indem sie die Aktivierung autoreaktiver CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterdrücken und somit die Immunantwort unter einer Infektion kontrollieren, konnte in den Arbeiten von (Shevach *et al.* 2001, Takahashi *et al.* 1998 und Suri-Payer *et al.* 1998) gezeigt werden. Die Funktion von Treg, das hepatische Immunsystem zu unterdrücken, unter dem Einfluss von Autoantigenen oder einem Virus, konnte in den Arbeiten von (Longhi *et al.* 2004) und (Cabrera *et al.* 2004) bestätigt werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass die supprimierende Aktivität von Treg erst abgeschwächt werden muss, bevor eine Inflammation in der Leber induziert werden kann. Neben LSECs, KC und Hepatozyten kann Treg von dendritischen Zellen aus der Milz aktiviert werden, sobald gefährliche Stimuli wie LPS oder CpG-ODN anwesend sind. Dieser Mechanismus ist folglich eine Variante, wie die Wechselwirkung zwischen einer Entzündungsreaktion in der Leber und dem Phänomen der hepatischen Toleranz reguliert werden kann.

In Summe konnten weitere Mechanismen beschrieben werden, welche die Leber vor einem durch das Immunsystem hervorgerufenen Schaden schützen. Insbesondere während der Leberphase einer Malaria-Infektion scheint die schützende Immunität auf die speziellen Eigenschaften der Leber zurückzuführen zu sein (Krzych *et al.* 2000). Das Verweilen einzelner Pathogene in der Leber lässt sich durch den supprimierenden Effekt der T-Zellen erklären. Daher wird die Leber auch als „graveyard of activated T-cells“ beschrieben (Crispe *et al.* 2000). Tatsächlich zeigen verschiedene neue Studien, dass aktivierte T-

Zellen durch leberspezifische Mechanismen unterdrückt werden. Dies schließt die immunsuppressiven Eigenschaften der Zytokine wie IL-10 und TGF- β (Knolle *et al.* 2001) ein. Zusätzlich sind die Hepatozyten in der Lage, Antigene den T-Zellen zu präsentieren und dadurch Toleranz zu induzieren (Limmer *et al.* 2000). In der Arbeit von (Streetz *et al.* 2003) konnte gezeigt werden, dass der IL-6-signalisierende Pathway die Hepatozyten vor einem Leberschaden schützt. Dieser Schutz scheint durch die IL-6-abhängige Expression des Akut-Phase-Proteins (Serum Amyloid A) und dem Chemokine KC bedingt zu sein. Senello *et al.* (2005) konnte nachweisen, dass Adiponectin zellprotektive Eigenschaften besitzt, indem es die Sensitivität der hepatotoxischen Zytokine herabsetzt.

In Summe zeigen diese verschiedenen Regulationsmechanismen, wie wichtig die Protektion der Leber durch das Immunsystem ist. Auf der anderen Seite kann der Leberschaden eben gerade durch eine Überreaktion des Immunsystems während verschiedener Infektionen hervorgerufen werden. In dieser Arbeit konnte analog zu der Arbeit von (Crispe *et al.* 2003) gezeigt werden, dass die Toleranz in der Leber auch von co-stimulierenden Molekülen der B7-Familie z. B. CTLA-4-induziert werden kann.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnten wir auch in dieser Arbeit nachweisen, dass unter dem Einfluss von CTLA-4 die T-Zellen auch während einer Malaria-Infektion supprimiert werden. Daher ist die Anzahl an T-Zellen besonders hoch, wenn eine Malaria-Infektion vorliegt und zusätzlich Antikörper gegen CTLA-4 gegeben werden. Es ist festzuhalten, dass eine Blockade von CTLA-4 zu einer verstärkten Leberpathologie über das Stadium der Fettleber bis hin zum Stadium einer Hepatitis, kombiniert mit einer hohen Infiltration an IFN- γ -produzierenden Zellen führt. Die Daten zeigen, dass CTLA-4 während einer *Plasmodium berghei*-Malaria die T-Zellfunktion in peripheren Organen wie der Leber kontrolliert und somit einen wichtigen Mechanismus für die Kontrolle der organspezifischen Pathologie unter einer T-Zellinflammation darstellt.

An dieser Stelle möchte ich noch einmal die Bedeutung der peripheren Toleranz diskutieren. Wie oben beschrieben, können zahlreiche Mechanismen eine T-Zellsuppression und damit periphere Toleranz induzieren. Bei dem Phänomen der peripheren Toleranz handelt es sich folglich um ein Zusammenspiel der Verständigung verschiedener Zellgruppen untereinander. In dieser Arbeit konnte die Bedeutung von CTLA-4 als wichtiger Induktor der peripheren Toleranz aufgezeigt werden. Verschiedene inflammatorische Stimuli, einschließlich einer Überreaktion des Immunsystems auf ein Antigen, führen zu einer Leberschädigung. Es konnte gezeigt werden, dass Pathogene wie *Propionobacterium acnes* und *Plasmodium berghei* oder Moleküle, wie zum Beispiel LPS,

eine akute Inflammation in der Leber induzieren, welche von einer Produktion von IL-12 abhängig ist (Sacher *et al.* 2002; Okamura *et al.* 1995; Tsutsiu *et al.* 1997; Tsutsui *et al.* 2000). Kürzlich konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Glycosylphosphatidylinositol- (GPI-) Moleküle verschiedener Plasmodienarten Induktoren einer proinflammatorischen Immunantwort sind. Folglich konnte daraus geschlossen werden, dass neutralisierende Antikörper gegen diese Moleküle zu einer klinischen Immunität führen (Naik *et al.* 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit synthetischen GPI-Molekülen die Mäuse vor der Ausbildung einer zerebralen Malaria schützt (Schofield *et al.* 2002). Dies unterstützt die Ansicht, dass eine Immunantwort gegen Plasmodien-Antigen sehr eng reguliert werden muss, da eine Überreaktion des Immunsystems auf das Antigen zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes unter einer Malaria-Infektion führen kann (Riley *et al.* 1999).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CTLA-4⁺- Zellen nicht nur in der Milz anwesend sind (Jacobs *et al.* 2002), sondern auch in der Leber. Durch das hepatische Mikroenvironment und den Effekt von CTLA-4 als einen negativen Regulator der T-Zellfunktion wird unter normalen Umständen einer Infektion nur eine verhältnismäßig geringe Inflammation an T-Zellen hervorgerufen und somit nur geringe morphologische Veränderungen in dem entsprechenden Organ. Unter einer Blockade von CTLA-4 allerdings können ein starker Leberschaden und eine hohe Infiltration an T-Zellen festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass CTLA-4 ein entscheidender Faktor dafür ist, periphere Toleranz zu induzieren. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen CTLA-4 exprimieren und diese die Leber infiltrieren. In der Arbeit von (Lohse *et al.* 1996) konnte gezeigt werden, dass LSECs CD80/CD86 exprimieren und, dass diese Rezeptoren auch unter nicht infektiösen Bedingungen in der Leber anwesend sind. Folglich könnte CTLA-4 auch diese Moleküle auf den LSECs binden. Dies stimmt mit der Arbeit von (Minguela *et al.* 2000 und Sugita *et al.* 2003) überein, wo gezeigt werden konnte, dass eine Bindung von CTLA-4 an CD80 oder CD86 zu einer T-Zellsuppression führt und dies folglich zu einer besseren Akzeptanz eines Transplantats. Dies stimmt mit unseren Untersuchungen überein, dass eine CTLA-4-CD80/CD86-Interaktion an der organspezifischen Kontrolle einer T-Zellfunktion teilnimmt, insbesondere während einer Infektion. Es wird zurzeit diskutiert, inwiefern dieser Mechanismus dazu beitragen kann, eine verstärkte Inflammation dahingehend zu verhindern, dass das betreffende Organ seine physiologische Funktion beibehalten kann.

4.5 Das Phänomen der peripheren Toleranz. Ein Ausblick in die Zukunft

Wie oben beschrieben, können zahlreiche Mechanismen eine T-Zellsuppression und damit periphere Toleranz induzieren. Ein durch das Immunsystem induzierter Leberschaden ist bis heute noch nicht vollständig verstanden worden, aber es wurden enorme Fortschritte gemacht. Zieht man all dies in Betracht, sollte verstärkt auch auf die Impfstoff-induzierte Immunantwort in der Leber geschaut werden. In der Arbeit von (Tartz *et al.* 2006) wurde ein rekombinantes adenylate cyclase toxoid (ACT) von *Bordetella pertussis* verwendet, welches ein Epitop von *Plasmodium berghei* enthielt. Dies induzierte eine hohe Zahl an CD8⁺-T-Zellen, welche IFN- γ ausschütteten. Folglich konnte keine protektive Immunität erreicht werden. Wurde dagegen anti-CTLA-4 während der Immunisierung appliziert, konnte eine komplette Protektion gegen *Plasmodium berghei* ANKA erreicht werden. Gerade in Bezug auf die Entwicklung eines Impfstoffes konnte erneut gezeigt werden, wie entscheidend die Induktion der peripheren Toleranz durch CTLA-4 ist.

Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen, dass neue medikamentöse Behandlungsstrategien entwickelt werden können, die eine Immunmodulation mit einbeziehen.

5 Zusammenfassung

Während der Blutphase einer Malaria-Infektion entwickeln sich morphologisch nachweisbare Veränderungen in verschiedenen Organen. Auch im Lebergewebe lassen sich histologische Veränderungen feststellen. In dieser Arbeit stand die Pathologie der Leber während der Blutphase einer Malaria-Infektion im Mittelpunkt. So konnte unter einer Infektion tatsächlich eine hohe Infiltration an T-Zellen in der Leber beobachtet werden. Der Leberschaden fiel dabei erstaunlicherweise nur gering aus. Histologische Analysen wiesen auf die Anwesenheit von CTLA-4- auf CD4⁺- T-Zellen im Leberparenchym hin. Um den Einfluss einer CTLA-4-Expression während einer Inflammation festzustellen, wurde den Mäusen während einer *Plasmodium berghei*-Infektion zusätzlich ein Antikörper gegen CTLA-4 gegeben. Diese Mäuse zeigten daraufhin schwere histologische Veränderungen in der Leber. Unter Verwendung von Zytokin-knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Pathologie unter anderem abhängig war von IL-12 und IFN- γ . So konnte in den Versuchen, bei denen bei Zytokin-defizienten Mäusen (IFN- γ ^{-/-}, IL-12^{-/-}, IL-18^{-/-}) nach *Plasmodium berghei*-Infektion und CTLA-4- Blockade die Leberenzyme GOT und GPT gemessen wurden, die schwächste Aktivität der Enzyme bei IFN- γ ^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Daraus folgt, dass nicht die T-Zellen sondern ihre T_H1 Zytokine, vor allem IFN- γ , die Pathologie verursachen.

Die Ergebnisse zeigen folglich, dass aktivierte T-Zellen während der Blutphase einer Malaria-Infektion eine Pathologie hervorrufen können, die unter anderem auch abhängig ist von der Produktion an bestimmten Zytokinen. Der Leberschaden wiederum kann verstärkt werden durch die zusätzliche Gabe eines Antikörpers gegen CTLA-4, was sich in der Histologie von einem Stadium einer Fettleber bis hin zu einer Hepatitis äußert. In Summe bestätigen diese Ergebnisse folglich die protektiven Eigenschaften von CTLA-4.

CTLA-4 ist daher ein wichtiger Faktor für die Induktion einer peripheren Toleranz unter einer Infektion in verschiedenen Organen und trägt somit nahezu dazu bei, die physiologische Funktion der Organe unter einer Infektion zu erhalten.

6 Literaturverzeichnis

Adachi, K., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Seki, E., Nakano, H., Takeuchi, O., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Okamura, H., Akira, S. and Nakanishi, K. 2001. Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J. Immunol.***167**: 5928-5934.

Allison, J.P. and Krummel, M.F. 1995. The ying and yang of T cell costimulation. *Science*, **270**: 932-933.

Amani, V., Vigario, A.M., Belnoue, E., Marussig, M., Fonseca, L., Mazier, D., Renia, L. 2000. Involvement of IFN- γ receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur.J.Immunol.*, **30**: 1646-1655.

Ashwell, J.D. and Klusner, R.D. 1990. Genetic and mutational analysis of the T cell antigen receptor. *Annual Reviews of Immunology*, **Vol. 8**, pp. 139-167.

Bertolino, P., Bowen, DG., McCaughan, GW., Fazekas de St. Groth, B. 2001. Antigen-specific primary activation of CD8⁺ T cells within the liver. *J. Immunol.*, **166**: 5430-5438.

Bertoletti A., Ferrari C. 2003. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology*, **38**: 4-13.

Bertoletti A., Naoumov NV. 2003. Translation of immunological knowledge into better treatments of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.*, **39**: 115-124.

Boussiotis, V.A., Gribben, J.G., Freeman, G.J. and Nadler, L.M. 1994. Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. *Current Opinion in Immunology*, **6**: 797-807.

Bird, J.J., Brown, D.R., Mullen, A.C., Moskowitz, N.H., Mahowald, M.A., Sider, J.R., Gajewski, T.F., Wang, C.R., Reiner, S.L. 1998. Helper T-cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*, **9**: 229.

Brunet, J.-F., Denizot, F., Luciani, M.F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.G. and Golstein, P. 1987. A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. *Nature*, **328**: 267-270.

Brunner, M. C., Chambers, C. A., Chan, F. K., Hanke, J., Winoto, A. and Allison, J. P. 1999. CTLA-4-mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* **162**: 5813-5820.

Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R.J., Rosen, H.R., Lui, C. et al. 2004. An immunomodulatory role for CD4(+) CD25(+) regulatory T Lymphocytes in hepatitis C virus infection. *HEPATOLOGY*. **40**: 1062-1071

Chambers, C.A., Krummel, M.F., Boitel, B., Hurwitz, A., Sullivan, T.J., Fournier, S., Cassell, D., Brunner, M., Allison, J.P. 1996. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunol. Rev.* **153**: 27-46.

Chambers, C. A., Kuhns, M. S., Egen, J. G. and Allison, J. P. 2001. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapie. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 565-569.

Clark, I.A., Rockett, K.A., Cowden, W.B. 1992. Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *Lancet*. **340**: 894-896.

Crispe, I. N. 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**: 51-62.

Crispe, I. N., Dao, T., Klugewitz, K., Mehal, W. Z. and Metz, D. P. 2000. The liver as a site of T cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol. Rev.* **174**: 47-62.

Dienes, HP., Hutteroth, T., Hess, G., Meuer, SC. 1987. Immunoelectron microscopic observations on the inflammatory infiltrates and HLA antigens in hepatitis B and non-A, non B. *Hepatology*. **7**: 1317-1325

Dockrell, H., de Souza, J. and Playfair, J. 1980. The role of the liver in immunity to blood-stage murine malaria. *Immunology*. **41**: 421-430.

Fiore, G. et al. 1997. CD45RA and CD45RO isoform expression on intrahepatic T-lymphocytes in chronic hepatitis C. *Microbios*. **92**: 73-82.

Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R. and Weiss, A. 1991. Regulation of Interleukine 2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science*, **251**: 313-316.

Freeman, G.J., Lombard, D.B., Gimmi, C.D., Brod, S.A., Lee, K., Laning, J.C., Hafler, D.A., Dorf, M.E., Gray, G.S., Reiser, H., June, C.H., Thompson, C.B., Nadler, L.M. 1992. CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. *J. Immunol*. **149**: 3795-3801.

Garcia-Monzon, C. et al. 1995. Vascular adhesion molecule expression in viral hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology*, **108**: 231-241.

Good, M.F., Doolan, D.L. 1999. Immune effector mechanisms in malaria. *Current Opinion in Immunology*, **11**: 412-419.

Grau, G.E., Gretener, D., Lambert, P.H. 1987. Prevention of murine cerebral malaria by low-dose cyclosporin A. *Immunology* **61**: 521

Grau, GE., Piguet, GF., Vassalli, P., Lambert, PH. 1989. Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol. Rev.* **112**: 49-70.

Gribben, J.G., Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Rennert, P., Jellis, C.L., Greenfield, E., Barber, M., Restivo, J.R., Ke, X., Gray, G.S. and Nadler, L.M. 1995. CTLA-4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **Vol. 92**, pp. 811-815.

Guebre-Xabier, M. et al. 2000. Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology*, **31**: 633-640.

Van der Heyde, H.C., Elloso, M.M., Chang, W.L., Kaplan, M., Manning, D.D., Weidanz, W.P. 1995. Gamma delta T cells function in cell-mediated immunity to acute blood stage *Plasmodium chabaudi adami* malaria. *J. Immunol.* **154**: 3985-3990.

Haque, A., Echchannaoui, H., Seguin, R., Schwarzman, J., Kasper, L.H., Haque, S. 2001. Cerebral malaria in mice: interleukin-2 treatment induces accumulation of gamma-delta T-cells in the brain and alters resistant mice to susceptible-like phenotype. *Am J. Pathol.* **158(1)**: 163-72.

Harper, K., Balzano, C., Rouvier, E., Mattei, M.G., Luciani, M.F., Goldstein, P. 1991. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J. Immunol.* **147**: 1037.

Hayday, A.C. 2000. Gamma delta cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 975-1026.

Hayashi, N., Matsui, K., Tsutsui, H., Osada, Y., Mohamed, R.T., Nakano, H. et al. 1999. Kupffer cells from *Schistosoma mansoni*-infected mice participate in the prompt type 2 differentiation of hepatic T cells in response to worm antigens. *J. Immunol.*, **163**: 6702-6711.

Hearn, J., Rayment, N., Landon, D.N., Katz, D.R., de Souza, J.B. 2000. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect. Immun.* **68**: 5364-5376.

Herkel, J., Jagemann, B., Wiegand, C., Lazaro, JF., Lueth, S., Kanzler, S. et al. 2003. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology*. **37**: 1079-1085.

Hirunpetcharat, C., Finkelman, F., Clark, I.A., Good, M.F. 1999. Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease. *Parasite. Immunol.* **21**: 319

Ho, M., Webster, H.K., Tongtawe, P., Pattanapanyasat, K., Weidanz, W.P. 1990. *Immunol. Lett.* **25**: 139-141.

Hutchcroft, J.E. and Bierer, B.E. 1994. Activation-dependent phosphorylation of the T-lymphocyte surface receptor CD28 and associated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **91**: 3260-3264.

Jacobs, T., Graefe, S. E., Niknafs, S., Gaworski, I. and Fleischer, B., 2002. Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. *J. Immunol.* **169**: 2323-2329.

Jacobs, T., Plate, T., Gaworski, I. and Fleischer, B. 2004. CTLA-4-dependent mechanisms prevent T cell induced-liver pathology during the erythrocyte stage of *Plasmodium berghei* malaria. *Eur. J. Immunol.* **34**: 972-980.

June, C.H., Buestone, J.A., Nadler, L.M. and Thompson, C.B. 1994. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today*. **15**: 321-331.

Junqueira, Carneiro 2005. Histologie, 6. Auflage, Springer Verlag

Karandikar, NJ., Vanderlugt, CL., Walunas, TL., Miller, SD., Bluestone, JA. 1996. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **184**(2): 783-8

Khoruts, A., Mondino, A., Pape, K.A., Reiner, S.L., Jenkins, M.K. 1998. A natural immunological adjuvant enhances T cell clonal expansion through a CD28-dependent, Interleukin (IL)-2-independent mechanism. *J. Exp. Med.* **187**: 225-236.

Klugewitz, K., Blumenthal-Barby, F., Schrage, A., Knolle, P.A., Hamann, A. and Crispe, I.N., 2002. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN- γ -producing cells after intravenous protein immunization. *J. Immunol.* **169**: 2407-2413.

Knolle, P.A., Germann, T., Treichel, U., Uhrig, A., Schmitt, E., Hegenbarth, S., Lohse, A. and Gerken, G., 1999. Endotoxin downregulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J.Immunol.* **162**: 1401-1407.

Knolle, P.A., Schmitt, E.; Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegebarth, S. et al., 1999. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigenpresenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology.* **116**: 1428-1440

Knolle, P.A., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Buschenfelde, K.H. and Gerken, G. 1995. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J. Hepatol.* **22**: 226-229.

Knolle, P.A. and Gerken, G. 2000. Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* **174**: 21-34.

Knolle, P.A. and Limmer A. 2001. Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends. Immunol.* **22**: 432-437.

Krummel, M.F., Allison, J.P. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* **182**: 459.

Krummel, M.F. and Allison, J.P. 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med.* **162**: 5813-5820.

Krzych, U., Schwenk, R., Guebra-Xabier, M., Sun, P., Palmer, D., White, K. and Chalom, I. 2000. The role of intrahepatic lymphocytes in mediating protective immunity induced by attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites. *Immunol. Rev.* **174**: 123-134.

Lai CL., Ratzui V., Yuen, MF., Poynard, T. 2003. Viral hepatitis B. *Lancet*, **362**: 2089-2094.

Lang, W. 1996. „Tropenmedizin in Klinik und Praxis“, Georg Thieme Verlag , Stuttgart, 2. Auflage.

Leach, D.R., Krummel, M.F., Allison, J.P. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**: 1734-1736.

Lee, K.M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D.K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L.E., Thompson, C.B., Bluestone, J.A. 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* **282**: 2263-2266.

Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schonrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B. and Hammerling, G.J. 1998. Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the mikroenvironment. *Eur. J. Immunol.* **28**: 2395-2406.

Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, HG., Reiss Y., Groettrup, M., et al. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat. Med.*, **6**: 1348-1354.

Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J.A., Anasetti, C., Damle, N.K., 1992. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **176**: 1595-1604.

Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A. and Peach, R. 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*, **1**: 793-801.

Liu, Y., Janeway, Jr. C.A. 1991. Microbial induction of costimulatory activity for CD4 T-cell growth. *Int. Immunol.* **3**: 323-332.

Lohse, A. W., Knolle, P.A., Bilo, K., Uhrig, A., Waldmann, C., Ibe, M., Schmitt, E., Gerken, G. and Meyer von Buschenfelde, K.H. 1996. Antigen-presenting function and B7 expression of mouse sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology*. **110**: 1175-1181.

Longhi, MS., Ma, Y., Bogdanos, DP., Cheeseman, P., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. 2004. Impairment of CD4(+) CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J. Hepatol.* **41**: 31-37.

Luhder, F., Hoglund, P., Allison, J. P., Benoist, C., Mathis, D. 1998. Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* **187**: 427-32.

Luhder, F., Chambers, C., Allison, J.P., Benoist, C. and Mathis, D. 2000. Pinpointing when T cell costimulatory receptor CTLA-4 must be engaged to dampen diabetogenic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 12204-12209.

Matsui, K. et al. 1997. *Propionibacterium acnes* treatment diminishes CD4⁺ NK 1.1⁺ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J. Immunol.* **159**: 97-106.

Metz, M.P., Farber, D.L., Taylor, T., Bottomly, K. 1998. Differential role of CTLA-4 in regulation of resting memory versus naive CD4 T cell activation. *J. Immunol.* **161**: 5855-5861.

Miller, L., Baruch, D., Marsh, K. and Doumbo, O. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* **415**: 673-679.

Minguela, A., Marin, L., Torio, A., Muro, M., Garcia-Alonso, AM., Moya-Quiles, MR., Sanchez-Bueno, F., Parilla, P., Alvarez-Lopez, MR. 2000. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 costimulatory molecules are mainly involved in acceptance or rejection of human liver transplant. *Hum. Immunol.* **61**: 658-69.

Mochizuki, K. et al. 1997. B7/BB-1 expression and hepatitis activity in liver tissues of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, **25**: 713-718.

Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.Pl, Hafalla, J.C.R., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., Rodriguez, A. 2001. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*, Vol. **291**: 141-144.

Naik, R.S., Branch, O.H., Woods, A.S., Vijaykumar, M., Perkins, D.J., Nahlen, B.L., Lal, A.A., Cotter, R.J., Costello, C.E., Ockenhouse, C.F., Davidson, E.A. and Gowda, D.C. 2000. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J. Exp. Med.* **192**: 1563-1576.

Niknafs, S. 2004. Untersuchungen zur Funktion von CTLA-4 während des Blutstadiums der experimentellen *Plasmodium berghei* Infektion. *Medizinische Dissertation*

Nobes, M., Ghabrial, H., Simms, K., Smallwood, R., Morgan, D. and Sewell, R. 2002. Hepatic Kupffer cell phagocytotic function in rats with erythrocytic-stage malaria. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**: 598-605.

Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, K., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S. and Kurimoto, M. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature*. **378**: 88-91.

Oosterwegel, M.A., Greenwald, R.J., Mandelbrot, D.A., Lorsbach, R.B., Jarrett, D.Y., Abbas, A.K. and Sharpe, A.H. 1999. The Role of CTLA-4 in Regulating Th2 Differentiation . *J. Immunol.* **163**: 2634-2639.

Parker, GA., Picut, CA. 2005. Liver immunobiology. *Toxicol Pathol.* **33** (1): 52-62.

Rafaeli, Y., Van Parijs, L., London, CA., Tschopp, J., Abbas, AK. 1998. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated FAS-mediated T-cell apoptosis. *Immunity* **8** (5): 615-23.

Perera, M.K., Carter, R., Goonewardene, R., Mendis, K.N. 1994. *J. Exp. Med.* **179**: 311-315.

Poynard T., Yuen MF., Ratzui V., Lai CL. 2003. Viral Hepatitis C., *Lancet*, **362**: 2095-2100.

Raulet, D.H. 1989. The structure, function and molecular genetics of the γ/σ T cell receptor. *Annual Reviews of Immunology*, **Vol 7**, pp. 175-207.

Riley, E.M. 1999. Is T cell priming required for initiation of pathology in malaria infections? *Immunol. Today*. **20**: 228-233.

Rockett, K.A., Awburn, M.M., Rockett, E. J., Cowden, W.B., Clark, I.A. 1994: Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunol.* **16**: 243-249.

Rudin, W., Favre, N., Bordmann, G., Ryffel, B. 1997. Interferon-gamma is essential for the development of cerebral malaria. *Eur. J. Immunol.* **27**: 810-815.

Sacher, T., Knolle, P., Nichterlein, T., Arnold, B., Hammerling, G.J. and Limmer, A. 2002. CpG-ODN-induced inflammation is sufficient to cause T cell-mediated autoaggression against hepatocytes. *Eur. J. Immunol.* **32**: 3628-3637.

Scheipers, P., Reiser, H. 1998. Fas-independent death of activated CD4⁺T Lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10083-10088

Seder, R.A. and Paul, W.E. 1994. Acquisition of lymphokine producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annual Reviews of Immunology*, pp. 635-673.

Senello, JA. Fayad, R., Alison, M., Morris, Robert, H., Eckel, Asilmaz, E., Montez, J., Jeffrey, M., Friedman, C.A., Fantuzzi, D. and G. 2005. Regulation of T-cell-mediated hepatic inflammation by Adiponectin and Leptin. *Endocrinology* **146(5)**: 2157-2164.

Schlotmann, T., Waase, I., Julch, C., Klauenberg, U., Muller-Myhsok, B., Dietrich, M., Fleischer, B. and Broker, B.M. 2000. CD4 $\alpha\beta$ T lymphocytes express high levels of th T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. *J. Infect. Dis.* **182**: 367-370.

Schofield, L., Hackett, F. 1993. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J. Exp. Med.* **177**: 145-153

Schofield, L., Hewitt, M.C., Evans, K., Siomos, M.A. and Seeberger, P.H. 2002. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature.* **418**: 785-789.

Singh, R., Kashiwamura, S., Rao, P., Okamura, H., Mukherjee, A. and Chauhan, V. 2002. The role of IL-18 in blood stage immunity against murine malaria *Plasmodium yoelii* 265 and *Plasmodium berghei* ANKA. *J. Immunol.* **168**: 4674-4681.

Shevach, EM., McHugh, RS, Piccirillo, CA., Thornton, AM. 2001. Control of T-cell activation by CD25⁺/CD4⁺ suppressor T-cells. *Immunol. Rev.* **182**: 58-67.

Sullivan, A.D., Ittarat, I. and Meshnick, S.R. 1996. Patterns of haemozoin accumulation in tissue. *Parasitology.* **112**: 285-294.

Sugita, S. and Streilein, J.W. 2003. Iris pigment epithelium expressing CD86 (B7-2) directly suppresses T cell activation in vitro via binding to cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J.Exp.Med.* **198**: 161-171.

Sugiura, K., Kato, K., Hashimoto, F., Jin, T., Amogh, Y., Yamamoto, Y., Morita, H., Okumura, K. and Ikehara, S. 1997. Induction of donor-specific T cell anergy by portal venous injection of allogeneic cells. *Immunobiology.* **197**: 460-477.

Suri-Payer, E., Amar, AZ., Thornton, AM., Shevach, EM. 1998. CD25⁺/CD4⁺ T-cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T-cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* **160**: 1212-1218.

Tachado, S.D., Gerold, P., Schwarz, R., Novakovich, S., Mc Conville, M., Schofield, L. 1997. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositol of Plasmodium, Trypanosoma and Leishmania: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94:** 4022-4027

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itho, M., Iwata, M. et al. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺/CD4⁺ naturally anergic and suppressive T-cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* **10:** 1969-1980.

Troye-Blomberg, M., Riley, EM., Perlmann, H., Andersson, G., Larsson, A., Snow, RW., Allen, SJ., Houghten, RA., Olerup, O., Greenwood, EM. et al. 1989. T and B cell responses of Plasmodium falciparum malaria-immune individuals to synthetic peptides corresponding to sequences in different regions of the P. falciparum antigen Pf155/RESA. *J. Immunol.* **43(9):** 3043-8.

Tseng, C.T., Miskovsky. E., Houghton, M. & Klimpel, G.R., 2001. Characterization of liver T-cell receptor γ/σ T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence of these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections. *Hepatology*, **33:** 1312-1320.

Tsutsui, H., Matsui, K., Kawada, N., Hyodo, Y., Hayashi, N., Okamura, h., Higashino, K. and Nakanishi, K. 1997. IL-18 accounts for both TNF- α and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J. Immunol.* **15:** 3961-3971.

Tsutsui, H., Matsui, K., Okamura, H. and Nakanishi, K. 2000. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. *Immunol. Rev.* **174:** 192-209-

Van Parijs, L., Abbas, A.K. 1998. Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning Lymphocytes off. *Science* **280:** 243-248.

Voehringer, D., Blaser, C., Grawitz, A.B., Chisari, F.V., Buerki, K. and Pircher, H. 2000. Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J. Immunol.* **165:** 2415-2422.

Volpes, R., van den Oord, J.J. & Desmet, V.J. 1990. Hepatic expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in viral hepatitis B. *Hepatology*, **12**: 148-154.

Walanus, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Geen, J.M., Thompson, C.B., Bluestone, J.A. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**: 405-413.

Walanus, T.L., Bakker, C.Y., Bluestone, J.A. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28 dependent T cell activation. *J. Exp. Med.* **183**: 2541-2550.

Walanus, T.L., Bluestone, J.A. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J. Immunol.* **160**: 3855-3860.

Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H. and Mak, T.W. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*. **270**: 985-988.

Wick, M.J., Leithauser, F., Reimann, J. 2002. The hepatic immune system. *Crit. Rev. Immunol.* **22** (1): 47-103.

Wrenshall, L.E., Ansite, J.D., Eckman, P.M., Heilman, M.J., Stevens, R.B. and Sutherland, D.E. 2001. Modulation of immune responses after portal bvenous injection of antigen. *Transplantation*. **71**: 841-850.

Yanez, D.M., Manning, D.D., Cooley, A.J., Weidanz, W.P., Van der Heyde, H.C. 1996. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J. Immunol.* **157**(4): 1620-4

Yanez, D.M., Batchelder, J., van der Heyde, H.C., Manning, D.D., and Weidanz, W.P. 1999. Gamma delta T-cell function in pathogenesis of cerebral malaria in mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *Infect. Immun.* **67** (1): 446-448.

Lebenslauf

Tanja Plate

geboren am 29.08.1976 in Hamburg
ledig und ortsungebunden

Berufliche Erfahrungen

Seit 07/2005 **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**
Medical Manager

Berufliche Erfahrungen parallel zum Studium

07/2003–08/2003 **GlaxoSmithKline, München**
Corporate Affairs & Business Support
Produkt-PR, Unternehmenskommunikation

03/2002–04/2002 **GlaxoSmithKline, München**
Medizinische Abteilung ZNS/Anästhesie

Berufliche Weiterbildung parallel zum praktischen Jahr

10/2004–03/2005 **Marketing (IHK-Zertifikatslehrgang)**
Handelskammer Hamburg
Schwerpunkt: Basiswissen Marketing, Marktforschung, das
Marketinginstrumentarium, Marketingstrategien realisieren

Medizinstudium

04/2004–03/2005 **Praktisches Jahr**, absolviert in den Fachrichtungen:
Dermatologie, Chirurgie und Innere Medizin, zwei Monate
davon im Queen Elisabeth Hospital, Woolich, London

03/2000–03/2004 **Universität Hamburg Fachbereich Medizin**
Klinisches Studium

10/1997–03/2000 **Medizinische Hochschule zu Lübeck**
Vorklinisches Studium

Doktorarbeit

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Abteilung für Immunologie unter der Leitung von Prof. Dr.
Bernhard Fleischer
Thema: Induktion und Funktion von CTLA-4, einem
negativen Regulator der T-Zellfunktion, in einem
Mausmodell der Malaria

Veröffentlichung

02/2004 CTLA-4 dependent mechanisms prevent T-cell induced-liver pathology during the erythrocyte stage of *Plasmodium berghei* malaria (Jacobs, Plate, Gaworski, Fleischer, Eur.J.Immunol.2004)

Auslandsaufenthalte

08/2004–10/2004 **London:** Allgemeinchirurgie,
Queen Elisabeth Hospital, Woolich, London, England

09/2002–10/2002 **Australien:** Outback „Flying Doctors“, Tennant Creek
Hospital, Northern Territory, Australien

Famulaturen

03/2003–04/2003 **Dermatologie**
Hautarztpraxis Dr. Montag, Hamburg

03/2001–04/2001 **Innere Medizin**
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

09/2000–10/2000 **Chirurgie**
Amalie Sieveking Krankenhaus, Hamburg

09/1998–10/1998 **Forschungszentrum Borstel**, Institut für Immunologie
und Mikrobiologie, Borstel

09/1996–10/1996 **Neurozentrum Freiburg**

Schulbildung

08/1993–06/1997 Sophie-Barat-Schule in Hamburg
staatlich anerkanntes katholisches Gymnasium

08/1987–06/1993 Realschule Meiendorf in Hamburg

Sprachkenntnisse

Englisch verhandlungssicher in Wort und Schrift
Französisch und Italienisch – gute Grundkenntnisse

Freizeitinteressen

Internationales Reisen
Sport, besonders Standard Tanz und Volleyball
Klavier spielen

Hamburg, den 03.08.2006

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit tatkräftig mit Ideen, aufmunternden Worten und Hinweisen unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie Herrn Dr. Thomas Jacobs, der mir das Thema anvertraute, mich die nötigen experimentellen Techniken lehrte und mir mit seiner ständigen Diskussionsbereitschaft mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Fleischer, da ich am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg meine Untersuchungen durchführen und die hervorragende technische Ausrüstung nutzen durfte.

Frau Iris Gaworski und Ulrike Klauenberg, MTA der Laborgruppe Immunologie, danke ich dafür, dass sie mich die Grundlagen der Laborarbeit und diverse experimentelle Techniken lehrten und mich stets durch motivierende Ratschläge unterstützten.

Insbesondere danke ich meinem guten Freund Sven Pischke für die Hinweise bezüglich Layout, für Ratschläge und für die Unterstützung bei der Arbeit, wofür auch meiner Mutter erheblicher Dank gebührt.

In Summe gebührt all denen Dank, die mich motivierten und mir damit die Kraft gaben, meine Arbeit fertig zu stellen; wie meiner Familie, meinem Freundeskreis und meinen Kollegen.

9 Erklärung

Ich versichere hiermit ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als dir von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

Hamburg, den 22.7.2006