

Funktion der Koinhibitoren CTLA-4 und BTLA bei der T-Zellregulation im Verlauf der Blutphase der experimentellen Malaria

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Bernd Lepenies

aus Hameln

beim Department Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

Hamburg, September 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. B. FLEISCHER
Weiterer Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 07. Dezember 2007

Hamburg, den 17. November 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

DANKSAGUNGEN

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer für die freundliche Aufnahme in die Abteilung, das interessante Arbeitsthema und die kompetente Betreuung der Arbeit.

Frau PD Dr. Iris Bruchhaus möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Arbeit als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Jacobs für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit sowie seine zahlreichen und konstruktiven Anregungen.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Kenneth Murphy für die Bereitstellung von BTLA-Antikörpern sowie Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Überlassung von HVEM-defizienten Mäusen.

Frau Juliane Oetzel und Herr Guido Adler haben als Projektstudenten bei der Klonierung von BTLA und HVEM und der Charakterisierung von Antikörpern geholfen. Dafür ein herzliches Dankeschön!

Frau Iris Gaworski danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der Gefrierschnitte und den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Frau Christiane Steeg gilt mein Dank für ihre unermüdliche Unterstützung in allen Fragen des Laboralltags.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, vor allem dem Labor 219, ein herzliches Dankeschön für das sehr gute Arbeitsklima. Ihr werdet mir fehlen!

Danken möchte ich auch den Arbeitsgruppen von Frau Dr. Minka Breloer, Herrn PD Dr. Uwe Ritter sowie Herrn PD Dr. Volker Heussler für die Hilfe bei vielen praktischen Fragen.

Bleiben die Menschen, die mich in jeder Situation unterstützt haben:

Meinen Eltern, die mir das Biochemie-Studium und die Promotion ermöglicht haben, möchte ich herzlich danken. Meiner Frau Erdenetuya, die mir durch ihre Liebe die nötige Kraft gegeben hat, und unserem Sohn David, der mich allein durch sein Lächeln motiviert hat, gilt mein besonderer Dank.

EINBUCHSTABEN-CODE DER AMINOSÄUREN

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>cluster of differentiation</i>)
CM	zerebrale Malaria (<i>cerebral malaria</i>)
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2'-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead/winged helix transcription factor 3</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HBS	<i>Hanks' balanced salts</i>

HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSV1	Herpes-simplex-Virus Typ I
HVEM	<i>herpesvirus entry mediator</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
IFN	Interferon
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
ITIM	<i>immune-receptor tyrosine-based inhibition motif</i>
ITSM	<i>immune-receptor tyrosine-based switch motif</i>
kDa	Kilodalton
LAL	<i>Limulus amoebocyte lysate</i>
LIGHT	<i>homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MHC I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) Klasse I/II
Neo	Neomycin
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
OT	Ovalbumin-transgen
OVA	Ovalbumin
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ₃ O ⁺ -Ionen
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PD-L1/L2	<i>Programmed death ligand 1/2</i>

PE	Phycoerythrin
Py17NL	nicht-letaler <i>P. yoelii</i> -Stamm
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SHP	<i>Src</i> homology domain-containing tyrosine phosphatase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Die adaptive Immunität	1
1.1.2	Kostimulation	3
1.1.3	CTLA-4 / B7.1 und B7.2	4
1.1.4	BTLA / HVEM	7
1.1.5	Mausmodelle für LIGHT, BTLA und HVEM	10
1.1.6	Weitere kostimulatorische/koinhibitorische Moleküle	12
1.1.7		
1.2	Malaria	16
1.2.1	Pathogenese der Malaria	18
1.2.2	Murine Malariamodelle	21
1.3	Fragestellung und Ziele der Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Laborgeräte	24
2.1.2	Glas- und Plastikwaren	25
2.1.3	Chemikalien	25
2.1.4	Bakterienstämme, Zelllinien, Mausstämme	25
2.1.5	Antikörper und Detektionsreagenzien	26
2.1.6	Material für molekularbiologische Arbeiten	27
2.1.6.1	Reagenzien	27
2.1.6.2	Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen	28
2.1.6.3	Plasmide	29
2.1.6.4	Enzyme	29
2.1.6.5	Oligonukleotid-Primer	30
2.1.7	Material für biochemische Arbeiten	31
2.1.7.1	Reagenzien	31
2.1.7.2	Puffer und verwendete Stammlösungen	31

2.1.8	Material für zellbiologische Arbeiten	33
2.1.8.1	Reagenzien	33
2.1.8.2	Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen	34
2.2	Methoden	36
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1.1	RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen	36
2.2.1.2	Herstellung von cDNA durch reverse Transkription	36
2.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.1.5	Restriktionsverdau von DNA	39
2.2.1.6	Gelreinigung von DNA-Fragmenten	39
2.2.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	39
2.2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten	40
2.2.1.9	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	41
2.2.1.10	Plasmidpräparation aus Bakterien	42
2.2.1.11	Kryokonservierung von Bakterien	42
2.2.1.12	DNA-Sequenzierung	43
2.2.2	Biochemische Methoden	43
2.2.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford	43
2.2.2.2	Aufreinigung von Antikörpern und Ig-Fusionsmolekülen.....	43
2.2.2.3	Dialyse	44
2.2.2.4	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	44
2.2.2.5	LPS-Konzentrationsbestimmung	45
2.2.2.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).	45
2.2.2.7	Westernblot	46
2.2.3	Zellbiologische Methoden	46
2.2.3.1	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation	46
2.2.3.2	Kultur von Zelllinien	47
2.2.3.3	Zellzählung	47
2.2.3.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	47
2.2.3.5	Blutentnahme und Gewinnung von Serum	48
2.2.3.6	Präparation von murinen Milzzellen	48

2.2.3.7	Isolation von murinen Lymphozyten aus der Leber	48
2.2.3.8	Präparation von murinen Zellen aus dem Gehirn	49
2.2.3.9	Generierung von murinen Knochenmarksmakrophagen	49
2.2.3.10	Stimulation von murinen Milzzellen	50
2.2.3.11	Messung der Zellproliferation	50
2.2.3.12	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	51
2.2.3.13	Transfektion von eukaryontischen Zellen	52
2.2.3.14	Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung)	53
2.2.3.15	Zytospin	54
2.2.3.16	Anreicherung von Zellen durch magnetische Zellsortierung (MACS) ...	55
2.2.3.17	Herstellung von Gefrierschnitten	55
2.2.3.18	Immunhistochemische Färbungen	56
2.2.4	Tierversuche	57
2.2.4.1	Infektion von Mäusen mit <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	57
2.2.4.2	Infektion von Mäusen mit <i>Plasmodium yoelii</i> (Py17NL und Py-lethal)..	58
2.2.5	Statistik	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Die Funktion von CTLA-4 bei der T-Zellregulation im Verlauf der <i>P. yoelii</i> -Infektion...	59
3.1.1	Induktion von CTLA-4 im Verlauf der <i>P. yoelii</i> -Infektionen	59
3.1.2	Einfluss der CTLA-4-Blockade auf Parasitämie und Überleben	62
3.1.3	Einfluss der CTLA-4-Blockade auf klinische Parameter	64
3.1.4	Verstärkte T-Zellaktivierung nach der CTLA-4-Blockade	65
3.1.5	Gesteigerte Zytokinproduktion nach der CTLA-4-Blockade	67
3.2	Die Funktion von BTLA bei der T-Zellregulation im Verlauf der PbA-Infektion	68
3.2.1	Klonierung und Expression des BTLA-Ig-Fusionsproteins	68
3.2.2	Bindung von BTLA-Ig an den Liganden HVEM <i>in vitro</i>	72
3.2.3	Inhibition der BTLA/HVEM-vermittelten T-Zellregulation durch BTLA-Ig.....	74
3.2.4	Kein Einfluss von BTLA-Ig auf die T-Zellsuppression durch T _{reg}	76
3.2.5	Charakterisierung des Anti-BTLA-Antikörpers 6A6	77
3.2.6	Induktion von BTLA im Verlauf der <i>P. berghei</i> ANKA-Infektion	79
3.2.7	Infiltration von BTLA ⁺ T-Zellen in Leber und Gehirn	81

3.2.8	Einfluss von BTLA-Ig auf die Inzidenz an zerebraler Malaria	84
3.2.9	Einfluss des Anti-BTLA-Antikörpers 6A6 auf die Inzidenz an CM	86
3.2.10	Reduktion der T-Zellsequestration im Gehirn nach Anti-BTLA-Behandlung ...	87
3.2.11	Reduzierte pro-inflammatorische Immunantwort durch anti-BTLA 6A6	87
3.2.12	Kein Einfluss auf die Expression von ICAM-1 durch anti-BTLA 6A6	90
3.2.13	Keine systemische Immunsuppression nach Anti-BTLA-Behandlung	91
3.2.14	PbA-Infektion von HVEM ^{-/-} -Mäusen	93
3.2.15	Einfluss von anti-BTLA 6A6 auf die T-Zellinfiltration in die Leber	96
4	Diskussion	97
4.1	Einfluss der CTLA-4-Blockade auf den Verlauf der <i>P. yoelii</i> -Infektionen	97
4.2	Klonierung, Expression und Charakterisierung des BTLA-Ig-Fusionsproteins	100
4.3	Induktion von BTLA im Verlauf der PbA-Infektion	102
4.4	Einfluss von anti-BTLA 6A6 auf die Inzidenz an zerebraler Malaria	104
4.5	PbA-Infektion von HVEM ^{-/-} -Mäusen	108
4.6	Ausblick: Monoklonale Antikörper und Ig-Fusionsmoleküle als Therapie?	109
5	Zusammenfassung	112
6	Literatur	114
7	Anhang	132

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus Zellen und löslichen Mediatoren, die in aufeinander abgestimmter Weise den Organismus vor pathogenen Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren) schützen. Bei den höheren Vertebraten setzt sich das Immunsystem aus der angeborenen und der adaptiven Immunität zusammen (Übersicht bei Janeway et al., 2001). Dabei stellt die angeborene Immunantwort den phylogenetisch älteren Teil des Immunsystems dar, der einen unspezifischen Schutz gegen Pathogene vermittelt. Zu den Schutzmechanismen zählen die Epithelien der Haut und Schleimhäute, die ein Eindringen von Pathogenen mechanisch, chemisch (antimikrobielle Peptide und Enzyme) und mikrobiologisch (Mikroflora des Darms) verhindern. Daneben bildet der alternative Weg der Komplementaktivierung einen weiteren Bestandteil der angeborenen Immunität, der durch spontane Spaltung des Komplementfaktors C3 ausgelöst wird und zur Opsonisierung von Pathogenen führt. Phagozytierende Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten erkennen über spezifische Rezeptoren (Scavenger-Rezeptor, Mannose-Rezeptor, Toll-Rezeptoren) Pathogene anhand von konservierten Strukturen (u.a. Lipopolysaccharid oder Flagellin bei Bakterien, doppelsträngige RNA-Intermediate bei Viren). Nach der Aufnahme der Pathogene verstärken sie die Immunreaktion durch Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen. Die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) stellen aufgrund ihrer zytotoxischen Aktivität eine weitere wichtige Komponente des unspezifischen Schutzes dar, weil sie virusinfizierte Zellen eliminieren können. Über die Produktion von Chemokinen und verschiedenen Zytokinen am Ort der Entzündung (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) wirken zelluläre und humorale Komponenten der angeborenen Immunantwort zusammen. Hinzu kommt, dass die unspezifische Immunabwehr die adaptive Immunität einleitet, weil dendritische Zellen (DCs) und zu einem geringeren Maß auch Makrophagen als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) fungieren.

1.1.2 Die adaptive Immunität

Die spezifisch erworbene (adaptive) Immunität beruht auf der Aktivität der antigenspezifischen B- und T-Lymphozyten und den von ihnen freigesetzten Effektormolekülen. Die Lymphozyten werden wie eine Vielzahl anderer Zellen aus den im Knochenmark vorhandenen pluripotenten Stammzellen gebildet (Lemischka et al., 1986). Während die B-Zellen bis zur vollständigen Reifung im Knochenmark verbleiben, wandern T-Zellvorläufer ab der 13. Entwicklungswoche in den Thymus und reifen dort. Nur ein geringer Teil der Lymphozyten zirkuliert in Blut und

Lympe, während die überwiegende Zahl in den lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques, Tonsillen) lokalisiert ist. An diesen Orten finden die Interaktionen zwischen APCs und T-Zellen statt, die letztlich zur Ausbildung der adaptiven Immunantwort führen.

Die zelluläre Immunantwort wird von den T-Zellen vermittelt, die zunächst im Thymus aus den eingewanderten Vorläuferzellen heranreifen. In den Thymozyten finden Umlagerungen in den Keimbahngen statt, wobei die Diversität der Antigenrezeptoren (T-Zell-Rezeptoren, TCR) durch somatische Rekombination zustande kommt (Tonegawa, 1983). Nur ein geringer Teil der Thymozyten überlebt den anschließenden Selektionsprozess, der sich in positive und negative Selektion aufteilt. Bei der positiven Selektion werden T-Zellen angereichert, die über ihren TCR körpereigene Haupt-Histokompatibilitäts-Antigene (MHC-Moleküle) erkennen (Chidgey et al., 2001). Dieser als MHC-Restriktion bezeichnete Mechanismus der Antigenerkennung ermöglicht den T-Zellen die Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst. Bei der negativen Selektion werden alle hochaffinen T-Zellen im Thymus eliminiert, um autoreaktive und daher potenziell bedrohliche T-Zellen zu entfernen (Sprent et al., 2002). T-Zellen erkennen über ihren TCR Proteine nur, wenn diese zuvor von APCs prozessiert wurden und ihnen als Peptidfragmente an das passende MHC gebunden präsentiert werden. Der heterodimere TCR, der bei den meisten T-Zellen aus einer α - und einer β -Kette besteht (eine kleine Subpopulation der T-Zellen trägt einen $\gamma\delta$ -TCR), ist mit einem Korezeptor assoziiert. Anhand der Korezeptoren erfolgt eine Einteilung der T-Zellen in zwei Subklassen: $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen. $CD4^+$ T-Zellen erkennen Peptidantigene im Komplex mit MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche von professionellen APCs. Da die Expression der MHC-II-Moleküle auf APCs (DCs, Makrophagen und B-Zellen) beschränkt ist, können $CD4^+$ T-Zellen nur durch sie aktiviert werden (König, 2002). Anhand ihres Zytokinrepertoires lassen sich $CD4^+$ T-Zellen in T_H1 - und T_H2 -Zellen differenzieren. Während dabei aktivierte T_H1 -Zellen pro-inflammatorische Zytokine wie $IFN-\gamma$ oder $TNF-\alpha$ sezernieren, produzieren T_H2 -Zellen nach ihrer Aktivierung vor allem IL-4, IL-5 und IL-10 und unterstützen so die Antikörpersekretion von B-Zellen. Daher begünstigen T_H1 -Zellen besonders die zelluläre Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, wohingegen T_H2 -Zellen bei der Beseitigung extrazellulärer Erreger mitwirken. Weil $IFN-\gamma$ die T_H2 -Differenzierung hemmt und umgekehrt IL-4 und IL-10 die Entwicklung von T_H1 -Zellen inhibieren, wird die T_H1/T_H2 -Differenzierung auch durch Rückkopplungseffekte stabilisiert (O'Garra, 1998).

Im Gegensatz zu $CD4^+$ T-Zellen, die vor allem der Aktivierung der zellulären und humoralen Immunantwort dienen, besteht die Funktion der zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen in der Abtötung von virusinfizierten Zellen und maligne entarteten Körperzellen. Über den TCR der $CD8^+$ T-

Zellen werden Peptidfragmente erkannt, die ihnen von MHC-I-Moleküle präsentiert werden. Die Peptide entstammen Proteinen aus dem Zytosol und werden von dort in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Da MHC-I-Moleküle auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, können alle virusinfizierten Zellen den zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen virale Peptide präsentieren und so von diesen eliminiert werden. Das Abtöten der Zielzellen durch $CD8^+$ T-Zellen erfolgt dabei durch Freisetzung von zytolytischen Granula oder durch Induktion der Apoptose in den Zielzellen über den Fas-Liganden.

1.1.3 Kostimulation

Für naive T-Zellen ist neben dem TCR-vermittelten Signal durch die Präsentation von MHC-gebundenen Peptiden ein zweites Signal der APC notwendig, um Proliferation, IL-2-Sekretion und Differenzierung zu T-Effektorzellen auszulösen. Fehlt dieses kostimulatorische Signal, wird in den betreffenden T-Zellen eine Anergie induziert. Auf diese Weise wird die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entgangen sind, verhindert. Dadurch bleibt die Toleranz gegenüber Autoantigenen, die in der Peripherie exprimiert werden, erhalten. Weil die Expression kostimulatorischer Moleküle nahezu ausschließlich professionellen APCs des Immunsystems vorbehalten ist, können nur sie den naiven T-Zellen das Signal zur Proliferation geben. APCs werden nach Kontakt mit einem Pathogen oder einer inflammatorisch wirkenden Substanz aktiviert (Reis e Sousa, 2004) und wandern dann in die T-Zellareale der regionalen Lymphknoten ein. Auf dem Weg dorthin regulieren sie ihre kostimulatorischen Moleküle hoch und sezernieren verschiedene Chemokine und Zytokine (Banchereau et al., 2000; Cella et al., 1997). Ein essentielles kostimulatorisches Signal für die Aktivierung einer naiven T-Zelle ist dabei die Interaktion von CD28, das konstitutiv als Homodimer auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, mit den strukturell verwandten Molekülen CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2). Diese gehören zur B7-Familie und werden von professionellen APCs, aber auch von aktivierten T-Zellen exprimiert (Übersicht bei June et al., 1994). Die Bindung von CD28, das ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie darstellt, an CD80/CD86 löst eine anhaltende IL-2-Produktion in T-Zellen aus (Yashiro et al. 1998). Letztlich wird so die Proliferation der T-Zellen ausgelöst und gleichzeitig verhindert, dass die T-Zellen anerg werden oder in ihnen eine Apoptose induziert wird. Neben den kostimulatorischen Molekülen existieren jedoch auch Koinhibitoren (CTLA-4, PD-1, BTLA), die an der Regulation von T-Zellantworten mitwirken und T-Effektorfunktionen inhibieren. Sie sind von essentieller Bedeutung für die Beendigung von Immunantworten und die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz.

1.1.4 CTLA-4 / B7.1 und B7.2

Das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen (CTLA-4, CD152) und CD28 sind miteinander verwandte Proteine, die von T-Zellen exprimiert werden. Beide gehören zur Immunglobulin-Superfamilie, sind etwa 75 % homolog zueinander und liegen als Homodimere vor (Übersicht bei Carreno et al., 2002; Chen, 2004; Coyle et al., 2001). CTLA-4 und CD28 binden mit B7.1 und B7.2 (CD80 und CD86) die gleichen Liganden, die von professionellen APCs exprimiert werden, wobei die Affinität von CTLA-4 zu diesen Liganden allerdings 20 bis 100fach höher ist (Collins et al., 2002). Neben APCs exprimieren auch aktivierte T-Zellen B7.1 und B7.2, so dass auch sie über CD28/CTLA-4 mit anderen T-Zellen interagieren und so deren Effektorfunktionen regulieren können (Sansom et al., 1993; Paust et al., 2004). Während die B7/CD28-Interaktion als kostimulatorisches Signal für die initiale T-Zellaktivierung essentiell ist, wirkt CTLA-4 antagonistisch zu CD28 und führt nach der Bindung an B7-Moleküle zum Zellzyklus-Arrest der T-Zellen (Abb. 1.1). Die Abschaltung der T-Zellen findet dabei vor allem in den sekundären lymphatischen Organen statt (Carter et al., 2003). Für die Funktion von CTLA-4 ist bedeutsam, dass die Expression von CD28 und CTLA-4 differentiell reguliert wird. Während CD28 konstitutiv auf der Oberfläche von naiven und aktivierten T-Zellen vorhanden ist, wird CTLA-4 in stimulierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen *de novo* transkribiert und liegt aufgrund der schnellen Endozytose von CTLA-4 nur in geringen Mengen auf der Zelloberfläche vor (Alegre et al., 1996).

Die Bedeutung von CTLA-4 für die Regulation der Effektorfunktionen von T-Zellen wurde mit agonistischen Anti-CTLA-4-Antikörpern gezeigt, die zu einer reduzierten Proliferation und IL-2-Sekretion führten (Krummel et al., 1995; Walunas et al., 1996). CTLA-4 wird nicht nur von aktivierten T-Zellen exprimiert, sondern auch konstitutiv von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen (T_{reg}) (Takahashi et al., 2000; Read et al., 2000). Neben Effektor-T-Zellen spielen regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle im Immunsystem, da sie Effektor-T-Zellantworten begrenzen und damit

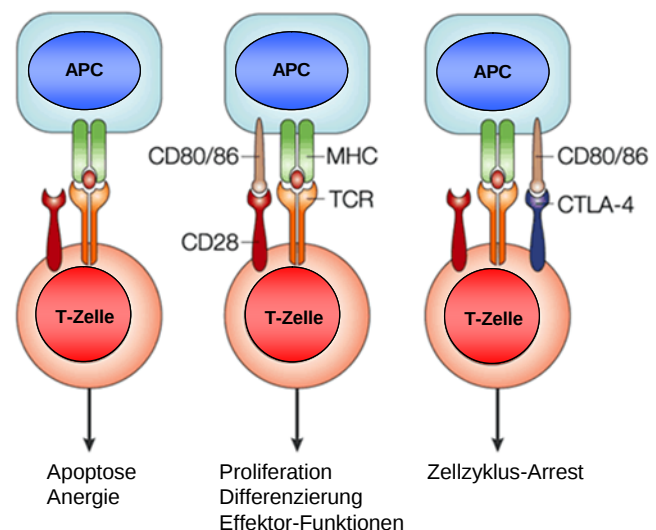


Abb. 1.1:
Kostimulation über CD28 / Koinhibition über CTLA-4

In Abwesenheit von Kostimulation über CD80/86 führt MHC-Antigenpräsentation durch APCs zu T-Zellanergie. T-Effektorfunktionen werden nur bei CD80/86-Interaktion mit CD28 ausgelöst. Bindung von CD80/86 an CTLA-4 auf der T-Zelle führt dagegen zu Zellzyklus-Arrest (nach Alegre et al., 2001).

essentiell sind für die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz. Dabei werden die natürlich vorkommenden von den induzierten T_{reg} unterschieden. Während die natürlich vorkommenden T_{reg} ihren Ursprung im Thymus haben und zentraler Bestandteil der peripheren Toleranz sind, entstehen die induzierten T_{reg} im Verlauf der Immunantwort und wirken T-Effektorfunktionen entgegen (Sakaguchi, 2005). Ein spezifischer Marker für T_{reg} ist dabei der Transkriptionsfaktor Foxp3 (forkhead/winged helix transcription factor), der ein zentraler Regulator bei der Differenzierung von T_{reg} ist (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Belege, dass CTLA-4 bei der Suppression von T-Effektorfunktionen durch T_{reg} von Bedeutung ist, erbrachten Experimente mit blockierenden Anti-CTLA-4-Antikörpern, die eine Suppression verhindern (Zheng et al., 2004; Tang et al., 2004; Loser et al., 2005). Allerdings existieren auch Studien, in denen gezeigt wurde, dass T_{reg} unabhängig von CTLA-4 T-Zellantworten modulieren können (Kataoka et al., 2005; Levings et al., 2001; Thornton et al., 2004). Neben der Inhibition der T-Zelle nach der CTLA-4-Bindung an CD80/CD86 kommt es auch zur Signaltransduktion in den APCs, die letztlich zu einer verstärkten Expression der Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) führt (Grohmann et al., 2003; Orabona et al., 2005). Dieses Enzym baut die essentielle Aminosäure Tryptophan ab, wobei als Metabolit L-Kynurenin entsteht, das immunsuppressiv wirkt (Munn et al., 2002). Zusammenfassend werden die T-Effektorfunktionen also von T_{reg} , APCs und aktivierten T-Zellen moduliert (Abb. 1.2).

Die Bedeutung von CTLA-4 für die Regulation von Immunantworten *in vivo* dokumentiert der Phänotyp von CTLA-4^{-/-}-Mäusen, die aufgrund einer polyklonalen Lymphozytenaktivierung eine schwere Immunpathologie zeigen (Chikuma et al., 2003). Diese wird von einer Splenomegalie und Infiltration von T-Zellen in die peripheren Organe begleitet, so dass also CTLA-4 für die Homöostase des Immunsystems und die Kontrolle von autoreaktiven T-

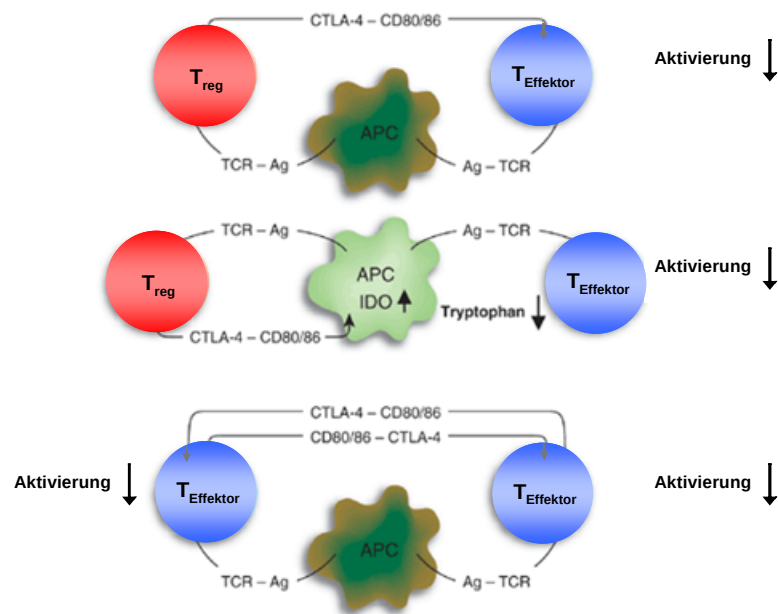


Abb. 1.2:

CTLA-4-abhängige Regulationsmechanismen von T-Effektorantworten

Die Modulation von T-Zellantworten ist sowohl direkt durch T_{reg} , indirekt über APCs sowie durch Abschaltung von T-Zellen durch andere aktivierte T-Effektorzellen möglich (nach von Boehmer, 2005).

Zellen essentiell zu sein scheint. Der Phänotyp der CTLA^{-/-}-Mäuse ist dabei vergleichbar mit dem von Foxp3^{-/-} („Scurfy“)-Mäusen, die aufgrund der Foxp3-Defizienz keine regulatorischen T-Zellen besitzen (Khattari et al., 2003). Experimente an Mäusen, in denen durch eine chronische Antigenexposition Anergie in den T-Zellen induziert wurde, dokumentieren ebenfalls, dass CTLA-4 wichtig ist, um die periphere Toleranz aufrecht zu erhalten. Dabei wurde die Anergie der T-Zellen durch CTLA-4-Blockade durchbrochen (Eagar et al., 2004).

Neben CTLA-4 ist TGF- β ein wichtiger Mediator, der die Funktion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen beeinflusst. Zwar haben CTLA-4^{-/-}-Mäuse T_{reg}, die Foxp3 exprimieren (Tang et al., 2004), und Foxp3⁺CTLA-4⁺ T_{reg} sind auch in TGF- β ^{-/-}-Mäusen vorhanden (Sullivan et al., 2001; Mamura et al., 2004). Zahlreiche Studien zeigen jedoch, dass TGF- β positiv auf die Foxp3-Expression wirkt (Chen et al., 2003; Zheng et al., 2002; Zheng et al., 2004). Neben der Foxp3-Induktion durch TGF- β *in vitro* reguliert es *in vivo* ebenfalls dessen Expression hoch (Huber et al., 2004; Schramm et al., 2004). In neueren Studien wurde beschrieben, dass TGF- β differentiell auf die natürlich vorkommenden T_{reg} und induzierte T_{reg} wirkt. So ist die Anzahl peripherer T_{reg} und deren Foxp3-Expression in TGF- β ^{-/-}-Mäusen stark reduziert, während die Foxp3-Expression der T_{reg} im Thymus unverändert bleibt (Marie et al., 2005). Der Zusammenhang zwischen der Expression von CTLA-4 und Foxp3 wurde auch durch retrovirale Transduktion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit Foxp3 belegt, weil CTLA-4 auf den transduzierten T-Zellen induziert wurde (Yagi et al., 2004; Hori et al., 2003). Insgesamt scheint also deutlich zu sein, dass CTLA-4 eine funktionelle Bedeutung in T_{reg} hat. So haben genetische Analysen von Polymorphismen in der 3'-untranslatierten Region des humanen CTLA-4-Gens gezeigt, dass Punktmutationen gehäuft bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Graves disease, Hypothyreose, Typ-1-Diabetes u.a.) auftreten (Ueda et al., 2003). Da CTLA-4 zudem von aktivierten T-Zellen exprimiert wird und notwendig für deren Abschaltung ist, spielt es auch bei der Beendigung einer Immunantwort eine wichtige Rolle.

Die Funktion von CTLA-4 bei der Regulation von Immunantworten gegen Pathogene ist in zahlreichen Infektionsmodellen untersucht worden (Martins et al., 2004; Watanabe et al., 2004; Graefe et al., 2004). Im Verlauf der Malariaerkrankung scheint CTLA-4 dabei als Koinhibitor von Bedeutung zu sein. In einer Patientenstudie wurde nachgewiesen, dass während einer Infektion mit *P. falciparum* die CTLA-4-Expression auf humanen CD4⁺ T-Zellen signifikant erhöht ist (Schlotmann et al., 2000). Die CTLA-4-Expression korrelierte dabei mit anderen Parametern für die Schwere des Krankheitsverlaufes (Braun et al., 2003). Im *P. berghei* ANKA-Mausmodell wurde die Kinetik der CTLA-4-Expression in der Blutphase der Malaria untersucht,

wobei diese am neunten Tag nach der Infektion ihren Höhepunkt erreichte (etwa 10 % aller CD4⁺-T-Zellen waren CD4⁺CTLA-4⁺). Die Applikation eines blockierenden Anti-CTLA-4-Antikörpers führte bei nachfolgender Infektion mit *P. berghei* ANKA-infizierten Erythrozyten zu einer höheren Inzidenz von zerebraler Malaria (Jacobs et al., 2002). Zudem wurde durch eine CTLA-4-Blockade die im Verlauf der Malaria auftretende Suppression der T-Effektorfunktionen aufgehoben. Daneben induzierte eine CTLA-4-Blockade eine verstärkte Immunpathologie in der Leber, die mit einer erhöhten Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und IFN- γ verbunden war (Jacobs et al., 2004). Die T-Zellaktivität bei einer Immunantwort gegenüber Infektionen wird also offenbar über die Expression von CTLA-4 reguliert, wobei CTLA-4-abhängige Mechanismen überschießende Immunantworten und daraus resultierende Immunpathologie verhindern.

1.1.5 BTLA / HVEM

Vor kurzem wurde als weiteres koinhibitorisches Molekül neben CTLA-4 und PD-1 der B- und T-Lymphozyten-Attenuator (BTLA) identifiziert (Watanabe et al., 2003). Das murine BTLA ist ein Typ-I-Transmembranprotein, das 306 Aminosäuren umfasst und ein Signalpeptid, mehrere N-Glykosylierungsstellen, eine Ig-Domäne, eine Transmembran- und eine intrazelluläre Domäne aufweist. Diese besteht aus etwa 100 Aminosäuren, von denen drei Tyrosinreste (Y226, Y257, Y282) reversibel phosphoryliert werden können. Während phosphoryliertes Y226 eine Grb2-Bindungsstelle darstellt, handelt es sich bei den anderen beiden Tyrosinresten um ein ITIM- und ITSM-Motiv. Neben dieser BTLA-Isoform existiert eine BTLA-Spleißvariante (BTLAs), der das für die Ig-Domäne codierende Exon 2 fehlt. Als BTLA-Ligand wurde zunächst das zur B7-Superfamilie gehörende Molekül B7-H4 (in der Literatur auch als B7x und B7S1 bezeichnet) beschrieben (Watanabe et al., 2003). Dabei wurde B7-H4 durch Homologiesuche nach IgV- und IgC-Domänen von B7-Familienmitgliedern und nachfolgendes Screening einer cDNA-Bank aus Plazentagewebe gefunden (Sica et al., 2003). Im Gegensatz zu den übrigen Mitgliedern der B7-Familie ist B7-H4 kein Transmembranprotein, sondern mit der Membran über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker verbunden (Prasad et al., 2003). Phylogenetische Untersuchungen am murinen B7-H4 deuten auf Verwandtschaft zum B7-H3-Molekül hin (Zang et al., 2003).

Spätere Untersuchungen zeigten allerdings, dass BTLA nicht an B7-H4, sondern HVEM (herpes virus entry mediator) bindet, das ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie ist (Sedy et al., 2005; Gonzalez et al., 2005). Zuerst wurde HVEM dabei als Rezeptor für das

Herpes simplex Virus Typ 1 beschrieben, da es dessen Bindung an die Zelle und damit deren Infektion ermöglicht (Montgomery et al., 1996). Neben BTLA weist HVEM zwei weitere Bindungspartner auf: LT- α und LIGHT (Mauri et al., 1998). Die Bindung von BTLA an HVEM ist ungewöhnlich, da es die erste nachgewiesene Interaktion zwischen einem Mitglied der CD28-Familie (BTLA) mit einem zu der TNFR-Familie gehörenden Protein (HVEM) darstellt (Abb. 1.3). Anhand der Strukturaufklärung von BTLA-HVEM-Kokristallen durch die Röntgenstrukturanalyse wurde gezeigt, dass die Bindungsstellen für BTLA und LIGHT an HVEM nicht identisch sind, so dass deren gleichzeitige Bindung unter Bildung eines ternären Komplexes möglich scheint (Compaan et al., 2005; vgl. Abb. 1.4).

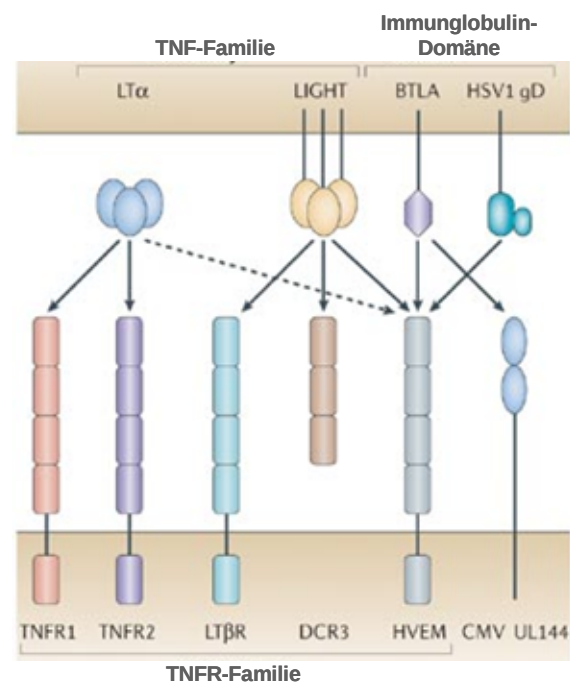


Abb. 1.3:

Interaktionen zwischen HVEM, BTLA und LIGHT

Die Abbildung zeigt die Bindung von HVEM (TNFR-Familie) an LIGHT und LT- α (TNF-Familie). Zudem bindet HVEM mit BTLA und dem Glykoprotein D von HSV1 zwei Proteine aus der Immunglobulin-Superfamilie (nach Murphy et al., 2006).

Durch Kreuzvernetzung von BTLA mit dem TCR wurde bestätigt, dass es sich bei BTLA um einen Koinhibitor handelt, weil dessen phosphorylierte intrazelluläre Domäne mit den Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 assoziiert und dadurch die IL-2-Sekretion von T-Zellen inhibiert wird (Watanabe et al., 2003). Die Stimulation von T-Zellen mit anti-CD3-Antikörper in Gegenwart eines agonistischen Anti-BTLA-Antikörpers führte zu einer verringerten CD25-Expression und IL-2-Produktion, während die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 unverändert war (Krieg et al., 2005). In gleicher Weise bewirkte die BTLA-Ligation durch HVEM die intrazelluläre Phosphorylierung von BTLA und hemmte so die antigeninduzierte T-Zellproliferation (Sedy et al., 2005). Hinsichtlich der BTLA-Signaltransduktion wurde nachgewiesen, dass BTLA-Peptide, die das phosphorylierte N-terminale Tyrosin (Y226) enthalten, neben Grb2 auch die p85-Untereinheit der PI3-Kinase binden (Gavrieli et al., 2003).

Die funktionelle Analyse von BTLA wird dadurch erschwert, dass BTLA von einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert wird. Neben B- und T-Zellen weisen auch DCs und Makrophagen BTLA auf. Des Weiteren exprimieren Thymozyten BTLA als Reifungsmarker während der positiven Selektion im Thymus (Han et al., 2004). Auch B-Zellen exprimieren BTLA im Verlauf ihrer

Reifung im Pro- und Prä-B-Zellstadium (Hurchla et al., 2005). Eine noch höhere Expression des Proteins wurde in unreifen B-Zellen ($B220^+ IgM^{hoch}$) gefunden, die höchste Expressionsrate in reifen B-Zellen. Dabei liegt die Expression von BTLA auf der Oberfläche von B-Zellen etwa 10fach höher als bei T-Zellen (Han et al., 2004). Während LPS-stimulierte B-Zellen BTLA herunterregulieren, führt die T-Zellaktivierung zu einer gesteigerten Expression von BTLA. In einer Studie wurde gezeigt, dass BTLA ausschließlich von polarisierten T_H1 -Effektorzellen, nicht jedoch von T_H2 -Zellen exprimiert wird (Loyet et al., 2005); allerdings wurde in einer anderen Arbeit eine vergleichbare BTLA-Expression in T_H1 - und T_H2 -T-Zellklonen beschrieben (Otsuki et al., 2006). Zudem wurde eine erhöhte Expression von BTLA in T-Zellen nachgewiesen, in denen durch eine chronische Stimulation mit Antigen eine Anergie induziert worden war (Hurchla et al., 2005). Vom koinhibitorischen Molekül PD-1 ist bekannt, dass es von T-Zellen nach chronischer Antigenexposition verstärkt exprimiert wird und an deren Abschaltung beteiligt ist (Barber et al., 2005). BTLA wirkt demnach vermutlich ebenfalls an der Induktion von Anergie in T-Zellen und der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz mit. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass BTLA auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des immunologischen Gedächtnisses spielt, da BTLA-defiziente Mäuse eine größere Zahl an $CD8^+$ Memory-T-Zellen aufweisen (Krieg et al., 2007).

LIGHT wird in Analogie zu BTLA in T-Zellen nach deren Aktivierung induziert (Morel et al., 2001; Shi et al., 2002). Unreife DCs exprimieren ebenfalls LIGHT, regulieren dessen Expression nach LPS- oder CD40-induzierter Reifung jedoch herab (Tamada et al., 2000). Im Gegensatz dazu wird HVEM von naiven T-Zellen in hohem Maße exprimiert, im Verlauf der Aktivierung herabreguliert, bevor es gegen Ende der Aktivierung wieder verstärkt exprimiert wird (Morel et al., 2000). Murine B-Zellen weisen nur eine geringe Oberflächenexpression von HVEM auf, wohingegen es auf humanen naiven B-Zellen und Memory-B-Zellen in hohem Maße präsent ist

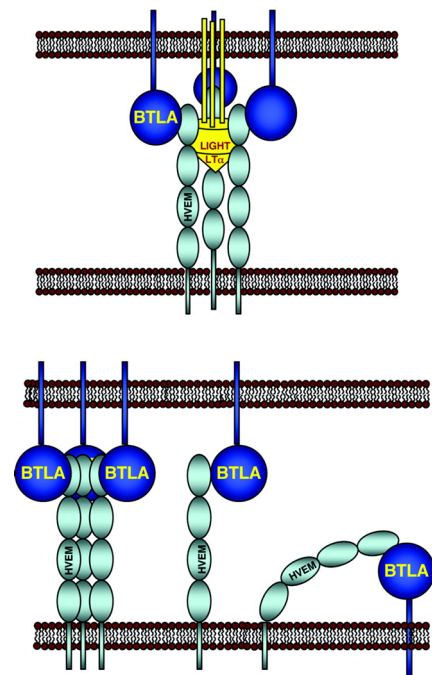


Abb. 1.4:
Modell der BTLA/LIGHT/HVEM-Interaktion
HVEM bindet als Trimer an LIGHT (Trimer) bzw. BTLA (Monomer). Da deren Bindungsstellen an HVEM verschieden sind, ist die Bildung eines ternären Komplexes möglich (nach Compaan et al., 2005).

(Duhen et al., 2004; Harrop et al., 1998; Wang et al., 2005). Stimulation von humanen B-Zellen mit LIGHT führt zu einer verringerten HVEM-Expression (Duhen et al., 2004). Die bisher publizierten Daten dokumentieren somit, dass die HVEM-Expression in naiven/ruhenden T- und B-Zellen hoch ist und nach ihrer Aktivierung verringert wird.

Während die koinhibitorische Interaktion zwischen HVEM und BTLA die T-Zellaktivierung hemmt, wirkt die Bindung von HVEM an LIGHT kostimulatorisch. Entsprechend reduziert die Blockade der HVEM-Bindung an LIGHT die T-Zellproliferation und Zytokinsekretion (Harrop et al., 1998). Weitere Belege für die Funktion von LIGHT als Kostimulator erbrachten Studien, bei denen HVEM durch LIGHT ligiert wurde. So löste die HVEM-Ligation durch LIGHT in einer gemischten Lymphozytenreaktion, bei der T-Zellen in Gegenwart von allogenen APCs kultiviert wurden, und in anti-CD3-stimulierten T-Zellen verstärkte T-Effektorfunktionen aus (Harrop et al., 1998; Tamada et al., 2000; Yu et al., 2004).

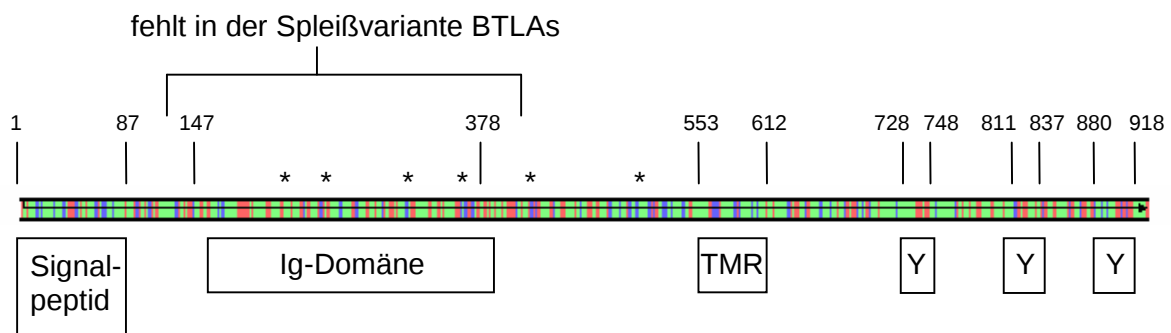


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der BTLA-cDNA und der von ihr codierten Proteindomänen

Die Abbildung zeigt den codierenden Bereich der BTLA-cDNA, der 918 Nukleotide umfasst. BTLA besteht also aus 306 Aminosäuren und enthält neben einem N-terminalen Signalpeptid eine Ig-Domäne, Transmembranregion (TMR) sowie drei intrazelluläre Tyrosinmotive (Y). Davon stellt das N-terminale Tyrosin eine Grb2-Bindungsstelle dar, während es sich bei den anderen beiden um ein ITIM- und ITSM-Motiv handelt. Mit einem (*) markiert sind potenzielle N-Glykosylierungsstellen. Eine weitere BTLA-Isoform (BTLAs) der die Ig-Domäne fehlt, entsteht aus einer Spleißvariante (nach Han et al., 2004).

1.1.6 Mausmodelle für LIGHT, BTLA und HVEM

Mit Hilfe von transgenen Mäusen, die konstitutiv LIGHT in Thymozyten und reifen T-Zellen überexprimieren, wurde die Bedeutung von LIGHT als Kostimulator *in vivo* aufgeklärt. So findet in diesem Mausstamm die klonale Deletion von Thymozyten während der T-Zellentwicklung verstärkt statt und überlebende T-Zellen, die in die Peripherie gelangen, proliferieren stärker als Wildtyp-T-Zellen (Wang et al., 2001). In einem transgenen Mausstamm, in dem die LIGHT-Überexpression auf periphere T-Zellen beschränkt ist, waren ebenso T-Zell-Hyperproliferation,

die Infiltration von T-Zellen in periphere Organe und IgA-Nephropathie feststellbar (Shaikh et al., 2001; Wang et al., 2004). Erwartungsgemäß waren T-Zellen in LIGHT-defizienten Mäusen dagegen durch *in vivo*-Stimulation mit Concanavalin-A (ConA) im Vergleich zum Wildtyp schlechter aktivierbar, was ebenfalls die kostimulatorische Funktion von LIGHT bestätigt (Scheu et al., 2002; Liu et al., 2003).

Zwei BTLA-defiziente Mausstämme sind bisher generiert worden: BTLA^{-/-}-Mäuse, bei denen die gesamte für BTLA codierende DNA-Region deletiert wurde (Watanabe et al., 2003) und solche, bei denen nur das den Translationsstart enthaltende Exon 2 zerstört wurde (Han et al., 2004). In letztgenanntem Mausstamm wird jedoch noch die BTLA-Spleißvariante (BTLAs) exprimiert, der das Exon 2 fehlt. In BTLA^{-/-}-Mäusen ohne funktionelles BTLA wurden keine Defekte in der T- und B-Zellentwicklung beobachtet. Allerdings proliferierten BTLA^{-/-}-T-Zellen nach Stimulation durch anti-CD3 stärker als Wildtyp-T-Zellen, ebenso B-Zellen nach einer Stimulation durch Anti-IgM (Watanabe et al., 2003). Mit der gesteigerten B-Zellproliferation korrelierte ein Anstieg der IgG₁-, IgG_{2a}- und IgG_{2b}-Antikörperproduktion nach Immunisierung von BTLA^{-/-}-Mäusen mit Nitrophenol-konjugiertem Keyhole-Limpet-Hämocyanin (NP-KLH). In einem Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zeigten BTLA-defiziente Mäuse einen schwereren Krankheitsverlauf, so dass BTLA als negativer Regulator in diesem Autoimmunitäts-Modell von Bedeutung ist (Watanabe et al., 2003). In einem murinen Allergie-Modell, in dem eine Sensibilisierung und nachfolgender intranasaler Challenge der Mäuse mit OVA stattfand, waren in der Lunge von BTLA^{-/-}-Mäusen inflammatorische Prozesse über einen längeren Zeitraum nachweisbar (Deppong et al., 2006). Dieser Befund deutet darauf hin, dass BTLA nicht nur beim T-Zell-Priming wichtig ist, sondern auch zu späteren Zeitpunkten bei der Regulation von T-Effektorfunktionen in der Peripherie und der damit verbundenen Beendigung inflammatorischer Prozesse in Geweben und Organen. In murinen Transplantations-Modellen scheint BTLA als Koinhibitor ebenfalls essentiell zu sein. Während Wildtyp-Mäuse allogene Herztransplantate mehr als 100 Tage tolerieren, werden diese in BTLA^{-/-}-Mäusen bereits nach kurzer Zeit abgestoßen (Tao et al., 2005). Im Vergleich zum Koinhibitor PD-1 wird BTLA in den Transplantaten stärker exprimiert, so dass der BTLA-abhängigen Regulation bei diesem Vorgang im Vergleich zu PD-1 offenbar die größere Bedeutung zukommt.

Bevor die koinhibitorische HVEM/BTLA-Interaktion bekannt war, wurde eine ausschließlich kostimulatorische Funktion von HVEM aufgrund von dessen Bindung an LIGHT postuliert. Erste Erkenntnisse, die diese Hypothese widerlegten, waren die gesteigerte Proliferation und Zytokinsekretion von HVEM^{-/-} T-Zellen nach ConA- und anti-CD3-Stimulation (Wang et al.,

2005). Auch sind HVEM^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sensitiver gegenüber ConA-Challenge und der Induktion von EAE, so dass *in vivo* neben der Interaktion zwischen HVEM und LIGHT auch die Bindung von HVEM an BTLA eine wichtige Rolle spielt.

Den bisherigen Arbeiten zufolge stellt BTLA also ein inhibitorisches Molekül auf T-Zellen dar, dessen einziger bislang nachgewiesener Ligand HVEM ist. Die Expression von BTLA und HVEM, aber auch LIGHT auf einer Vielzahl von Zelltypen legt die Vermutung nahe, dass Interaktionen zwischen diesen drei Molekülen bei der Regulation vieler immunologischer Vorgänge eine Rolle spielen können. Die Bedeutung der BTLA-abhängigen Regulation wurde bereits in murinen Allergie-, Autoimmunitäts- und Transplantations-Modellen nachgewiesen. Dagegen wurde die Funktion von BTLA in Infektionsmodellen bislang noch nicht untersucht.

1.1.7 Weitere kostimulatorische/koinhibitorische Moleküle

Neben BTLA und CTLA-4 wurde PD-1 als weiteres Molekül beschrieben, das koinhibitorisch auf T-Zellen wirkt. Die wichtigste Funktion der Koinhibitoren besteht dabei in der Regulation einer Immunantwort gegen Fremdantigene und damit der Beeinflussung ihres Verlaufs (Sinclair, 1999). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Toleranzinduktion und wirken an der Steuerung der T_H1/T_H2-Differenzierung mit. Neben den koinhibitorischen Regulatoren existiert eine Reihe von Molekülen mit kostimulatorischer Funktion. Dazu zählen mit OX-40 (Ohshima et al., 1997) und 4-1BB (DeBenedette et al., 1997) zwei Mitglieder der TNF-Superfamilie, wohingegen ICOS zur CD28-Familie gehört (Hutloff et al., 1999). Eine Übersicht über wichtige kostimulatorische/koinhibitorische Moleküle der B7-Familie, ihre Rezeptoren und ihre Funktion ist in Tabelle I am Ende dieses Kapitels dargestellt.

PD-1:

Neben CTLA-4 und BTLA stellt PD-1 (= programmed death-1) das dritte bisher identifizierte koinhibitorische Molekül dar, das auf T-Zellen exprimiert wird. Es wurde zuerst als ein Molekül beschrieben, dessen Expression in einer T-Zelllinie aus dem Thymus durch apoptotische Stimuli hochreguliert wird (Ishida et al., 1992). Wie CTLA-4 gehört PD-1 zur CD28-Familie und weist 23 % Homologie zu CTLA-4 auf. PD-1 wird nicht nur auf T-Zellen induziert, sondern auch von aktivierten B-Zellen und Makrophagen exprimiert (Okazaki et al., 2002; Greenwald et al., 2005). Bei PD-1 handelt es sich um ein Transmembranprotein, das neben einem ITIM-Motiv ein ITSM-Motiv aufweist, über das durch die Rekrutierung der Phosphatase SHP-2 negative Signale ins

Innere der T-Zelle vermittelt werden können (Chemnitz et al., 2004). Im Gegensatz zu CTLA-4, das als Homodimer an CD28 bindet, liegt PD-1 als Monomer an der Zelloberfläche vor (Zhang et al., 2004). Dabei bindet PD-1 an zwei Liganden: PD-L1 (auch als B7-H1 bezeichnet) und PD-L2 (B7-DC), die aufgrund ihrer Homologie zu anderen Mitgliedern der B7-Familie identifiziert wurden (Dong et al., 1999; Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). Wie viele B7-Moleküle weisen auch die Typ-I-Transmembranproteine PD-L1 und PD-L2 IgV- und IgC-Domänen in der extrazellulären Region auf. Dabei wird PD-L1 konstitutiv von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und DCs exprimiert und nach der Aktivierung weiter hochreguliert (Yamazaki et al., 2002). Neben lymphoiden Zellen exprimieren auch Endothelzellen, β -Zellen im Pankreas und Mikroglia während einer Inflammation des Gehirns PD-L1 (Ansari et al., 2003; Liang et al., 2003; Salama et al., 2003). Im Gegensatz dazu ist die Expression von PD-L2 auf Makrophagen und DCs beschränkt (Ishida et al., 2002). Des weiteren wurde die Expression beider PD-1-Liganden auf Tumorzellen nachgewiesen, die aus Tumoren verschiedener Organe (Gehirn, Niere, Ovarien) stammten (Dong et al., 2002; Ohigashi et al., 2005). Dabei führt die Interaktion von PD-L1 mit PD-1 auf antigenspezifischen, gegen den Tumor gerichteten CD8⁺ T-Zellen zu deren Apoptose (Hirano et al., 2005).

PD-1 scheint zwei Funktionen im Rahmen der immunologischen Toleranz zu haben: Induktion und Aufrechterhaltung der Toleranz. Während PD-1-Liganden auf APCs autoreaktive T-Zellen in der Peripherie abschalten und dadurch Toleranz induzieren, verhindern sie auf parenchymalen Zellen eine Gewebszerstörung, indem sie die Effektorfunktionen von eingewanderten T-Zellen supprimieren (Übersicht bei Okazaki et al., 2006). Im Verlauf einer Immunantwort werden aktivierte CD8⁺ T-Zellen in der Leber abgeschaltet. In PD-L1^{-/-}-Mäusen akkumulieren zwar CD8⁺ T-Zellen in der Leber, ohne dass in ihnen jedoch Apoptose induziert wird, so dass es zu Leberpathologie kommt (Dong et al., 2004). Durch die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion wurden anerge T-Zellen, die zuvor mit DCs in Gegenwart von IL-10 stimuliert worden waren, wieder reaktiviert (Selenko-Gebauer et al., 2003). Auch im Verlauf viraler Infektionen wurde die Bedeutung von PD-L1 für die Induktion von T-Zell-Toleranz gezeigt (Kirchberger et al., 2005). Im Rahmen der murinen LCMV-Infektion wurden Effektorfunktionen von antigenspezifischen T-Zellen durch die PD-1-Blockade gesteigert, was zu einer effektiven Immunantwort führte (Barber et al., 2006). In der murinen *Schistosoma mansoni*-Infektion wurde nachgewiesen, dass der PD-1/PD-L1-Signalweg bei der Immunevasion dieses Parasiten eine Rolle spielt (Smith et al., 2004).

Die Funktion von PD-1 als Koinhibitor wurde erstmals durch den Phänotyp von PD-1^{-/-}-Mäusen dokumentiert, weil diese spontan eine Lupus-ähnliche Autoimmunerkrankung mit Arthritis und Glomerulonephritis entwickeln (Nishimura et al., 1999). Obwohl in zahlreichen Studien gezeigt wurde, dass durch Interaktion von PD-1 auf T-Zellen mit den Liganden PD-L1 oder PD-L2 T-Effektorfunktionen inhibiert werden, gibt es auch Arbeiten, die eine kostimulatorische Funktion der PD-1-Liganden andeuten (Dong et al., 1999; Tseng et al., 2001; Shin et al., 2005). So wurde in einem murinen Colitis-Modell die Infiltration von Leukozyten in die Darmschleimhaut durch Applikation eines blockierenden Anti-PD-L1-Antikörpers inhibiert und zugleich die Sekretion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α durch CD4⁺ T-Zellen in der Lamina propria reduziert (Kanai et al., 2003). Die Überexpression von PD-L1 auf Pankreas-Inselzellen führte zu einer beschleunigten Abstoßung von transplantierten Inselzellen und in einigen Mäusen zur spontanen Ausbildung eines autoimmunen Diabetes (Subudhi et al., 2004), so dass der PD-1/PD-L1-Signalweg offenbar auch in diesem Modell kostimulatorisch wirkt.

ICOS:

Bei ICOS (= inducible costimulator) handelt es sich um ein kostimulatorisches Molekül, das strukturell und funktionell mit CD28 verwandt ist, von T-Zellen jedoch nur nach Aktivierung exprimiert wird (Hutloff et al., 1999). Als Ligand für ICOS fungiert B7RP-1 (auch als B7h, LICOS oder ICOSL bezeichnet), das zur B7-Familie gehört und 20 % Sequenzhomologie zu B7.1 und B7.2 aufweist (Swallow et al., 1999; Ling et al., 2000). Dabei wird B7RP-1 vor allem von APCs konstitutiv exprimiert (Yoshinaga et al., 1999; Mages et al., 2000). Da ICOS von aktivierten T-Zellen in Keimzentren von Lymphknoten exprimiert wird, wurde postuliert, dass ICOS bei der Interaktion zwischen T- und B-Zellen eine Rolle spielt (Hutloff et al., 1999). Dies wurde durch den Phänotyp von ICOS^{-/-}-Mäusen bestätigt, die gestörte T-Helferzellfunktionen und reduzierte humorale Immunantworten aufweisen (Dong et al., 2001; McAdam et al., 2001). Daneben scheint ICOS für den Klassenwechsel während der Antikörpersekretion von Bedeutung zu sein, da ICOS^{-/-}-Mäuse reduzierte Serumspiegel an IgG₁ und IgE aufweisen (Tafari et al., 2001). Vergleichbare Immundefekte wurden auch in B7RP-1^{-/-}-Mäusen gefunden (Mak et al., 2003; Nurieva et al., 2003). Da die ICOS-Kostimulation wichtig ist für die Sekretion von T_H2-Zytokinen, spielt sie eine essentielle Rolle bei der T_H2-Differenzierung (Coyle et al., 2000; Tesciuba et al., 2001). Im Gegensatz zu CD28 löst die Kostimulation über ICOS keine IL-2-Produktion aus, stattdessen wird IL-10 induziert (Hutloff et al., 1999). Studien, in denen die ICOS-Expression in anergen T-Zellen untersucht wurde, legen einen Zusammenhang zwischen

ICOS und T_{reg} nahe. So wurde ICOS von einer Subpopulation aneurer T-Zellen exprimiert, die IL-10 sezernierte und die Aktivierung von T-Zellen kontaktabhängig supprimierte (Vermeiren et al., 2004).

Genetische Analysen belegen eine Korrelation zwischen einem autosomal-rezessiv vererbten Defekt im ICOS-Gen (Deletion der Exons 2/3) und dem Syndrom des variablen Immundefektes (Grimbacher et al., 2003). Betroffene Individuen haben eine erhöhte Disposition zu Infektionen des Respirationstraktes und weisen reduzierte Immunglobulin-Konzentrationen im Serum auf. Ursächlich dafür scheinen Störungen in der Produktion der Zytokine IL-10 und IL-17 zu sein (Warnatz et al., 2006). Daneben wurden Polymorphismen in der 5'-Region des *ICOS*-Gens mit dem Auftreten von Allergien assoziiert (Shilling et al., 2005). Eine zu hohe ICOS-Expression auf T-Zellen führt zu Autoimmunerkrankungen, vermutlich durch eine gesteigerte Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13. Eine erhöhte ICOS-Expression wurde auch in Patienten mit rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematosus beschrieben (Okamoto et al., 2003; Hutloff et al., 2004).

B7-H3:

Das Transmembranprotein B7-H3 wurde anhand von Sequenzvergleichen mit der extrazellulären Region verschiedener B7-Moleküle als weiteres Mitglied der B7-Familie entdeckt (Chapoval et al., 2001). Kurz darauf wurde das murine B7-H3-Gen entdeckt und eine Isoform von B7-H3 (B7-H3b) beim Menschen beschrieben (Sun et al., 2002). Die Expression von B7-H3 ist nicht auf lymphoide Zellen beschränkt, da mittels Northern Blot B7-H3 mRNA in einer Vielzahl von Geweben detektiert wurde. Nach der Stimulation von Monozyten, DCs und T-Zellen mit pro-inflammatorischen Zytokinen und Mitogenen wurde dabei die B7-H3-Expression gesteigert. Mit Hilfe eines B7-H3Ig-Fusionsproteins wurde der Rezeptor für B7-H3 auf aktivierten T-Zellen nachgewiesen. Dieser konnte bislang nicht identifiziert werden, jedoch wurden CTLA-4, ICOS oder PD-1 als Interaktionspartner für B7-H3 ausgeschlossen.

Erste Studien deuteten darauf hin, dass B7-H3 kostimulatorisch wirkt, weil die Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit Anti-CD3-Antikörper in Gegenwart von B7-H3Ig zu einer verstärkten Proliferation und zytolytischen Aktivität der CD8⁺ T-Zellen führte (Chapoval et al., 2001). Zudem wurde die IFN- γ -Sekretion durch DC-stimulierte allogene T-Zellen in Gegenwart von B7-H3 gesteigert, und dieser Effekt konnte durch Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden blockiert werden (Chapoval et al., 2001). Allerdings wurden diese Ergebnisse bislang in anderen Studien nicht bestätigt, da in ihnen ein inhibitorischer Effekt von B7-H3Ig auf die Proliferation

und Zytokinsekretion von T-Zellen beschrieben wurde (Ling et al., 2003; Suh et al., 2003). So deutet der Phänotyp von B7-H3^{-/-}-Mäusen eher auf eine koinhibitorische Funktion von B7-H3 hin, da diese in einem murinen Allergiemodell schwerere Erkrankungssymptome zeigten als Wildtyp-Mäuse (Suh et al. 2003). Vergleichbare Ergebnisse wurden im murinen Modell der autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) erhalten. In einer jüngeren Arbeit konnte *in vitro* weder eine kostimulatorische noch eine koinhibitorische Funktion des B7-H3-Moleküls nachgewiesen werden (Steinberger et al., 2004).

Tabelle I:

Kostimulatorische und koinhibitorische Mitglieder der B7-Familie (nach Wang et al., 2004)

Ligand	Expression	Rezeptor	Funktion
B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86)	DCs, Langerhans-Zellen, aktivierte Makrophagen, B-Zellen	CD28 CTLA-4	Aktivierung naiver T-Zellen, T-Zellproliferation, Produktion von IL-2, Inhibition von T-Effektorfunktionen
PD-L1 (B7-H1) PD-L2 (B7-DC)	DCs, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Endothelzellen, Tumorzellen DCs, Monozyten	PD-1	T-Effektorfunktionen, Zytokine (IL-10, IFN- γ), Apoptose von CTLs, Inhibition von T-Zellantworten
B7RP-1 (B7-H2, B7h, LICOS)	DCs, Monozyten, Langerhans-Zellen, B-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen etc.	ICOS	T-Effektorfunktionen, Zytokine (IL-4, IL-10), T-Zellproliferation, Antikörper-Klassenwechsel
B7-H3	Induziert auf DCs und Monozyten	?	T-Zellproliferation, Produktion von IFN- γ , Verstärkung der Aktivität von CTLs
B7-H4	Induziert auf T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, DCs, Tumorzellen	?	Inhibition der T-Zellproliferation und Zytokinproduktion, Zellzyklus-Arrest

1.2 Malaria

Die Malaria stellt eine tropische Infektionserkrankung dar, die durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* ausgelöst und auf den Menschen durch weibliche Mücken der Gattung *Anopheles* übertragen wird. Das höchste Infektionsrisiko besteht dabei im tropischen Afrika, wo jährlich 270-480 Millionen Neuerkrankungen vorkommen (mehr als 90 % der weltweiten Malariainzidenz). Jährlich versterben bis zu 1,5 Millionen Menschen infolge einer Malariaerkrankung,

vor allem Kinder unter fünf Jahren (WHO, 1999). Betrachtet man die Morbidität und Mortalität, ist Malaria daher weltweit die mit Abstand bedeutendste Infektionskrankheit. Von den mehr als 100 bekannten Plasmodienarten sind vier humanpathogen: *P. vivax* und *P. ovale* als Erreger der Malaria tertiana, *P. malariae*, das die Malaria quartana verursacht, sowie *P. falciparum* als Auslöser der Malaria tropica (Übersicht bei Lang et al., 2000).

Der Entwicklungszyklus des Malariaerregers besteht aus einer sexuellen Phase (Sporogonie) in der weiblichen *Anopheles*-Mücke und einer asexuellen Phase (Schizogonie) im Menschen (Übersicht bei Good et al., 1999). Beim Stich einer weiblichen Mücke gelangen Sporozoiten in die menschliche Blutbahn und dringen in Leberparenchymzellen ein, in denen die Vermehrung durch asexuelle Teilung stattfindet. Auf diese Weise entsteht aus jedem exoerythrozytären Schizonten ein reifer Schizont, der mehr als zehntausend Merozoiten enthält (Mota et al., 2001). Diese werden dann in die Blutbahn freigesetzt und befallen dort zirkulierende Erythrozyten, in denen sie sich ebenfalls ungeschlechtlich vermehren (erythrozytäre Schizogonie). In den Erythrozyten liegen sie zunächst als Ringformen vor, später als Trophozoiten und schließlich als Schizonten. Durch Ruptur der befallenen Erythrozyten werden erneut Merozoiten ins Blut freigesetzt, die ihrerseits wiederum in Erythrozyten eindringen, so dass sich der erythrozytäre Zyklus wiederholt. Parallel dazu entwickeln sich einige Merozoiten zu männlichen und weiblichen Gametozyten. Diese werden bei einem Stich der *Anopheles*-Mücke aufgenommen, woraufhin es zur Vereinigung eines männlichen und weiblichen Gametozyten im Magen der Mücke kommt. Nach der Befruchtung entwickelt sich die Zygote zum beweglichen Ookinet, der die Magenwand durchdringt und außerhalb des Magens zur Oozyste heranreift. Aus jeder Oozyste werden Sporozoiten freigesetzt, die in die Speicheldrüsen der Mücke einwandern und bei einem erneuten Stich wieder auf den Menschen übertragen werden können.

Im Gegensatz zu *P. falciparum* und *P. malariae*, die sich in jedem Fall in Leberparenchymzellen zu reifen Schizonten weiterentwickeln, können Schizonten von *P. vivax* und *P. ovale* als latente Formen (Hypnozoiten) in befallenen Hepatozyten verbleiben. Erst Monate oder Jahre später teilen sie sich zu reifen merozoitenhaltigen Schizonten und verursachen dann Rezidive oder Spätmanifestationen der Malaria tertiana.

Klinische Symptome der Malariaerkrankung werden ausschließlich durch die erythrozytäre Phase des *Plasmodium*-Lebenszyklus hervorgerufen. Charakteristisch sind dabei die periodisch auftretenden Fieberanfälle (keine Periodizität bei *P. falciparum*-Infektionen). Neben Fieber stehen unspezifische Symptome wie Kopfschmerz, Myalgien, Müdigkeit und Abgeschlagenheit im Vordergrund. Daneben treten Anämie, Splenomegalie, Übelkeit und Erbrechen auf. Während

Infektionen mit *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* in der Regel keine weitere Pathologie auslösen, verursachen *P. falciparum*-Infektionen oft schwere Komplikationen (Miller et al., 1994). Die schwerwiegendste Organmanifestation der Erkrankung ist dabei die zerebrale Malaria (CM), bei der es zur Adhäsion infizierter Erythrozyten an das vaskuläre Endothel (Zytoadhärenz) und an nicht-infizierte Erythrozyten (Rosetting) kommt. Als Sequestration wird der Vorgang bezeichnet, bei dem *Plasmodium*-infizierte Erythrozyten an die mikrovaskulären Endothelien verschiedener Organe adhärieren und dadurch die Blutzirkulation einschränken. Es wird postuliert, dass die Adhäsion infizierter Erythrozyten an die Hirnendothelien zu Störungen der Mikrozirkulation und damit zu Hypoxie führt. Dadurch kommt es zu neurologischen Symptomen wie Bewusstseinstörung und Koma, die von einer hohen Letalität begleitet sind (Miller et al., 2002). Zwar ist besonders das Gehirn von der Sequestration infizierter Erythrozyten betroffen, jedoch tritt sie auch in Herz, Leber, Niere, Darm, Fettgewebe und der Haut auf. So ist die Leber bei allen Malariaformen im Verlauf der Infektion geschwollen, dunkel verfärbt und weist Zelldegeneration und Nekrosen auf. Die Lebersinusoiden sind gefüllt mit Makrophagen und infizierten Erythrozyten. Zudem sind die Kupffer'schen Sternzellen aktiviert, vergrößert und enthalten das Malariapigment Hämozoin (Lang et al., 2000). In der Niere können sich im Verlauf der Infektion hämorrhagische Zonen ausbilden, außerdem wurden akute Glomerulonephritiden beschrieben (Eiam-Ong, 2003).

1.2.1 Pathogenese der Malaria

Ursächlich für die Pathologie der Malaria ist die erythrozytäre Phase der Infektion (Übersicht bei Cooke et al., 2001). Dabei ist die Immunantwort im Verlauf der Erkrankung vor allem aufgrund der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine entscheidend an der Pathogenese beteiligt. In Studien, in denen Serumzytokine von Kindern in Endemiegebieten während einer Malariaepisode gemessen wurden, korrelierte die Konzentration an TNF- α positiv mit einem schwereren Krankheitsverlauf und höherer Letalität (Grau et al., 1989; Kwiatkowski et al., 1990). So wiesen Patienten mit ausgeprägter Malaria-assoziiierter Pathologie (Organversagen, Thrombozytopenie) und hoher Parasitämie signifikant höhere TNF α -Spiegel im Serum auf als Patienten mit einer milden Verlaufsform. Neben TNF- α stellt auch IL-1 ein pro-inflammatorisches Zytokin dar, das wesentlich zur Pathogenese beiträgt. Hohe Serumkonzentrationen an IL-1 β wurden ebenfalls mit der Schwere des Krankheitsverlaufes assoziiert (Kwiatkowski et al., 1990). Im Mausmodell bewirkte die Applikation von rekombinantem IL-1 α oder IL-1 β während der Malaria die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und führte zu Hypoglykämie (Rockett et al., 1994).

Zudem wurde IL-1 in großen Mengen bei der Stimulation von PBMCs oder aufgereinigten Monozyten mit *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten produziert (Wahlgren et al., 1995). Ein weiteres Zytokin, das an der Induktion der Pathologie mitwirkt, ist Lymphotoxin (LT), das im Verlauf der Malaria in hohen Konzentrationen im Serum von Patienten vorliegt. Die Behandlung von *Plasmodium*-infizierten Mäusen mit LT führte zu einer gesteigerten IL-6-Sekretion und Hypoglykämie (Clark et al., 1992). Neuere Arbeiten mit LT^{-/-}-Mäusen im Rahmen der *P. berghei* ANKA-Infektion dokumentieren, dass es sich bei LT um einen wichtigen Mediator bei der Induktion der zerebralen Malaria handelt (Engwerda et al., 2002). Ebenso wie IL-1 und auch TNF- α kann LT *in vivo* die Freisetzung von NO induzieren (Rockett et al., 1992).

Einen Mechanismus, über den TNF- α vermutlich an der Induktion der CM mitwirkt, stellt die Aktivierung von Thrombozyten durch die systemische TNF α -Sekretion dar (Damonville et al., 1988). Es wird postuliert, dass die Thrombozytenaktivierung an der Ausbildung neurologischer Symptome beteiligt ist, da es während der humanen CM zur Aggregation von Thrombozyten in den Blutgefäßen des Gehirns kommt (Grau et al., 2003). Neben der Thrombozytenaggregation spielt die Sequestration von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten an das Hirnendothel eine Rolle bei der CM. Infolge des Befalls der Erythrozyten werden Zytoadhärenzphänomene wie Rosettenbildung und eine dadurch bedingte reduzierte Blutversorgung des Gehirns induziert (MacPherson et al., 1985; Scholander et al., 1996). Neuere Studien zeigen jedoch, dass inflammatorische Prozesse, die durch die Infiltration von Monozyten und Lymphozyten in Kapillaren des Gehirn ausgelöst werden, zumindest teilweise mitverantwortlich für die CM sind (Übersicht bei Renia et al., 2006). Die eingewanderten Leukozyten sequestrieren dabei an das Gefäßendothel, auf dem durch die Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) verstärkt exprimiert werden. Insbesondere CD8⁺ T-Zellen scheinen bei der Induktion der CM von Bedeutung zu sein (Belnoue et al., 2002; Nitchu et al., 2003).

Nicht abschließend geklärt ist dagegen die Funktion von NO im Rahmen der Malaria-induzierten Pathologie. Da systemisches TNF- α zur Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) auf Endothelzellen und dadurch letztlich zur Produktion von NO führt (Kilbourn et al., 1990), wurde eine Beteiligung von NO an der CM postuliert (Clark et al., 1992). Die Induktion der iNOS im Gehirn wurde im Verlauf von *P. falciparum*-Infektionen nachgewiesen (Clark et al., 2003). In zahlreichen Studien wurden hohe NO-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Pathologie, insbesondere CM, assoziiert (Al Yaman et al., 1996; Cot et al., 1994; Dondorp et al., 1998; Nussler et al., 1994). Jedoch wirkt NO auch antiparasitär, reduziert durch Feedback-Inhibition die Aktivität der iNOS (Robinson et al., 2001) und reguliert zudem die Produktion von TNF- α .

herunter (Iuvone et al., 1996). Die Bedeutung von NO für die Homöostase der Immunantwort während der Malariaerkrankung wurde durch Studien an klinisch immunen Kindern in Malaria-Endemiegebieten belegt, die signifikant höhere NO-Serumkonzentrationen aufwiesen als die Kontrollgruppe (Kremsner et al., 1996; Anstey et al., 1996; Clark et al., 1996). Des Weiteren inhibiert NO die Adhäsion von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten an das Gefäßendothel (Serirom et al., 2003). Vor kurzem wurde in der murinen *P. berghei* ANKA-Infektion gezeigt, dass CM durch niedrige NO-Konzentrationen im Serum ausgelöst wird, während die Applikation eines NO-Donors die Inzidenz der CM reduziert (Gramaglia et al., 2006). Zur Bedeutung von NO für die Protektion und/oder Pathogenese der Malaria wurden genetische Untersuchungen des NOS2A-Gens, das für die iNOS codiert, in Endemiegebieten durchgeführt. Verschiedene Polymorphismen in der Promotorregion des Gens wurden dabei identifiziert, die mit einem schweren Verlauf der Malaria und Letalität assoziiert sind (Burgner et al., 1998; Burgner et al., 2003; Hobbs et al., 2002).

Von besonderer Bedeutung als Auslöser für Pathomechanismen im Verlauf der Malaria ist das von den Plasmodien sezernierte Glycosylphosphatidylinositol (GPI), das auch als Malaria-Toxin bezeichnet wird (Übersicht bei Gowda et al., 2002). *P. falciparum*-GPI stimuliert Makrophagen zur Sekretion großer Mengen an TNF- α , IL-1 und NO (Schofield et al., 1993; Tachado et al., 1996; Zhu et al., 2005). Dabei werden pro-inflammatorische Antworten in Makrophagen durch die Bindung des GPI an den Toll-Rezeptor TLR2 und zu geringerem Anteil an TLR4 verursacht, die von den Makrophagen exprimiert werden (Krishnegowda et al., 2005). Eine Immunisierung von Mäusen mit GPI vor der Infektion mit *P. berghei* ANKA schützte diese vor CM (Schofield et al., 2002), so dass GPI offensichtlich einen wichtigen Pathogenitätsfaktor der Malaria darstellt.

Ein weiteres Phänomen ist die im Verlauf der Malariaerkrankung induzierte Immunsuppression. Es wurde postuliert, dass während der Malaria die Reifung von dendritischen Zellen inhibiert ist (Urban et al., 1999), allerdings gibt es auch konträre Ergebnisse (Perry et al., 2004). Andere Arbeiten deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Malaria-bedingten Immunsuppression und regulatorischen T-Zellen hin. So wurde im Mausmodell nach der Infektion mit einem letalen *P. yoelii*-Stamm durch die Depletion der CD4⁺CD25⁺ T_{reg} eine effektive Immunantwort ausgelöst, die zu einer verstärkten T-Zellaktivität führte und vor dem letalen Verlauf schützte (Hisaeda et al., 2004).

1.2.2 Murine Malariamodelle

Um während einer Infektion mit *Plasmodium* spp den Verlauf einer Immunantwort oder Malaria-induzierten Pathologie zu untersuchen, existieren verschiedene Mausmodelle, mit deren Hilfe Charakteristika des humanen Krankheitsverlaufes zumindest teilweise imitiert werden können (Übersicht bei Li et al., 2001). Einige Plasmodienarten (*P. chabaudi adami*, *P. yoelii* 17NL) lösen nicht-letale Infektionen aus, in deren Verlauf die Parasiten vollständig eliminiert werden und die zu Immunität gegenüber einer erneuten Infektion mit dem gleichen Stamm führen. Infektionen mit anderen Plasmodienarten verlaufen dagegen nur in bestimmten Mausstämmen letal (*P. chabaudi chabaudi*) oder verursachen in jedem Fall einen letalen Krankheitsverlauf (*P. berghei*, *P. yoelii* 17XL oder YM).

Die Infektion susceptibler Mausstämme mit *P. berghei* ANKA (PbA) stellt ein Modell für die zerebrale Malaria (CM) dar, die in seltenen Fällen als Komplikation der humanen *P. falciparum*-Malaria auftritt (Hearn et al., 2000; Jennings et al., 1998). Wie bei der zerebralen Malaria beim Menschen kommt es im Mausmodell zur Zelladhäsion an das Kapillarendothel des Gehirns und zu neurologischen Symptomen, z.B. Reflexausfälle, Ataxie oder Koma (Belnoue et al., 2002; Belnoue et al., 2003; Neill et al., 1992). Ein wesentlicher Unterschied besteht darin, dass die murine CM durch Leukozytenadherenz induziert wird, während die humane CM von einer massiven Sequestration *P. falciparum*-infizierter Erythrozyten an das Hirnendothel begleitet wird (MacPherson et al., 1985). Zahlreiche Studien mit T-Zell-defizienten Mäusen oder Mäusen, bei denen die T-Zellen *in vivo* durch Antikörper depletiert wurden, dokumentieren, dass T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion der CM spielen. So entwickeln Mäuse mit schwerem kombinierten Immundefekt (SCID-Mäuse), RAG^{-/-}-Mäuse und Thymus-defiziente (Nude)-Mäuse keine neurologischen Symptome nach einer PbA-Infektion (Belnoue et al., 2002; Grau et al., 1986; Yanez et al., 1996). Bei der Induktion der CM sind pro-inflammatorische Zytokine im Verlauf der Infektion ebenfalls von wesentlicher Bedeutung. So werden von CD4⁺ T-Zellen während einer PbA-Infektion große Mengen TNF- α und IFN- γ sezerniert, die mit dem Auftreten neurologischer Symptome korrelieren (Grau et al., 1987; Grau et al., 1990; Rudin et al., 1997). Zudem lässt sich die CM durch die Depletion dieser pro-inflammatorischen Zytokine verhindern (Grau et al., 1989; Rudin et al., 1997). Auch durch die Applikation der regulatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β , die zu einer verringerten Produktion von TNF- α und IFN- γ führen, wird die Inzidenz der CM reduziert (Kossodo et al., 1997). Die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wird dabei begleitet von der Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelien, insbesondere CD36 und ICAM-1 (Imhof et al., 1995). Es wird postuliert, dass die verstärkte Expression von

Adhäsionsmolekülen entscheidend zur Sequestration von Leukozyten, aber auch infizierten Erythrozyten beiträgt (Lucas et al., 1997). Quantitative Analysen der Zellpopulationen haben gezeigt, dass selektiv CD8⁺ T-Zellen im Gehirn von PbA-infizierten Mäusen akkumulieren (Belnoue et al., 2002). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass CD8⁺ T-Zellen von essentieller Bedeutung für die Induktion der CM sind. Dies wurde auch durch den adoptiven Transfer von CD8⁺ T-Zellen aus der Milz von PbA-infizierten Mäusen in RAG-2^{-/-}-Mäuse bestätigt, da die transferierten CD8⁺ T-Zellen in das Gehirn der Rezipienten infiltrieren und dort CM induzieren (Nitcheu et al., 2003). Insgesamt spiegelt die murine *P. berghei* ANKA-Infektion somit einige Charakteristika der CM beim Menschen wider, wenngleich es hinsichtlich der Zellinfiltration und -sequestration deutliche Unterschiede gibt. Zur Analyse der Pathologie, insbesondere der CM, im Verlauf der Malaria stellt sie jedoch das wichtigste Mausmodell dar.

Die *P. yoelii*-Infektion von Mäusen wird eingesetzt, um entweder Malaria-assoziierte Pathologie zu untersuchen (in Infektionen mit den letalen Stämmen *P. yoelii* 17XL und YM) oder die Immunantwort in einer nicht-letalen Infektion mit *P. yoelii* 17NL zu charakterisieren (Yoeli et al., 1975). Im Gegensatz zur polarisierten T_H1-Antwort im Verlauf einer *P. berghei*-Infektion zeichnet sich die Immunantwort gegen eine Py17NL-Infektion durch die Produktion von T_H1- und T_H2-Zytokinen aus (Li et al., 2001; Omer et al., 2003). Dabei ist die Produktion von IFN- γ notwendig, um die Parasitenreplikation in der frühen Blutphase zu unterbinden (Amante et al., 1997), während IL-4, IL-10 und TGF- β T_H2-Zellen induzieren, die daraufhin B-Zellen zur Antikörpersekretion anregen. In einigen Studien wurde nachgewiesen, dass B-Zellen und Antikörper zur effektiven Eliminierung von *P. yoelii*-Parasiten notwendig sind (von der Weid et al., 1996; White et al., 1991). Die Kinetik der Verschiebung der Immunantwort von T_H1 in Richtung T_H2 scheint dabei von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung von protektiver Immunität zu sein, da eine frühe und ausgeprägte Produktion von IL-10 durch CD4⁺ T-Zellen kennzeichnend für den letalen Verlauf einer Py17XL-Infektion ist (Kobayashi et al., 1996). Somit korreliert eine zu geringe pro-inflammatorische Immunantwort mit hoher Parasitämie und Letalität, während eine verstärkte Inflammation zwar mit einer niedrigen Parasitämie, jedoch auch mit einem schwereren Krankheitsverlauf aufgrund einer Immunpathologie assoziiert ist. Mechanismen der Immunregulation im Verlauf einer Malaria lassen sich somit durch Verwendung des *P. yoelii*-Mausmodells gut aufklären. Daneben wird die murine *P. yoelii*-Infektion auch für Vakzinstudien eingesetzt.

1.3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

T-Zellen sind von essentieller Bedeutung für eine effektive Immunantwort, können im Fall einer überschießenden Immunreaktion jedoch auch Pathologie induzieren, so dass inflammatorische Prozesse genau reguliert werden müssen. Im ersten Teil der Arbeit sollte die CTLA-4-abhängige Regulation während der murinen Malaria untersucht werden. Die Auswirkung einer Blockade der CTLA-4/B7-Interaktion auf die Immunantwort wurde bereits im Verlauf einer *P. berghei* ANKA-Infektion untersucht. In diesem Mausmodell führte die Applikation eines blockierenden Anti-CTLA-4-Antikörpers zu einer höheren Inzidenz an zerebraler Malaria (Jacobs et al., 2002). Zudem wurden inflammatorische Prozesse in der Leber durch die CTLA-4-Blockade verstärkt (Jacobs et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss einer CTLA-4-Blockade auf den Verlauf der Immunantwort im *P. yoelii*-Mausmodell untersucht werden. Im Gegensatz zur polarisierten T_H1 -Antwort bei einer PbA-Infektion zeichnet sich die Immunantwort bei einer *P. yoelii*-Infektion durch die regulierte Produktion von T_H1 - und T_H2 -Zytokinen aus. Parasitämie und Überleben der Mäuse, T-Zellaktivierung und Serumzytokine sollten nach der Behandlung mit Anti-CTLA-4- bzw. Kontroll-Antikörper verglichen und der Mechanismus einer CTLA-4-Blockade (Wirkung auf T_{reg} bzw. auf T-Effektorzellen) analysiert werden.

Zahlreiche Studien haben die koinhibitorische Funktion des B- und T-Lymphozyten-Attenuators nachgewiesen und dessen Beitrag zur Regulation von Immunantworten in Mausmodellen für Allergie (Deppong et al., 2006), Autoimmunität (Watanabe et al., 2003) und Transplantation (Tao et al., 2005) untersucht. Da die Funktion von BTLA im Verlauf einer Infektion bisher noch nicht charakterisiert wurde, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der BTLA-abhängigen Regulation der T-Zellaktivität im Verlauf der durch *P. berghei* ANKA verursachten murinen Malaria. Dazu sollte die Expression von BTLA und dessen Liganden HVEM im Verlauf der Infektion in verschiedenen Organen analysiert werden, um Hinweise für mögliche Korrelationen der BTLA/HVEM-Expression mit Organmanifestationen der Malaria zu erhalten. Zudem sollte ein BTLA-Ig-Fusionsmolekül und verschiedene Anti-BTLA-Antikörper *in vitro* charakterisiert und *in vivo* während der PbA-Infektion eingesetzt werden, um die Funktion von BTLA bei der Modulation des Krankheitsverlaufes zu untersuchen. Dabei wurde das PbA-Mausmodell verwendet, da es aufgrund des Auftretens von zerebraler Malaria zur Analyse der Malaria-induzierten Pathomechanismen besonders geeignet ist. Zunächst sollte der Effekt einer Behandlung mit BTLA-Ig bzw. anti-BTLA auf die Inzidenz der CM beobachtet werden. Weitere Parameter der Immunantwort (T-Zellaktivierung, T_H1/T_H2 -Zytokine, T-Zellinfiltration in die peripheren Organe) sollten ebenfalls einbezogen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Analysenwaage	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
Bakterienbrutschrank	<i>Heraeus, Hanau</i>
Blot-Kammer	<i>BioRAD, München</i>
CO ₂ -Inkubator	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Digitalwaage	<i>Kern & Söhne, Alberstadt</i>
ELISA-Reader Lambda E	<i>MWG-Biotech, Ebersberg</i>
Eppendor fzentrifuge 5415C	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
FACSCalibur Flow Cytometer	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
FACS-Software CELLQuest 3.0	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Filmkassette (18 x 24 cm)	<i>Siemens, München</i>
Filmentwickler (Curix 60)	<i>Agfa-Gevaert AG, Leverkusen</i>
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 plus)	<i>Zeiss, Jena</i>
Fluoreszenzmikroskop-Software Openlab	<i>Improvision, Coventry, UK</i>
Gelkammern (Agarose-Gelelektrophorese)	<i>BioRAD, München</i>
Gelkammern (Protein-Gelelektrophorese)	<i>BioRAD, München</i>
Heizblock (Thermomixer Comfort)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Kryostat Frigocut 2700	<i>Leica, Nussloch</i>
Kühlanlage	<i>Haake, Karlsruhe</i>
Magnetrührer	<i>IKA® Labortechnik, Staufen</i>
Mehrkanalpipette „Research Pro“	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Messer für Kryostaten	<i>Leica, Nussloch</i>
Midi-MACS-Zellseparationssystem	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach</i>
Mikroskop	<i>Wiloret, Hund, Wetzlar</i>
Mikrowelle	<i>Panasonic, Wiesbaden</i>
Netzteil (Agarose-Gelelektrophorese)	<i>BioRAD, München</i>
Netzteil (Protein-Gelelektrophorese)	<i>Biotec-Fischer, Reiskirchen</i>
Ofen (Mini Oven MKII)	<i>MWG Biotech, Ebersberg</i>
PCR-Thermocycler	<i>Hybaid Ltd., Middlesex, UK</i>
pH-Meter (WTW pH 537)	<i>Labotec, Wiesbaden</i>
Photoapparatur für DNA-Gele	<i>Mitsubishi, Tokio, Japan</i>
Pipetten	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Pipettierhilfen	<i>Stripettor, Coster</i>
Schüttler (MTS 4)	<i>IKA® Labortechnik, Staufen</i>
Schüttelinkubator für Bakterien (Certomat BS-T)	<i>B. Braun Biotech International, Melsungen</i>
Spektralphotometer	<i>Hitachi, Japan</i>
Sterile Arbeitsbank (Hera Safe)	<i>Heraeus Instruments, Staufen</i>
Szintillationszähler	<i>EG & G Wallac, Turku, Finnland</i>
UV-Tisch	<i>Internat. Biotechnologies, New Haven, USA</i>
Vortexer	<i>IKA® Labortechnik, Staufen</i>
Wasserbad	<i>GFL, Burgwedel</i>
Wasserdeionisierungsanlage	<i>SG Clear, Barsbüttel</i>
Zellerntegerät Microcell Harvester	<i>Scatron Instruments, Lier, Norwegen</i>
Zentrifugen	<i>Biofuge 13R, Megafuge 1.0R, 2.0R</i>
	<i>Suprafuge 22, Heraeus-Sepatech, Hanau</i>

2.1.2 Glas- und Plastikwaren

CELLine Bioreaktoren (350 ml)	<i>Integra Biosciences</i> , Fernwald
Cellmaster Rollerflaschen (850 cm ²)	<i>Greiner</i> , Frickenhausen
Deckgläschen	<i>Engelbrecht</i> , Edermünde
Econo-Pac Disposable Chromatography-Säule	<i>BioRAD</i> , München
Einfrierröhrchen für Zellen (1.8 ml)	<i>Nunc</i> , Roskilde, Dänemark
ELISA-Platten (Microlon)	<i>Greiner</i> , Frickenhausen
Eppendorf-Reaktionsgefäße 0.5, 1.5 und 2 ml	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
FACS-Röhrchen	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
Falcon-Röhrchen	<i>Falcon/Becton Dickinson</i> , Heidelberg
Gewebekulturflaschen 10, 30 und 100 ml	<i>Greiner</i> , Frickenhausen
Gewebekulturplatten 24, 48 und 96 Well	<i>Greiner</i> , Frickenhausen
Glaspipetten	<i>Brand</i> , Wertheim
Kanülen	<i>Braun</i> , Melsungen
Objektträger	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Pasteurpipetten	<i>Brand</i> , Wertheim
Petrischalen (Ø 90 mm, Cellstar)	<i>Greiner</i> , Frickenhausen
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt</i> , Nürnberg
Plastikpipetten (25 ml)	<i>Greiner</i> , Frickenhausen
Quarzküvetten	<i>Hellma</i> , Mülheim
Spritzen	<i>Braun</i> , Melsungen
Sterilfilter, 0.22 µm und 0.4 µm	<i>Schleicher & Schuell</i> , Dassel
Sterilfiltriergefäße SteriCup	<i>Millipore</i> , Bedford, MA, USA
Zählkammer nach Neubauer (0.1 x 0.0025 mm ²)	<i>Brandt</i> , Melsungen
Zellschaber	<i>Greiner</i> , Frickenhausen
Zellsiebe 70 µm	<i>Falcon/Becton Dickinson</i> , Heidelberg
Zentrifugentröhrchen (15 und 50 ml)	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg

2.1.3 Chemikalien

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

2.1.4 Bakterienstämme, Zelllinien, Mausstämme

Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> Stamm DH5αF'	<i>New England Biolabs</i> , Bad Schwalbach
-----------------------------	---

Eukaryontische Zelllinien:

CHO (CCL-61)	Hamster-Ovarienzelllinie (Puck et al., 1958)
COS-1 (CRL-1650)	epitheliale Affennieren-Zelllinie, die das SV40-Genom integriert hat (Gluzman, 1981)
L-929 (CCL-1)	Maus-Fibroblastenzelllinie (Evans et al, 1956)

Mausstämme:

BALB/c (H-2 ^d)	<i>UKE</i> , Hamburg
----------------------------	----------------------

C57BL/6 (H-2 ^b)	UKE, Hamburg
HVEM ^{-/-} (H-2 ^b)	Maus, bei der beide HVEM-Allele durch homologe Rekombination inaktiviert sind (auf C57BL/6-Hintergrund rückgekreuzt) Prof. Dr. K. Pfeffer, Universität Düsseldorf
OT-I (H-2 ^b)	T-Zell-Rezeptor-transgene Maus, deren TCR einen Komplex aus H2-K ^b und dem Peptid OVA ₂₅₇₋₂₆₄ erkennt (Hogquist et al., 1994) UKE, Hamburg
OT-II (H-2 ^b)	T-Zell-Rezeptor-transgene Maus, deren TCR einen Komplex aus I-A ^b und dem Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ erkennt (Barnden et al., 1998) UKE, Hamburg
<u>Plasmodium berghei</u> ANKA: Stabilat aus mit <i>P. berghei</i> ANKA-Sporozoit infizierten Balb/c Mäusen	BNI, Hamburg
<u>Plasmodium yoelii</u> (Py17NL und Py-lethal): Stabilat aus mit <i>P. yoelii</i> (Py17NL bzw. Py-lethal) infizierten Balb/c-Mäusen	J. Langhorne, NIMR, London, UK

2.1.5 Antikörper und Detektionsreagenzien

Fluorochrom-konjugierte Primärantikörper:

Hamster-anti-Maus CTLA-4 (4F10), Alexa 488	J. Bluestone, University of Chicago, USA
Maus-anti-Maus BTLA (6F7), PE	eBioscience, San Diego, USA
Ratte-anti-Maus CD4 (RM4-5), APC	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD4 (CT-CD4), PE	CALTAG, Burlingame, USA
Ratte-anti-Maus CD8α (5H10), Alexa-Fluor 488	CALTAG, Burlingame, USA
Ratte-anti-Maus CD8α (5H10), PE	CALTAG, Burlingame, USA
Ratte-anti-Maus CD19 (1D3), FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD25 (7D4), FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD31 (MEC-13.3), Biotin	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD45 (30-F11), PerCP	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD62L (MEL-14), PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD69 (H1.2F3), PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus Foxp3 (FJK-16s), PE	eBioscience, San Diego, USA

Isotypkontrollen:

Maus IgG1, κ (P3), PE	eBioscience, San Diego, USA
Ratte IgG1, κ (A85-1), APC/ PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2a (R35-95), APC/ FITC/ PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2b (R12-3), PE	BD Pharmingen, Heidelberg

Sekundärantikörper:

Esel-anti-human-IgG, PE	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
Kaninchen-anti-FITC, Alexa Fluor 488	<i>Molecular Probes</i> , Eugene, USA
Kaninchen-anti-human-IgG, HRP	<i>DAKO</i> , Glostrup, Dänemark
Ziege-anti-Hamster-IgG, PE	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
Ziege-anti-Hamster TRITC	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
Ziege-anti-human-IgG, FITC	<i>CALTAG</i> , Burlingame, USA

Unkonjugierte Immunglobuline und Detektionsreagenzien:

ChromPure Hamster IgG	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
ChromPure Maus IgG	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
Hamster-anti-Maus BTLA (6A6)	K.M. Murphy, WUSTL, St. Louis, USA
Hamster-anti-Maus CTLA-4 (UC10-4F10)	J. Bluestone, University of Chicago, USA
Hamster-anti-Maus ICAM-1 (3E2)	<i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg
Streptavidin, Cy5	<i>Jackson ImmunoResearch Ltd.</i> , Soham, UK
Ziege-anti-Maus HVEM (Antiserum)	<i>R&D Systems</i> , Wiesbaden

ELISA-Testsysteme:

Zur Quantifizierung der Zytokine IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70 und TNF- α in Überständen von Milzzellen und Sera wurden DuoSet[®] ELISA Development Kits (R&D Systems, Wiesbaden) verwendet. Die Bestimmung von IL-18 erfolgte mit einem IL-18 ELISA Kit (Medical & Biological Lab., Nagoya, Japan).

2.1.6 Material für molekularbiologische Arbeiten**2.1.6.1 Reagenzien**

Agarose	<i>Biomol</i> , Hamburg
Ampicillin	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Bacto-Agar	<i>Merck</i> , Darmstadt
Bacto-Trypton	<i>Difco</i> , Detroit, USA
Bromphenolblau	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Desoxyribonukleosidtriphosphate	<i>MBI Fermentas</i> , St. Leon-Roth
Dithiothreitol (DTT)	<i>Gibco BRL</i> , Eggesheim
DNA-Molekulargewichtsmarker (100 bp, 1 kb)	<i>MBI Fermentas</i> , St. Leon-Roth
EndotoxFree-Plasmid-Kit	<i>QIAGEN</i> , Hilden
Ethidiumbromid	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Hefeextrakt	<i>Difco</i> , Detroit, USA
Mineralöl	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Oligo(dT) ₁₅ -Primer	<i>Roche</i> , Mannheim
Oligonukleotid-Primer	<i>MWG Biotech AG</i> , Ebersberg
PCR Cloning Kit	<i>QIAGEN</i> , Hilden
Plasmid-Mini-Kit (NucleoSpin Plasmid)	<i>Macherey & Nagel</i> , Düren
Plasmid-Maxi-Kit	<i>QIAGEN</i> , Hilden
QIAEX-II Gelextraktions-Kit	<i>QIAGEN</i> , Hilden
TRI Reagent [®]	<i>Molecular Research Center</i> , Cincinnati, USA
X-Gal	<i>MBI Fermentas</i> , St. Leon-Roth
Xylencyanol	<i>Serva Feinbiochemika</i> , Heidelberg

2.1.6.2 Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen

Ampicillin-Stammlösung:

25 mg/ml, anschließend Sterilfiltration

Desoxyribonukleotid-Gemisch (dNTPs):

je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

6x DNA-Beladungspuffer für Agarose-Gele:

0.25 % Bromphenolblau

0.25 % Xylencyanol FF

15 % Ficoll

DNA-Molekulargewichtsmarker:

83 µg/ml

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg/ml

5x KCM-Medium:

0.5 M KCl

0.15 M CaCl₂

0.25 M MgCl₂

ad 30 ml mit ddH₂O, danach Sterilfiltration (0.2 µm)

LB-Medium:

10.0 g Bacto-Trypton

5.0 g Hefeextrakt

10.0 g NaCl

ad 1 Liter mit ddH₂O, pH 7.4, danach Sterilisation im Autoklav

LB-Ampicillin(Amp)-Medium:

LB-Medium mit Ampicillin (finale Konzentration: 50 µg/ml)

LB-Agarplatten:

15.0 g Bacto-Agar wurden zu 1 L LB-Medium gegeben und die entsprechenden Antibiotika dem abgekühlten Medium nach dem Autoklavieren zugesetzt. Jeweils 20 ml wurden in Petrischalen gegossen und bei Raumtemperatur zum Aushärten stehen gelassen.

20 % (w/v) SDS-Stammlösung:

20 g SDS in 100 ml ddH₂O gelöst

50x TAE-Puffer:

0.6 M Natriumacetat

2 M Tris-Base

0.1 M Na₂EDTA

pH 8.3

10x TBE-Puffer:

0.89 M Tris-Base

0.89 M Borsäure

20 mM Na₂EDTA· 2 H₂O

pH 8.0

1x TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 7.5

TSB-Puffer:

41 ml 2x LB-Medium

10 % PEG (MW 3350)

5 % DMSO

10 mM MgCl₂10 mM MgSO₄ad 100 ml mit ddH₂O, danach Sterilfiltration (0.2 µm)X-Gal-Stammlösung:

20 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) in Dimethylformamid

2.1.6.3 Plasmide

pcDNA3.1(+)

pDrive Cloning Vector

pFUSE-hlgG1-Fc2

*Invitrogen, Groningen, Niederlande**QIAGEN, Hilden**Invivogen, San Diego, USA***2.1.6.4 Enzyme**

Alle Enzyme wurden in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Die Restriktionsenzyme wurden von *MBI Fermentas* (St. Leon-Roth) *New England Biolabs* (Bad Schwalbach) bezogen.

Restriktionsendonukleasen:*Bam*HI, 10 U/µl*Eag*I, 10 U/µl*Eco*RI, 10 U/µl*Hind*III, 10 U/µl*Pvu*I, 10 U/µl*Sma*I, 10 U/µl*Spe*I, 10 U/µl*Xho*I, 20 U/µl*MBI Fermentas, St. Leon-Roth**New England Biolabs, Bad Schwalbach**MBI Fermentas, St. Leon-Roth**MBI Fermentas, St. Leon-Roth**MBI Fermentas, St. Leon-Roth**MBI Fermentas, St. Leon-Roth**New England Biolabs, Bad Schwalbach**New England Biolabs, Bad Schwalbach*DNA-Polymerasen:

Taq-DNA-Polymerase, 5 U/µl

*New England Biolabs, Bad Schwalbach*Weitere Enzyme:

Powerscript Reverse Transkriptase

T4-DNA-Ligase, 5 U/µl

*BD Pharmingen, Heidelberg**MBI Fermentas, St. Leon-Roth*

2.1.6.5 Oligonukleotid-Primer

Expressionsanalysen:

BTLA: BTLA-expr-f:
5'- CCT CTG GAG CAT CCT TTG TGA GAA -3'

BTLA-expr-r:
5'- ATT GGT GGC ATC TGG GAT GTC AGA -3'

HVEM: HVEM-expr-f:
5'- GGT TAC CAT GTG AAG CAG GTC -3'

HVEM-expr-r:
5'- TTG ACT GGA AAC CTG ATG GTG TT -3'

β-Aktin: beta-Aktin-sense:
5'- GTC GTA CCA CAG GCA TTG TGA TGG -3'

beta-Aktin-as:
5'- GCA ATG CCT GGG TAC ATG GTG G -3'

Klonierung:

BTLA: fl-BTLA-*Hind*III-s:
5'- GAA GCT TGC TGG GAA TGA AGA CAG TG -3'

fl-BTLA-*Xho*I-as:
5'- GCA CTC GAG CAG TGT AGG CTG CCT -3'

HVEM: fl-HVEM-*Hind*III-s:
5'- CCT GAA GCT TCT TGA TCA AGA AAA TGG -3'

fl-HVEM-*Xho*I-as:
5'- TCC TCG AGG TCT TGT CACCCA GAA T -3'

BTLA-Ig: BTLA-*Hind*-s-neu-1:
5'- TGT CGA AGC TTG CTG GGA ATG AAG ACA GTG C -3'

BTLA-*Bam*HI-as:
5'- CCA AGT GGA TCC CCT GGC CTC TCT TCC ATG -3'

Genotypisierung:

HVEM-SP-5' (für Wildtyp/HVEM^{-/-}):
5'- TCC CTG AGG CTG AGA GGT TCC -3'

Wildtyp: HVEM-SP-3'-WT:
5'- AGA GGC AGC AGG GTC AGC TGG -3'

HVEM^{-/-}: pJak2:
5'- CTG AAG AGG AGT TTA CGT CCA G -3'

Sequenzierung:

M13_f:
5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3'

M13_r:
5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'

2.1.7 Material für biochemische Arbeiten

2.1.7.1 Reagenzien

Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
BSA (Peroxidase-frei)	<i>Serva Feinbiochemika, Heidelberg</i>
Centricon Filter (Ausschluss 10 bzw. 50 kDa)	<i>Millipore Corporation, Bedford, USA</i>
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	<i>Pierce, Rockford, USA</i>
Dialyse-Schlauch	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
ECL Western Blotting Detection Reagents	<i>Amersham, Buckinghamshire, UK</i>
Film EPH 1600	<i>Kodak, Stuttgart</i>
Hybond-ECL-Nitrocellulose-Membran	<i>Amersham, Buckinghamshire, UK</i>
Hyperfilm	<i>Amersham, Buckinghamshire, UK</i>
Limulus Amebocyte Lysat LPS-Assay	<i>Bio Whittaker, Walkersville, USA</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Milchpulver	<i>Nestlé, Frankfurt</i>
Protein G-Sepharose	<i>Pierce, Rockford, USA</i>
Protein-Marker, 10 kD-Leiter	<i>GibcoBRL, Eggenstein</i>
Protein-Marker, prestained	<i>GibcoBRL, Eggenstein</i>
Streptavidin-HRP	<i>DAKO, Glostrup, Dänemark</i>
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	<i>BioRAD, München</i>
Tween-20	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Whatman-Filterpapier	<i>Schleicher & Schuell, Dassel</i>
Zellophanfolien für Proteingele	<i>Novex, San Diego, USA</i>

2.1.7.2 Puffer und verwendete Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und für den Gebrauch bei zellbiologischen Arbeiten autoklaviert oder sterilfiltriert.

Ammoniumpersulfat (APS):

10 % in H₂O

Anodenpuffer 1 (Western Blot):

300 mM Tris

20 % Methanol

pH 10.4

Anodenpuffer 2 (Western Blot):

25 mM Tris

20 % Methanol

pH 10.4

Blockierungs-Puffer (Western Blot):

4 % Milchpulver in PBS

Dialyse-Puffer:

0.01 M EDTA, pH 8.0

Elutionspuffer (Protein G-Säule):

0.1 M Glycin

pH 2.7

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl eingestellt, der Puffer anschließend entgast und sterilfiltriert.

Kathodenpuffer (Western Blot):

25 mM Tris

4 mM ϵ -Aminocapronsäure

20 % Methanol

pH 9.4

10x Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese:

0.25 M Tris

2.5 M Glycin

1 % SDS

5x Ladepuffer (für SDS-Gel):

50 mM Tris

2 % SDS

5 % Glycerin

10 % DTT

einige Tropfen Bromphenolblau

pH 6.8

10x PBS (Phosphate Buffered Saline):

80 g NaCl

2.0 g KCl

14.4 g Na_2HPO_4 2.4 g KH_2PO_4 ad 1 l dH_2O

pH 7.4

PBS-Tween:

PBS-Puffer + 0.1 % Tween20

Phosphatpuffer (Protein G-Säule):Puffer A: 20 mM Na_2HPO_4 Puffer B: 20 mM NaH_2PO_4

Puffer A und B wurden gemischt, bis ein pH-Wert von 7.0 erreicht war; der Phosphatpuffer wurde anschließend entgast und sterilfiltriert.

4x Sammelgelpuffer (SDS-PAGE):

0.5 M Tris-Base

0.4 % SDS

pH 6.8

5 %iges Sammelgel (SDS-PAGE):

1.25 ml 4x Sammelgelpuffer
 0.8 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid
 3.0 ml dH₂O
 50 µl 10 % APS
 5.0 µl TEMED

4x Trenngelpuffer (SDS-PAGE):

1.5 M Tris-Base
 0.4 % SDS
 pH 8.8

10 %iges Trenngel (SDS-PAGE):

2.5 ml 4x Trenngelpuffer
 3.5 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid
 4.0 ml dH₂O
 100 µl 10 % APS
 12.5 µl TEMED

Waschpuffer (Silberfärbung):

50 % Ethanol
 50 % dH₂O

2.1.8 Material für zellbiologische Arbeiten**2.1.8.1 Reagenzien**

Cohn-II (humane IgG-Fraktion)	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Cytofix/Cytoperm	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg
Cytoperm/Wash	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg
DAPI	<i>Molecular Probes</i> , Eugene, USA
Dimethylsulfoxid	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Direct-PCR Tail	<i>Peqlab</i> , Erlangen
Einbettmedium	<i>Leica</i> , Nussloch
Fötales Kälberserum (FCS)	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
FuGENE6 Transfektions-Reagenz	<i>Roche</i> , Mannheim
G418	<i>PAA</i> , Linz Österreich
Gentamycin	<i>PAA</i> , Linz, Österreich
³ H-Thymidin (5 mCi/ml)	<i>Amersham</i> , Buckinghamshire, UK
IMDM-Medium (ohne L-Glutamin)	<i>PAA</i> , Linz, Österreich
L-Glutamin	<i>PAA</i> , Linz, Österreich
LPS (<i>E. coli</i> -Stamm 055:B5)	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
LS-Separationssäulen	<i>Miltenyi Biotec</i> , Bergisch Gladbach
Mausserum	<i>DAKO</i> , Glostrup, Dänemark
NycoPrep Universal	<i>Axis-Shield PoC AS</i> , Oslo, Norwegen
Pan T Cell Isolation Kit II	<i>Miltenyi Biotec</i> , Bergisch Gladbach
Peptid OVA ₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL)	<i>MWG-Biotech</i> , Ebersberg
Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR)	<i>MWG-Biotech</i> , Ebersberg
Permafluor	<i>Immunotech</i> , Marseille, Frankreich
PFHM-II Hybridoma-Medium	<i>GibcoBRL</i> , Eggenstein

RPMI 1640-Medium (ohne L-Glutamin)	<i>PAA</i> , Linz, Österreich
Streptavidin-HRP	<i>DAKO</i> , Glostrup, Dänemark
Szintillationsflüssigkeit	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Trypanblau	<i>Serva Feinbiochemika</i> , Heidelberg
Trypsin, 0.25 %	<i>GibcoBRL</i> , Eggenstein
Wright's stain	<i>Sigma</i> , Deisenhofen

2.1.8.2 Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen

Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurde das FCS vor Gebrauch 45 Minuten auf 56 °C erwärmt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Zellkultur wurde dem Vollmedium Gentamycin (0.5 %) zugesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden IMDM- und RPMI 1640-Medium jeweils mit 10 % FCS verwendet.

Coating-Puffer (ELISA):

Puffer A: 10 mM Na₂CO₃

Puffer B: 20 mM NaHCO₃

Zu 70 ml Puffer A wurde Puffer B zugegeben, bis ein pH-Wert von 9.6 erreicht war.

Cohn-II-Stammlösung:

10 mg/ml in 1x PBS

DAPI-Stammlösung:

640 ng/ml in Methanol

Einfriermedium (Zellkultur-Zellen):

50 % FCS

40 % RPMI mit 10 % FCS

10 % DMSO

Einfriermedium (für *P. berghei* ANKA- oder *P. yoelii*-infizierte Erythrozyten):

0.9 g NaCl

4.2 g Sorbitol

ad 100 ml ddH₂O

Vor der Verwendung wurden 90 ml des Einfriermediums mit 35 ml sterilem Glycerol gemischt.

Erythrozytenlyse-Puffer:

10 % 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)

90 % 0.16 M Ammoniumchlorid

FACS-Puffer:

1 % FCS

0.1 % NaN₃ in PBS

Farbsubstratlösung (ELISA):

200 µl TMB-Stammlösung

1.2 µl Wasserstoffperoxid (30 %)

ad 12 ml Substratpuffer

IMDM/ 10 % FCS (Vollmedium):

500 ml IMDM
50 ml FCS
5 ml L-Glutamin (200 mM)
2.5 ml Gentamycin

Kulturmedium für Knochenmarksmakrophagen:

IMDM/ 10 % FCS-Vollmedium
30 % L929-Kulturüberstand
5 % Pferdeserum

MACS (magnetic cell sorting)-Puffer:

2 mM EDTA
0.5 % BSA in 1x PBS

Nycodenz-Lösung:

30% NycoPrep[®] in dH₂O

PFHM-II-Medium für Hybridomzellen:

500 ml PFHM-II
2.5 ml Gentamycin

RPMI/ 10 % FCS (Vollmedium):

500 ml RPMI 1640
50 ml FCS
5 ml L-Glutamin (200 mM)
2.5 ml Gentamycin

Stopp-Puffer (ELISA):

2 M H₂SO₄

Substratpuffer (ELISA):

100 mM NaH₂PO₄
pH 5.5

TMB-Stammlösung:

30 mg Tetramethylbenzidin
5 ml Dimethylsulfoxid

Trypanblau-Lösung:

2 mg in 100 ml PBS

Waschpuffer (ELISA):

0.05 % Tween 20 in PBS

Wright's stain:

1 mg/ml in Methanol

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen molekularbiologischen Methoden sind detailliert im nachfolgenden Labor-Handbuch beschrieben:

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

2.2.1.1 RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen

Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen wurde nach der *Acid-Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform* (AGPC)-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) isoliert. Dabei finden Zellyse, Denaturierung und Phenol-Chloroform-Extraktion in einem Schritt statt, wobei in der Lösung vorhandene RNasen sofort inaktiviert werden. Zur RNA-Präparation wurde die gebrauchsfertige AGPC-Lösung TRI Reagent[®] sowie RNase-freie Reagenzien und Pipettenspitzen verwendet. Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.2 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Die reverse Transkription stellt ein Verfahren dar, bei dem mit Hilfe einer retroviralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase komplementäre einzelsträngige DNA (cDNA) aus RNA erzeugt wird. Dazu wurde präparierte Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen verwendet und zur Expressionsanalyse nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung auf gleiche RNA-Konzentrationen eingestellt. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase und einem Oligo(dT)₁₅-Primer, der an die Poly(A)-Schwänze der mRNA-Moleküle hybridisiert. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde mit 4 µl Oligo(dT)₁₅-Primer-Lösung versetzt und mit RNase-freiem dH₂O auf ein Volumen von 11 µl aufgefüllt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 70 °C wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Gemisch (10 mM), 2 µl DTT-Lösung (100 mM) und 1 µl Powerscript Reverse Transkriptase zugefügt und der Ansatz eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Die Beendigung der reversen Transkription erfolgte durch Erwärmen des Reaktionsansatzes auf 70 °C für 15 Minuten.

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten (Saiki et al., 1988). Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird zu einem einzelsträngigen DNA-Strang, der als Matrize dient, ein komplementärer Strang synthetisiert. Die als Doppelstrang vorliegenden DNA-Fragmente (oder auch DNA-RNA-Hybride nach einer reversen Transkription) werden durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Das anschließende Abkühlen ermöglicht die Hybridisierung von zwei Oligonukleotid-Primern an die Matrize, an die dann durch eine thermostabile DNA-Polymerase Nukleotide in 5'→3'-Richtung angefügt werden (Elongation). Die aufeinander folgenden Zyklen aus Denaturierung, Primer-Bindung und Elongation ermöglichen die exponentielle Synthese der zu amplifizierenden DNA.

Die verwendete Taq-DNA-Polymerase wurde den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden autoklavierte Reaktionsgefäße sowie gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wiesen die Reaktionsansätze die folgende Zusammensetzung auf:

DNA-Template	x µl (50 - 500 ng)
Primer #1 [sense] (10 µM)	2.5 µl
Primer #2 [antisense] (10 µM)	2.5 µl
10x Taq-Puffer (mit MgCl ₂)	2.5 µl
dNTP-Mischung (2 mM)	2.5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl
autoklaviertes dH ₂ O	ad 25 µl

Die Reaktionsansätze wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und in einen Thermocycler überführt, in dem die zyklische DNA-Amplifikation stattfand. Das verwendete PCR-Programm variierte in Abhängigkeit von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Für die Expressionsanalyse von BTLA und HVEM wurden serielle Verdünnungen der cDNA erstellt und die Konzentration der für die PCR eingesetzten cDNA anhand des konstitutiv exprimierten Gens β -Aktin (Bandenintensität nach RT-PCR) ermittelt. Ein häufig verwendetes PCR-Programm ist nachfolgend aufgeführt. Um mögliche Kontaminationen der Reagenzien auszuschließen, wurden bei jedem PCR-Lauf Negativkontrollen ohne DNA durchgeführt.

PCR-Programm:

initiale Denaturierung:	3 min	95 °C	
Denaturierung:	0.5 min	95 °C	} 35 Zyklen
Primer-Hybridisierung:	1 min	57 °C	
Elongation:	1 min	72 °C	
	10 min	72 °C	

Ein Aliquot der PCR-Produkte wurde nach jedem PCR-Lauf auf ein Agarosegel aufgetragen, um die entstandenen Amplifikate zu detektieren und die Spezifität der PCR zu überprüfen.

Zur Genotypisierung der HVEM^{-/-}-Mäuse wurde zunächst genomische DNA isoliert, indem je 0.5 cm große Schwanzstücke mit Direct PCR[®] Lysis-Reagenz, komplettiert mit 0.3 mg/ml Proteinase K, über Nacht bei 55 °C im Schüttler inkubiert wurden. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend bei 85 °C für 45 Minuten inkubiert, und 1 µl des Lysats wurde direkt für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Dabei waren die Primer HVEM-SP-5' und pJAK2 spezifisch für das inaktivierte HVEM-Allel, während das Wildtyp-Allel mit Hilfe der Primer HVEM-SP-5' und HVEM-SP-3' amplifiziert wurde. Unter Verwendung der genannten Oligonukleotid-Primer konnten somit Wildtyp-Mäuse sowie HVEM^{+/-}- und HVEM^{-/-}-Mäuse eindeutig voneinander unterschieden werden.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. Grundlage dafür ist die Wanderung von DNA-Molekülen entlang eines elektrischen Feldes, wobei diese umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Fragmentgröße erfolgt. In dieser Arbeit wurden -soweit nicht anders angegeben- jeweils 1%ige Gele verwendet. Zu analytischen Zwecken dienten dabei 1x TBE-Gele, während zur DNA-Präparation 1x TAE-Gele verwendet wurden. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde dem Agarosegel der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.4 µg/ml zugesetzt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Als Größenstandard und zur semiquantitativen Bestimmung der DNA-Mengen wurde jeweils zusätzlich ein DNA-Marker (100 bp plus bzw. 1 kb-Leiter) aufgetragen.

2.2.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist die Spaltung doppelsträngiger DNA möglich, weil die DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen in beiden Strängen geschnitten wird. Die Enzyme wirken sequenzspezifisch, wobei in der Regel palindromische Sequenzen erkannt werden. Die Restriktionsverdaue wurden in den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden 1-5 µg DNA eine Stunde bei 37 °C verdaut, während präparative Verdaue (>10 µg DNA) mindestens über drei Stunden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt wurden. Die erfolgreiche Spaltung der DNA wurde durch Auftragen eines Aliquots des Reaktionsansatzes auf ein 1%iges TBE-Gel überprüft.

2.2.1.6 Gelreinigung von DNA-Fragmenten

Um störende Salze, Proteine, Nukleotide oder Matrizen- bzw. Vektor-DNA zu entfernen, wurden PCR-Produkte oder DNA-Fragmente nach einem präparativen Restriktionsverdau über ein 1x TAE-Agarosegel aufgereinigt. Das gewünschte Fragment wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Isolierung aus der Agarose erfolgte mit dem QIAEX[®] II Gel Extraction-Kit und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Neben der Bestimmung der DNA-Konzentration anhand der Bandenintensität von DNA-Fragmenten im Agarosegel (durch Vergleich mit Markerbanden bekannter Konzentration) erfolgte die DNA-Konzentrationsbestimmung photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu wurden Verdünnungen der DNA-Lösung mit dH₂O erstellt und die Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke) gemessen. Ein Absorptionswert von 1.0 bei dieser Wellenlänge entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml an doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml an RNA. Protein-Verunreinigungen der DNA-Lösungen wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm und Berechnung des A_{260}/A_{280} -Quotienten detektiert. Für reine DNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1.8 und 2.0, für reine RNA-Lösungen zwischen 1.9 und 2.0. Niedrigere Werte deuten auf die Anwesenheit von Proteinen oder auch auf die unvollständige Entfernung von Phenolresten bei der DNA-Präzipitation hin.

2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente werden mit Hilfe einer Ligase miteinander verknüpft, die unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem freien 5'-Phosphatrest eines DNA-Stranges und einer freien 3'-Hydroxylgruppe eines benachbarten DNA-Stranges katalysiert. Es wurde dabei die aus dem Bakteriophagen T4 stammende Ligase verwendet, die sowohl stumpfe als auch überhängende Enden miteinander verbindet.

Klonierung von PCR-Produkten:

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das PCR Cloning Kit mit dem Vektor *pDrive* als Klonierungsvektor verwendet. Der Vektor liegt in linearisierter Form mit überhängenden Uracil-Resten an den 3'-Enden vor. Die Ligation wird dadurch erleichtert, dass durch die Terminale-Transferase-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase präferentiell Adeninnucleotide an das Ende der PCR-Produkte angefügt werden. Die Detektion positiver Klone erfolgt mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion, da PCR-Produkte in das *lacZ'*-Gen inseriert werden. Dieses wird durch die Insertion zerstört, so dass positive Klone eine weiße Farbe aufweisen. Die Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei die Ligationsansätze die nachfolgende Zusammensetzung aufwiesen.

<i>pDrive</i> Cloning Vector (50 ng/μl)	1 μl
PCR-Produkt	1 - 4 μl
2x Ligation Master-Mix	5 μl
autoklaviertes dH ₂ O	ad 10 μl

Klonierung in den Expressionsvektor *pcDNA3.1(+)*:

Bei *pcDNA3.1(+)* handelt es sich um einen Vektor, der die stabile Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen ermöglicht. Daneben enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen, das die Selektion von plasmidtragenden Bakterien in Gegenwart des Antibiotikums Ampicillin ermöglicht. Das DNA-Fragment, das für das zu exprimierende Protein codiert, wird nach einem Restriktionsverdau in die Polylinker-Sequenz eingefügt und steht dann unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Auf diese Weise ist eine Proteinexpression in größeren Mengen möglich.

Die Ligationen wurden jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktionen fanden in einem Gesamtvolumen von 10 μl statt, wobei je fünf Units T4-DNA-Ligase in jedem Ansatz vorhanden waren. Für alle Ligationen wurde ein Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA von 1:2 bis 1:10 eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden über Nacht im Wasserbad bei 16 °C inkubiert.

Um eine mögliche Religation der Vektor-DNA zu überprüfen, wurden Negativkontrollen mit dH₂O an Stelle der Insert-DNA durchgeführt. Ein Aliquot der ligierten DNA wurde zur Kontrolle der erfolgreichen Ligation auf ein 1 %iges TBE-Gel aufgetragen. Im Anschluss an die Ligation wurden die Ansätze direkt zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet.

2.2.1.9 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Da Bakterien von sich aus nur in geringem Umfang DNA aufnehmen, müssen sie zunächst in einen Zustand versetzt werden, in dem die DNA-Aufnahme effektiv möglich ist. Zu diesem Zweck wurden 5 ml einer LB-Kultur von *E. coli* DH5 α F angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. 200 ml LB-Medium wurden mit einem Aliquot der Übernachtskultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0.05 angeimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0.5 bis 0.6 erreicht war. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert (10 min, 3000 rpm, 4 °C), und das Pellet wurde in 20 ml TSB-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots von jeweils 100 μ l bei -70 °C aufbewahrt.

Transformation stellt die Einschleusung von DNA in Bakterienzellen dar. Ein Reaktionsansatz wies dabei folgende Zusammensetzung auf:

5x KCM-Puffer	20 μ l
DNA-Konstrukt	50 - 100 ng (1 μ l - 4 μ l des Ligationsansatzes)
dH ₂ O	ad 100 μ l
kompetente <i>E. coli</i> DH5 α F	100 μ l

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit den übrigen Komponenten des Reaktionsansatzes vermischt. Der Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis gestellt, danach zehn Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor er auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde.

Blau-Weiß-Selektion:

Mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion ist eine schnelle Identifikation von Bakterien möglich, die einen Vektor mit inseriertem DNA-Fragment aufgenommen haben. Zu diesem Zweck wurden die LB-Ampicillin-Platten vor der Transformation mit 50 μ l X-Gal-Stammlösung bestrichen. Weil das *lacZ'*-Gen durch Insertion eines DNA-Fragmentes in die Polylinker-Sequenz zerstört wird, können Bakterien in diesem Fall keine funktionelle β -Galactosidase mehr bilden und sind

deshalb nicht in der Lage, den Indigofarbstoff X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid) zu einem blauen Komplex zu oxidieren. Daher bleiben transformierte Bakterien weiß und können so anhand ihrer Färbung von Bakterien unterschieden werden, deren aufgenommener Vektor kein inseriertes DNA-Fragment enthält.

2.2.1.10 Plasmidpräparation aus Bakterien

Nach der Transformation der Plasmid-Konstrukte in kompetente Bakterien wurden diese vermehrt, um das Plasmid anschließend zu isolieren und für weitere Experimente einzusetzen. In Abhängigkeit von der benötigten Menge an Plasmid-DNA wurden verschiedene Arten der Präparation (Minipräparation, Maxipräparation) angewandt. Dabei werden Bakterienzellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen und bei der nachfolgenden Neutralisierung bakterielle Proteine, Membranreste und die Nucleoid-DNA ausgefällt, wohingegen die Plasmid-DNA im Überstand verbleibt. Durch Bindung der Plasmid-DNA an Anionenaustauschersäulen wird sie von störenden Salzen befreit und kann eluiert (Minipräparation) oder durch Isopropanol-Fällung isoliert werden (Maxipräparation).

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für analytische und präparative Restriktionsverdaue wurden Minipräparationen durchgeführt. Dazu wurde eine ausgewählte Bakterienkolonie in 5 ml LB-Amp-Medium transferiert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Pelletierung der Bakterien in einem Eppendorfgefäß (1 min, 13 000 rpm, RT) wurde die Minipräparation nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Transfektion eukaryontischer Zellen mittels der CaCl_2 -Phosphat-Methode waren große Mengen hochreiner und endotoxinfreier Plasmid-DNA erforderlich. Dazu wurden jeweils 200 ml LB-Amp-Medium mit Bakterien, die das gewünschte Plasmid-Konstrukt enthielten, angeimpft, diese über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler kultiviert und danach durch Zentrifugation pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des EndotoxFree-Plasmid-Prep-Kits nach Herstellerangaben isoliert und die getrocknete DNA in endotoxinfreiem dH_2O aufgenommen.

2.2.1.11 Kryokonservierung von Bakterien

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterien, die ein gewünschtes Plasmid-Konstrukt enthielten, wurden Glycerol-Stocks angelegt, aus denen dann Flüssigkulturen angeimpft wurden. Dazu wurden 850 μl einer 5-ml-Übernachtskultur in LB-Amp-Medium mit 150 μl sterilem Glycerol versetzt und in Kryogefäßen bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.1.12 DNA-Sequenzierung

Nach der Identifizierung von Bakterienklonen, die ein gewünschtes DNA-Fragment enthielten, wurden die entsprechenden Fragmente sequenziert, um mögliche Nukleotidaustausche und Leserasterverschiebungen auszuschließen. Zunächst wurde 1 µg der Plasmid-DNA-Lösung mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und anschließend eine Ethanol-fällung durchgeführt. Dazu wurden dem Ansatz 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 4.6) und 250 µl absolutes Ethanol zugegeben. Nach einer Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, Raumtemperatur) wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 14000 rpm, RT) wurde der Überstand quantitativ entfernt und das Pellet durch zehnmünütige Inkubation bei 37 °C getrocknet. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde mit den jeweiligen Primern zur Sequenzierung an *MWG Biotech* (Ebersberg) geschickt.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Messung der Konzentration einer Proteinlösung nach Bradford (1976) beruht auf der Bildung eines blau gefärbten Komplexes zwischen Proteinen und dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau. Die dadurch bedingte Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 630 nm wird zur photometrischen Detektion der Proteinkonzentration genutzt. In einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden zu jeweils 10 µl der zu messenden Probe 90 µl Bradford-Reagenz gegeben, und die Intensität der Blaufärbung wurde durch Messung der Extinktion bei 630 nm bestimmt. Anhand des Vergleichs mit einer BSA-Verdünnungsreihe war so die Quantifizierung des Proteingehalts von Lösungen möglich (jeweils Doppelwerte).

2.2.2.2 Aufreinigung von Antikörpern und Ig-Fusionsmolekülen

Antikörper wurden aus dem Überstand von Hybridomzellen, BTLA-Ig-Fusionsmolekül aus dem Überstand von stabil transfizierten CHO-Zellen mittels Protein-G-Säulen aufgereinigt. Bei dieser Methode binden Antikörper und Ig-Fusionsmoleküle über ihr F_C-Fragment an die Matrix der Protein-G-Säule und können auf diese Weise von anderen Proteinen getrennt werden. Die Säule wurde zunächst mit 50 ml Phosphatpuffer äquilibriert und anschließend mit dem Überstand der Hybridomzellen bzw. transfizierten CHO-Zellen beladen. Nach dem vollständigen Durchlauf des

Überstandes wurde die Säule mit 50 ml Phosphatpuffer gewaschen, woraufhin Antikörper bzw. BTLA-Ig-Fusionsmolekül mit 10 ml Glycinpuffer (pH 2.7) von der Säule eluiert wurden. Das Eluat wurde in einem Falcon-Gefäß aufgefangen und durch Zugabe von 1 M Tris/HCl (pH 8.0) neutralisiert. Die Protein-G-Säule wurde nach der Elution mit Phosphatpuffer gewaschen und in 20 % Ethanol gelagert. Daraufhin wurde mittels Dialyse ein Pufferwechsel des Eluats in 1x PBS durchgeführt, bevor die Proteinkonzentration bestimmt und der Verlauf der Aufreinigung über eine SDS-PAGE und nachfolgenden Westernblot kontrolliert wurde.

2.2.2.3 Dialyse

Mit Hilfe der Dialyse können niedermolekulare Substanzen aus einer Lösung entfernt und Pufferwechsel durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dialyse dazu verwendet, um verschiedene Antikörper und BTLA-Ig-Fusionsmolekül nach der Aufreinigung über eine Protein-G-Säule in 1x PBS umzupuffern. Dazu wurde ein Dialyseschlauch verwendet, der einige Minuten mit 1x PBS gespült und danach mit der Proteinlösung befüllt wurde. Nach Inkubation des Schlauches in fünf Litern 1x PBS bei 4 °C unter Rühren über Nacht wurde der Dialysepuffer durch fünf Liter frisches 1x PBS ersetzt und die Dialyse sechs Stunden bei 4 °C fortgesetzt. Anschließend wurde die im Dialyseschlauch befindliche Proteinlösung entnommen, aufkonzentriert und nach Prüfung der Reinheit durch SDS-PAGE/Westernblot bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.2.2.4 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Nach der Dialyse wurden Proteinlösungen, die Antikörper oder BTLA-Ig-Fusionsmolekül enthielten, aufkonzentriert, um ausreichend hohe Konzentrationen für *in vitro*-Tests zu erhalten und die Proteine ggf. auch *in vivo* einsetzen zu können. Dazu wurden Vivaspin®-Säulen bzw. Centricon®-YM-10-Filter verwendet, deren Poren eine Ausschlussgröße von 50 kDa bzw. 10 kDa aufweisen und daher jeweils nur kleinere Proteine passieren lassen. Nach Auftragen von jeweils 2 ml Proteinlösung auf den Filter wurde das Volumen durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4 °C) eingeeengt. Der Vorgang wurde so lange fortgesetzt, bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht war.

2.2.2.5 LPS-Konzentrationsbestimmung

Da von Bakterien freigesetztes Lipopolysaccharid (LPS) auf Proliferation und Zytokinsekretion von Zellen wirkt, wurden Lösungen der aufgereinigten Antikörper sowie des BTLA-Ig-Fusionsmoleküls mit dem Limulus Amebocyte Lysate Assay auf LPS-Kontaminationen untersucht. Der Test basiert auf der Reaktion des LPS mit Enzymen, die aus den Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* stammen (Watson et al., 1977). Der LPS-Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 50 µl von seriellen Verdünnungen der zu untersuchenden Proteinlösungen wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachbodenplatte aufgetragen, ebenso 50 µl einer Verdünnungsreihe einer LPS-Lösung bekannter Konzentration. Nach Zugabe von 50 µl LAL-Reagenz zur Proteinverdünnung und dem LPS-Standard und zehnmütiger Inkubation bei 37 °C wurde die LPS-LAL-Komplexbildung durch Zugabe von 100 µl Substratlösung quantifiziert. Die Farbreaktion (Farbumschlag nach gelb) wurde schließlich durch Zugabe von jeweils 50 µl 10 % SDS beendet und die Absorption bei 405 nm bestimmt.

2.2.2.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe durch die Wanderung in einem elektrischen Feld. Die Proteinstruktur wird dabei durch die denaturierende Wirkung des im Laufpuffer und Gel enthaltenen SDS aufgelöst, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine nur noch von ihrer Größe, jedoch nicht mehr von ihrer Form abhängt. Die Eigenladung der Proteine wird zudem durch die negative Ladung des SDS überdeckt, was dazu führt, dass die Proteine von der Kathode zur Anode wandern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lösungen, die Antikörper oder BTLA-Ig-Fusionsprotein enthielten, durch SDS-PAGE aufgetrennt. Dazu wurde ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, bei dem die Proteine zuerst mit Hilfe eines Sammelgels fokussiert und im Trenngel aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Es wurden jeweils 5 %ige Sammelgele und 10 %ige Trenngele verwendet. Die Proben wurden vor Beladung des Polyacrylamid-Gels mit 5x Beladungspuffer versetzt, fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und nach dem Abkühlen in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurden jeweils 10 µl eines vorgefärbten Protein-Molekulargewichtsmarkers verwendet. Die Elektrophorese wurde eine Stunde lang bei einer Spannung von 125 V durchgeführt.

2.2.2.7 Westernblot

Das Western Blotting stellt eine Methode dar, bei der Proteine unter Einfluss eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden, auf der die Proteine dann spezifisch mittels Antikörpern oder anderen an das Zielprotein bindenden Reagenzien detektiert werden. Im Rahmen der Arbeit diente der Westernblot dem Nachweis von aufgereinigten Antikörpern oder BTLA-Ig-Fusionsmolekül. Zur Überführung der Proteine auf die Membran wurde das Semi-Dry-Verfahren angewandt. Dazu wurden auf die Kathodenplatte der Blot-Kammer drei in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere aufgelegt, auf die dann das Gel und darüber die Nitrocellulosemembran geschichtet wurden. Der Stapel wurde daraufhin noch mit je drei in Anodenpuffer 2 bzw. in Anodenpuffer 1 äquilibrierten Whatman-Filterpapieren bedeckt, bevor die Anodenplatte aufgelegt wurde. Der Transfer auf die Membran erfolgte eine Stunde lang bei einer Stromdichte von 1 mA/cm^2 . Die Membran wurde anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur in 1x PBS mit 4 % Milchpulver inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu blockieren. Nach mehrfachem Spülen mit 0.1 % Tween-20 in 1x PBS wurde der jeweilige HRP-konjugierte Detektions-Antikörper (verdünnt in 1x PBS mit 1 % BSA) zugegeben und die Membran darin eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgten fünf Waschschriffe mit 0.1 % Tween-20 in 1x PBS für jeweils zehn Minuten, bevor die gebundenen Peroxidase-Moleküle mit Hilfe des ECL-Systems (ECL Western Blotting Detection Reagents) nachgewiesen wurden. Nachdem die Membran eine Minute lang in einer 1:1-Mischung der beiden ECL-Reagenzien inkubiert worden war, wurde sie in eine Filmkassette überführt und in der Dunkelkammer ein ECL-Film aufgelegt. Nach einminütiger Exposition fand die Entwicklung des Films in einem automatischen Entwickler statt.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Labormaterialien aus Kunststoff und Lösungen wurden vor Gebrauch 20 Minuten bei $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und 2.2 bar autoklaviert, Glasgeräte durch dreistündiges Erhitzen auf $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sterilisiert. Präparierbesteck wurde vor der Verwendung in 70 %iges Ethanol eingetaucht. Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 im Brutschrank. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Waschvorgänge fünf Minuten bei 1200 rpm und $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

2.2.3.2 Kultur von Zelllinien

CHO- und COS-1-Zellen wurden nach dem Auftauen in RPMI-Vollmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, während die Kultivierung von L929-Zellen in IMDM-Vollmedium bei 37 °C und 10 % CO₂ erfolgte. Antikörper-produzierende Hybridomzellen wurden nach dem Auftauen für einige Tage in IMDM-Vollmedium bei 37 °C und 10 % CO₂ expandiert. Um große Mengen an Antikörpern herstellen zu können, wurden die Hybridomzellen danach in proteinfreies PFHII-Medium überführt, das für die Kultivierung von Hybridomen besonders geeignet ist. Die weitere Kultivierung fand über 7-10 Tage in Rollerflaschen statt, bevor die Zellen abzentrifugiert wurden (10 min, 4500 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend sterilfiltriert, entgast und über eine Protein-G-Säule gegeben, um die Antikörper aufzureinigen. Stabil transfizierte CHO-Zellen wurden zur Produktion von BTLA-Ig-Fusionsmolekül in CELLline-Bioreaktoren nach Angaben des Herstellers kultiviert. Um störende, im FCS enthaltene Immunglobuline zu entfernen, wurde Ig-depletiertes RPMI-Vollmedium verwendet und die Zellen darin bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Jeden dritten Tag wurden die Zellen ausverdünnt, indem nach Auf- und Abpipettieren der Zellen die Hälfte des Kulturmediums durch frisches Vollmedium ersetzt wurde. Das abgenommene Medium wurde zentrifugiert (5 min, 4500 rpm, 4 °C), der BTLA-Ig enthaltende Überstand sterilfiltriert und bis zur Reinigung über eine Protein-G-Säule bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.3 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zahl an vitalen Zellen wurde der Trypanausschlusstest angewandt, der darauf beruht, dass lebende Zellen den Farbstoff aus dem Zellinneren ausschließen, während tote Zellen blau angefärbt werden. Jeweils 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau-Lösung versetzt; daraufhin wurde ein Aliquot der Mischung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden jeweils vier Großquadrate ausgezählt, woraufhin die Lebendzellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet wurde.

2.2.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Aufbewahrung eukaryontischer Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196 °C), da sie dort über lange Zeit gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden können. Zum Einfrieren wurden je $5 \cdot 10^6$ Zellen durch Zentrifugation pelletiert und langsam mit 1 ml vorgekühltem Einfriermedium versetzt. Dieses enthält 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), das stark hygroskopisch ist und so die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens verhindert.

Die Zellsuspension wurde danach in Kryoröhrchen pipettiert und diese über Nacht bei -70 °C gelagert, bevor sie in den flüssigen Stickstoff überführt wurden. Das Auftauen der Zellen erfolgte durch mehrfaches Waschen mit Vollmedium, um das DMSO zu entfernen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 10 ml Vollmedium resuspendiert und nach der Bestimmung der Zellzahl in Kultur genommen.

2.2.3.5 Blutentnahme und Gewinnung von Serum

Um Serum für die Bestimmung von Zytokinen und Leberenzymen im Verlauf der murinen Malaria zu erhalten, wurde die Maus mit Forene[®] (Wirkstoff Isofluran) narkotisiert und Blut durch Kardialpunktion entnommen. Nach vollständiger Gerinnung des Blutes wurde das Serum durch Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, Raumtemperatur) gewonnen und zur Messung von Leberenzymen (durchgeführt von Labor Fenner, Hamburg) oder Zytokinen im ELISA eingesetzt.

2.2.3.6 Präparation von murinen Milzzellen

Die Milz einer sechs bis zehn Wochen alten BALB/c- bzw. C57BL/6-Maus wurde unter der Sterilbank entnommen und mit RPMI-Medium ausgespült, um eine Einzelzellsuspension der Milzzellen zu erhalten. Nach Überführung der Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen und fünfminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C wurde das Pellet in 5 ml Erythrozytenlyse-Puffer resuspendiert, um die Erythrozyten durch hypotone Lyse zu entfernen. Die Inkubation der Zellen im Erythrozytenlyse-Puffer wurde nach zwei Minuten durch die Zugabe von 10 ml Vollmedium beendet. Die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml Vollmedium gewaschen, gezählt und danach für die weiteren Versuche eingesetzt.

2.2.3.7 Isolation von murinen Lymphozyten aus der Leber

Vor der Entnahme der Leber wurde diese über die Pfortader mit 5 ml PBS/10 %FCS durchspült. Die Leber wurde herauspräpariert und unter Zugabe von Medium in einem Zellsieb zerrieben, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Nach zehnminütiger Zentrifugation der Zellsuspension bei 1400 rpm und 4 °C wurde das Pellet in 1 ml purem RPMI-Medium aufgenommen und daraufhin mit 5,5 ml 30 % Nycodenz[®] Lösung versetzt. Diese Lösung dient zur Herstellung von Dichtegradienten, um Zellen oder Zellorganellen aufzureinigen. 2 ml RPMI-Medium wurden anschließend mit der Zellsuspension unterschichtet und der Ansatz zur Ausbildung des Dichtegradienten eine halbe Stunde bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert. Dadurch wurden

Hepatozyten, Erythrozyten und Zelldebris von der Lymphozytenpopulation abgetrennt, so dass diese anschließend mit Hilfe einer Pipette abgenommen werden konnte. Die Zellen wurden in Vollmedium gewaschen (5 min, 1200 rpm, 4°C), bevor die Zellzahl bestimmt wurde.

2.2.3.8 Präparation von murinen Zellen aus dem Gehirn

Um im Verlauf der murinen Malaria die Funktion von BTLA bei der Sequestration von Leukozyten im Gehirn zu analysieren, wurden die Hirne von mit anti-BTLA- bzw. Kontroll-Antikörper behandelten C57BL/6-Mäusen am Tag 6 nach *P. berghei*-Infektion herauspräpariert. Eine Hälfte des Gehirns wurde dabei in Einbettmedium zur Herstellung von Gefrierschnitten eingefroren, während die andere Hälfte in RPMI-Medium zerrieben und über ein Zellsieb gegeben wurde, um eine homogene Zellsuspension zu erzeugen. Diese wurde fünf Minuten bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 5 ml Erythrozytenlyse-Puffer aufgenommen. Der Puffer wurde nach zweiminütiger Inkubation der Zellen durch Zugabe von 10 ml RPMI-Medium ausverdünnung, bevor erneut eine Zentrifugation (5 min, 1200 rpm, 4 °C) stattfand. Die Zellen wurden in Medium gewaschen und gezählt, bevor sie mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer analysiert wurden.

2.2.3.9 Generierung von murinen Knochenmarksmakrophagen

Die Reifung von Makrophagen aus murinen Knochenmarks-Stammzellen ist durch Kultivierung der Zellen in Gegenwart des Differenzierungsfaktors M-CSF möglich, der im Überstand von L929-Zellen in ausreichend hoher Konzentration enthalten ist. Für dessen Herstellung wurden die L929-Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät und in IMDM-Vollmedium bei 37 °C und 10 % CO₂ kultiviert, bis diese konfluent waren. Die Kultivierung wurde danach weitere 10-14 Tage fortgesetzt und der Überstand schließlich zehn Minuten bei 4500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach einer Sterilfiltration des L929-Überstandes wurde dieser bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die Präparation der Knochenmarks-Stammzellen wurden Femur und Tibia einer sechs bis zehn Wochen alten C57BL/6-Maus unter der Sterilbank entnommen und die Zellen mit RPMI-Medium herausgespült. Die Zellen wurden gezählt und jeweils $0,25 \cdot 10^6$ /ml Knochenmarkszellen in 2 ml Makrophagen-Kulturmedium (IMDM-Vollmedium mit 30 % L929-Überstand und 5 % Pferdeserum) in den Vertiefungen einer 6-Loch-Zellkulturplatte kultiviert. Am dritten Tag der Kultivierung wurden weitere 2 ml Makrophagen-Kulturmedium zugegeben, an den Tagen 6 und 8 nach Präparation nochmals je 2 ml Medium durch frisches Makrophagen-

Kulturmedium ersetzt. Die Knochenmarksmakrophagen wurden am Tag 10 geerntet und direkt für die weiteren Versuche eingesetzt.

2.2.3.10 Stimulation von murinen Milzzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Milzzellen von C57BL/6-, OT-I- und OT-II-Mäusen *in vitro* stimuliert, um Effekte des anti-BTLA-Antikörpers 6A6 und des BTLA-Ig-Fusionsmoleküls auf die Proliferation und IL-2-Produktion zu untersuchen. Dabei wurde der Einfluss von BTLA-Ig dadurch analysiert, dass C57BL/6-Milzzellen und MACS-gereinigte T-Zellen mit anti-CD3-Antikörper in Gegenwart verschiedener Konzentrationen BTLA-Ig-Fusionsmolekül stimuliert wurden. Dazu wurden je $2 \cdot 10^5$ Milzzellen in jede Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert und in einem Endvolumen von 200 μ l kultiviert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden 150 μ l Kulturüberstand für Zytokin-ELISAs abgenommen, außerdem wurde die Proliferation der Zellen gemessen.

Um die Wirkung des anti-BTLA-Antikörpers 6A6 auf die Proliferation und Zytokinsekretion von Milzzellen zu untersuchen, wurden die Vertiefungen einer 96-Loch-Zellkulturplatte über Nacht bei 4 °C mit verschiedenen Konzentrationen an anti-BTLA- oder Kontroll-Antikörper beschichtet. Die Platte wurde daraufhin mit 1x PBS gewaschen und mit je $2 \cdot 10^5$ Milzzellen/Vertiefung befüllt. Als antigene Stimuli wurden verschiedene Konzentrationen der Peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (für T-Zellen aus OT-I-Mäusen) bzw. OVA₃₂₃₋₃₃₉ (für T-Zellen aus OT-II-Mäusen) eingesetzt. Die genauen Stimulationsbedingungen sind dabei an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben. Nach 48-stündiger Inkubation wurden 150 μ l Kulturüberstand für die Zytokin-ELISAs abgenommen.

2.2.3.11 Messung der Zellproliferation

Die Messung der Zellproliferation erfolgte anhand des Einbaus von ^3H -Thymidin in die DNA von sich teilenden Zellen, wobei die inkorporierte Radioaktivität als Maß für die Proliferation diente. Nach 48-stündiger Inkubation der in einer 96-Loch-Kulturplatte unter den jeweiligen Stimulationsbedingungen kultivierten Zellen wurden 150 μ l Zellüberstand abgenommen und für Zytokin-ELISAs verwendet. Anschließend wurden je 50 μ l ^3H -Thymidin-Vollmedium (10 $\mu\text{Ci/ml}$) zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5 % CO_2 für acht bis 16 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden danach mit Hilfe eines automatischen Zellerntegeräts (Micro Cell Harvester) aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte entnommen und auf einen Glasfaserfilter

aufgebracht. Nach fünfminütigem Trocknen des Filters in der Mikrowelle wurde dieser mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit befeuchtet und in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die Messung der in die DNA eingebauten Radioaktivität erfolgte mit einem β -Szintillationszähler. Die gemessene Radioaktivität wurde in Zerfällen pro Minute (cpm) angegeben.

2.2.3.12 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mit Hilfe eines ELISAs kann die Konzentration einzelner in Lösung befindlicher Proteine bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sandwich-ELISAs dazu verwendet, um die Konzentration von Zytokinen (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, IFN- γ , TNF- α) in Zellüberständen und Sera zu quantifizieren. Die Detektion beruht darauf, dass das Zytokin nach Bindung an einen immobilisierten Antikörper durch einen zweiten Antikörper nachgewiesen wird. Dabei ermöglichen die Biotinylierung des Detektions-Antikörpers und die nachfolgende Inkubation mit Streptavidin-HRP-Konjugat eine Signalverstärkung.

96-Loch-ELISA-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Capture-Antikörper in Coating-Puffer beschichtet (50 μ l/Well). Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden freie Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation der Platten mit 200 μ l Blockpuffer/Vertiefung bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgten drei Waschschritte mit Waschpuffer, bevor 50 μ l der Zellüberstände zugegeben wurden. Für jede Probe wurden jeweils Doppel- oder Dreifachbestimmungen vorgenommen, um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen. Auf jeder Platte wurde zudem eine Verdünnungsreihe eines externen Standards mitgeführt (jeweils Doppelwerte). Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen der ELISA-Platte erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und daraufhin mit je 50 μ l des biotinylierten Detektions-Antikörpers inkubiert (verdünnt in 1x PBS mit 0.1 % BSA). Die Platte wurde eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt und nach drei weiteren Waschvorgängen mit Waschpuffer das Streptavidin-HRP-Konjugat zugegeben (1:200 in 1x PBS mit 0.1 % BSA verdünnt). Nach halbstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen der ELISA-Platte wurden 100 μ l Farbsubstratlösung in jede Vertiefung pipettiert. Die durch die HRP katalysierte Reaktion des farblosen Tetramethylbenzidins zu einem blauen Farbstoff wurde nach fünf bis zehn Minuten durch Zugabe von je 25 μ l Stopp-Puffer beendet. Daraufhin wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und anhand des mitgeführten Standards die jeweilige Zytokin-Konzentration berechnet.

2.2.3.13 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen. Dabei können die Zellen transient oder permanent (stabil) transfiziert werden. Während es bei einer stabilen Transfektion zur Integration der DNA ins Genom der Zielzelle kommt, wird die DNA bei einer transienten Transfektion zwar in den Zellkern aufgenommen, jedoch nicht ins Genom integriert und nach einigen Tagen abgebaut. Für die stabile Transfektion eignet sich am besten linearisierte DNA, da sie mit höherer Effizienz in das Genom integriert wird (Recillas-Targa, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden COS-1-Zellen transient mit Konstrukten transfiziert, die für die Transmembranproteine BTLA und HVEM codierten. Zudem wurden transiente Transfektionen mit Konstrukten durchgeführt, die für BTLA-Ig codierten. Für transiente Transfektionen unter Testbedingungen wurde das Transfektionsreagenz FuGENE6[®] eingesetzt, während die CaCl₂-Phosphat-Präzipitation als Methode angewandt wurde, um Zellen stabil zu transfizieren. Hierbei wird die gereinigte DNA mit Calciumchlorid in Gegenwart von Phosphatpuffer vermischt. Der entstehende Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA wird dann über Endozytose in das Zellinnere aufgenommen. Zur transienten Transfektion mittels FuGENE wurden COS-1-Zellen in einer 6-Loch-Zellkulturplatte kultiviert, bis sie etwa 70 % konfluent waren. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und durch 2 ml frisches Vollmedium ersetzt. Der Transfektionsansatz enthielt 100 µl RPMI-Medium, 4 µl FuGENE6-Reagenz sowie 1 µg DNA. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach halbstündiger Inkubation des Transfektionsansatzes bei Raumtemperatur wurde dieser zu den COS-1-Zellen zugegeben und diese anschließend für 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Der Erfolg der Transfektion wurde durch eine FACS-Färbung überprüft.

Um größere Mengen des BTLA-Ig-Fusionsproteins herzustellen, wurden CHO-Zellen stabil nach der CaCl₂-Phosphat-Methode transfiziert (Chen et al., 1987). Die Transfektion erfolgte in 6-Loch-Zellkulturplatten, sobald die CHO-Zellen eine Konfluenz von 70 % erreicht hatten. Vor Beginn der Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit 2 ml frischem IMDM-Vollmedium durchgeführt. Zur Herstellung des Präzipitats wurden 110 µl des zu transfizierenden Plasmids (40 µg/ml) sowie 125 µl 2x HBS in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und langsam 16 µl CaCl₂ (2 M) zugetropft. Das dabei entstandene Präzipitat blieb 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen, bevor der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert wurde. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 10 % CO₂ wurden die CHO-Zellen trypsinisiert und in RPMI-Vollmedium ausverdünnt, dem das Selektionsantibiotikum G418 zugesetzt war.

2.2.3.14 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass die zu analysierenden Zellen einzeln in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden und Photomultiplikatoren bei diesem Vorgang die Streuung des Laserlichts detektieren. Die Vorwärtsstreuung korreliert dabei mit der Größe der Zellen, während die seitliche Streuung ein Maß für die Granularität der Zellen darstellt. Darüber hinaus können die Zellen auf die Expression von Oberflächenproteinen, aber auch intrazellulären Proteinen untersucht werden, wenn diese durch Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper markiert sind. Die gebräuchlichsten Fluorochrome sind Phycoerythrin (PE), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Allophycocyanin (APC). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie dazu genutzt, Zellpopulationen in Milz, Leber und Gehirn von *P. berghei* ANKA- bzw. *P. yoelii*-infizierten Mäusen zu identifizieren und die Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen im Verlauf der Infektionen zu analysieren. Darüber hinaus wurden intrazelluläre Färbungen durchgeführt, um regulatorische T-Zellen (T_{reg}) anhand der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 zu identifizieren und BTLA-Ig-Fusionsprotein im Inneren von transfizierten CHO-Zellen nachzuweisen. Zum Waschen der Zellen (je 2 ml pro Probe und Waschvorgang) und zum Ansetzen der jeweiligen Antikörper-Verdünnungen wurde FACS-Puffer verwendet. Abhängig von der jeweiligen Färbung wurden $1 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Färbung eingesetzt und durch Zentrifugation pelletiert. Für die Färbung von Oberflächenproteinen wurden die Zellen in 100 μ l F_c-Blockierungslösung resuspendiert, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Nach zehnminütiger Inkubation der Zellen bei 4 °C wurden die FITC-, PE-, PerCP- bzw. APC-konjugierten Primärantikörper anti-CD4 (1:400), anti-CD8a (1:100), anti-CD19 (1:100), anti-CD25 (1:50), anti-CD45 (1:400), anti-CD62L (1:200) bzw. anti-CD69 (1:100) oder Isotyp-Kontrollantikörper in ihrer jeweiligen Verdünnung zugegeben und der Ansatz 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zur Analyse der BTLA-Expression wurde Anti-BTLA-Antikörper (PE-konjugiert, 1:100) eingesetzt. Mehrfachfärbungen mit Fluorochrom-konjugierten Primärantikörpern wurden durchgeführt, indem die Antikörper in ihrer jeweiligen Verdünnung in einem gemeinsamen Ansatz auf die Zellen pipettiert wurden. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen dann direkt durch Resuspendieren in 1x PBS mit 1 % PFA fixiert. Bei Färbungen mit unmarkierten Primärantikörpern wurden die Zellen vor der Fixierung noch 30 Minuten mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Proben bis zur Analyse im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Bei jedem Experiment wurden zudem Färbungen mit Isotyp-Kontrollantikörpern durchgeführt, um das Ausmaß einer unspezifischen

Antikörperbindung beurteilen zu können. Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des FACScalibur Flow Cytometers sowie dem Programm Cell Quest.

Für die intrazelluläre Färbung von Foxp3 wurde das Foxp3-PE Staining Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils $2-3 \times 10^5$ Zellen pro Färbung eingesetzt. Vor der intrazellulären Färbung mit dem anti-Foxp3-Antikörper wurden die auf der Zelloberfläche exprimierten Proteine CD4 und CD25 gefärbt. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen über Nacht mit Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit Permeabilisierungs-Puffer wurden diese eine halbe Stunde mit $0.5 \mu\text{g}$ Anti-Foxp3-Antikörper inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungs-Puffer gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Zur intrazellulären Färbung des BTLA-Ig-Fusionsmoleküls in transfizierten CHO-Zellen wurden diese zunächst durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 1200 rpm, 4°C), bevor sie durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ Cytofix/Cytoperm[®] permeabilisiert wurden. Nach zehnminütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen einmal in $1 \text{ ml } 1\text{x}$ Cytoperm/Wash[®] gewaschen und mit $1 \text{ ml } 1\text{x}$ Cytoperm/Wash 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und $100 \mu\text{l}$ 1x Cytoperm/Wash sowie $10 \mu\text{l}$ Mausserum zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung zugegeben. Dann wurde PE-konjugierter Anti-human-IgG-Antikörper zupipettiert ($1:100$ in 1x Cytoperm/Wash verdünnt) und der Ansatz 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit 1 ml Cytoperm/Wash, bevor die Proben zweimal mit je 2 ml FACS-Puffer gewaschen wurden. Die Zellen wurden durch Resuspendieren in $300 \mu\text{l}$ 1x PBS mit 1% PFA fixiert und bis zur durchflusszytometrischen Analyse im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3.15 Zytospin

Durch einen Zytospin können Zellen auf einem Objektträger fixiert werden. Zur Analyse der CTLA-4-Expression im Verlauf einer *P. yoelii*-Infektion wurden Milzzellen am Tag 6 nach der Infektion präpariert, mit RPMI-Medium gewaschen und in einer Zahl von 1×10^5 Zellen/ml in RPMI-Medium aufgenommen. In der Zwischenzeit wurde die Zytospin-Kammer vorbereitet, bei der es sich um einen Objektträger handelt, auf dem eine Probenkammer fixiert ist. Zwischen Objektträger und Kammer befindet sich saugfähiges Papier, das in der Mitte einen kreisrunden Ausschnitt von ca. 1 cm Durchmesser aufweist. Die Zellsuspension wurde in die Probenkammer pipettiert und zehn Minuten bei 600 rpm zentrifugiert, um die Zellen auf den Objektträger aufzubringen. Die auf dem Objektträger befindlichen Zellen wurden anschließend durch einminütige Inkubation in Aceton fixiert. Zur intrazellulären Färbung von CTLA-4 wurden die

Zytospins 30 Minuten mit 50 µl Alexa568-konjugiertem anti-CTLA-4-Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zytospins in 1x PBS (je fünf Minuten) folgte eine Inkubation mit Alexa488-konjugiertem anti-CD4- bzw. FITC-konjugiertem anti-CD8-Antikörper (jeweils 1:50 verdünnt in 1x PBS). Nach erneutem Waschen der Zytospins wurde die Anzahl der CD4⁺CTLA-4⁺ und CD8⁺CTLA-4⁺ T-Zellen pro Gesichtsfeld im Verhältnis zur Gesamtzahl an T-Zellen im Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

2.2.3.16 Anreicherung von Zellen durch magnetische Zellsortierung (MACS)

Die magnetische Zellsortierung (MACS) stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe Zellen angereichert werden können, die bestimmte Oberflächenproteine aufweisen. Auf diese Weise können aber auch Zellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker depletiert werden (negative Selektion). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die magnetische Zellsortierung angewandt, um CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (T_{reg}) aus der Milz von Mäusen zu isolieren. Diese wurden anschließend mit anti-CD3 in Gegenwart des BTLA-Ig-Fusionsmoleküls stimuliert. Zur Isolierung von T_{reg} wurde das CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cell Isolation Kit verwendet, wobei die Durchführung nach Herstellerangaben erfolgte. Zur Entfernung der übrigen Milzzellen dient die Inkubation der Zellen in einer Mischung verschiedener biotinylierter Antikörper (gegen die Oberflächenmoleküle CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und Glycophorin A gerichtet), wodurch es im nachfolgenden Schritt zur Bindung markierter Zellen an magnetische Partikel über daran gekoppelte Anti-Biotin-Antikörper kommt. Mit Hilfe eines Magneten und spezieller Säulen können die unmarkierten T-Zellen in MACS-Puffer eluiert werden, während die an die Metallpartikel gebundenen restlichen Milzzellen zurückgehalten und dadurch abgetrennt werden. Die Anreicherung von T_{reg} erfolgt im nächsten Schritt durch Markierung der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit einem PE-konjugierten anti-CD25-Antikörper und nachfolgende Bindung der Zellen an anti-PE-Microbeads. Nach der Isolierung von CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden diese zweimal mit RPMI-Medium gewaschen, in 10 ml Vollmedium resuspendiert, gezählt und danach für *in vitro*-Tests eingesetzt.

2.2.3.17 Herstellung von Gefrierschnitten

Auf Gewebeschnitten kann die Struktur von Organen, die Anordnung bestimmter Zelltypen in den Organen sowie die Lokalisation von Organellen oder Proteinen innerhalb von Zellen untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gefrierschnitte von Gehirn und Leber von uninfizierten Mäusen sowie *P. berghei* ANKA-infizierten Mäusen (nach Behandlung mit anti-

BTLA- oder Kontroll-AK) angefertigt, um Vergleiche hinsichtlich der Zellinfiltration in diese Organe im Verlauf der Infektion anzustellen. Dabei wurden Gefrierschnitte angefertigt, da sie sich im Vergleich zu Paraffinschnitten besser für immunhistologische Färbungen eignen. Nach der Entnahme von Gehirn bzw. Leber wurden Teile der Organe in Einbetttröhrchen überführt, mit Einbettmedium überschichtet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Mit Hilfe eines Kryostaten (Frigocut 2700) wurden 5-8 µm dicke Schnitte hergestellt und auf einen silanisierten Objektträger überführt. Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, eine Minute in Aceton fixiert und über mehrere Stunden getrocknet. Bis zur Färbung wurden die Gefrierschnitte bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.18 Immunhistochemische Färbungen

Nach dem Auftauen der bei -20 °C aufbewahrten Gefrierschnitte wurden diese zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung mit 50 µl Cohn-II-Lösung 15 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die T-Zellen in den Gefrierschnitten der Leber durch die Zugabe von 50 µl der jeweiligen FITC-konjugierten Antikörper (anti-CD4 bzw. anti-CD8a, jeweils 1:50 in Cohn-II verdünnt) gefärbt. Nach Zugabe des Primärantikörpers wurden die Schnitte in eine feuchte Kammer gelegt und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Es folgten zwei fünfminütige Waschschritte mit 1x PBS, bevor zur Signalverstärkung 100 µl eines Alexa-Fluor488-konjugierten anti-FITC-Antikörpers zugegeben wurden (1:1000 in 1x PBS verdünnt). Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI-Stammlösung (1:1000 in 1x PBS verdünnt) verwendet. Die mit einem Deckgläschen abgedeckten Schnitte wurden im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und zur Dokumentation fotografiert.

Gefrierschnitte des Gehirns wurden nach dem Blockieren mit Cohn-II-Lösung im ersten Färbeschritt mit unmarkiertem Hamster-anti-ICAM-I- und biotinyliertem anti-CD31-Antikörper inkubiert (1:25 bzw. 1:200 verdünnt in Cohn-II). Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS (jeweils fünf Minuten) wurde im zweiten Färbeschritt mit Alexa-Fluor488-konjugiertem anti-CD8a-Antikörper (1:100), anti-Hamster-TRITC (für ICAM-I-Färbung, 1:800), Streptavidin-Cy5 (für CD31-Färbung, 1:500) und DAPI-Stammlösung (1:2000) gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte nach Abdeckung durch ein Deckgläschen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.2.4 Tierversuche

2.2.4.1 Infektion von Mäusen mit *Plasmodium berghei* ANKA

Um den Effekt des anti-BTLA-Antikörpers 6A6 bzw. des BTLA-Ig-Fusionsproteins auf den Verlauf der murinen Malaria zu analysieren, wurden 200 µg anti-BTLA- oder 200 µg Kontroll-Antikörper bzw. 20 µg BTLA-Ig einen Tag vor der Infektion in 6-10 Wochen alte C57BL/6-Mäuse intraperitoneal injiziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Mäuse i.p. mit *P. berghei* ANKA-Stabilat infiziert. Zur Herstellung des Stabilats wurde eine Balb/c-Maus mit *P. berghei*-Sporozoiten infiziert, die frisch aus den Speicheldrüsen von *Anopheles stephensi*-Mücken präpariert worden waren (wurden zur Verfügung gestellt von Dr. V. Heussler, BNI Hamburg). Die Sporozoiten wurden dabei 20 bis 25 Tage nach Infektion der Mücken herauspräpariert. Wenn die *P. berghei* ANKA-infizierte Maus eine Parasitämie von 10-15 % aufwies, wurde sie mit Forene[®] narkotisiert und Blut durch Kardialpunktion entnommen. Je $4 \cdot 10^7$ *Plasmodium*-infizierte Erythrozyten wurden dann in 250 µl einer 0.9 %igen NaCl-Lösung aufgenommen. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Einfriermedium wurden Aliquots von je 250 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Vor der Infektion wurde die Zellzahl mit 1x PBS auf $1.0 \cdot 10^7$ infizierte Erythrozyten/ml eingestellt, woraufhin 100 µl der Lösung (also je $1.0 \cdot 10^6$ infizierte Erythrozyten pro Maus) i.p. injiziert wurden. Sechs Tage nach der Infektion wurden erstmals Ausstriche aus Schwanzblut erstellt, um die Parasitämie zu bestimmen. Dazu wurden die Blutausriche mit Wright's stain-Lösung gefärbt, und die Zahl der infizierten Erythrozyten wurde mikroskopisch bestimmt. Die Parasitämie wird dabei als prozentualer Anteil der infizierten Erythrozyten an der Gesamtzahl an Erythrozyten angegeben.

Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *P. berghei* ANKA stellt ein Modell dar, das einige Charakteristika der zerebralen Malaria beim Menschen aufweist. Vergleichbar zur humanen CM kommt es ebenfalls zur Sequestration von infizierten Erythrozyten, aber auch von Leukozyten an das Hirnendothel, was zu neurologischen Schädigungen (Ataxien, Konvulsionen, Koma) und schließlich zum Tod der betroffenen Mäuse führt. Um Effekte des anti-BTLA-Antikörpers 6A6 bzw. des BTLA-Ig-Fusionsproteins auf die Inzidenz der CM zu untersuchen, wurden *P. berghei* ANKA-infizierte Mäuse täglich auf neurologische Symptome (verminderte Reflexe, Ataxie, Koma) hin beobachtet. Beim Auftreten von CM wurde die Maus getötet, um unnötiges Leiden zu vermeiden.

2.2.4.2 Infektion von Mäusen mit *Plasmodium yoelii* (Py17NL und Py-lethal)

Während eine Infektion von Mäusen mit *P. berghei* ANKA in jedem Fall tödlich verläuft, weil die Mäuse entweder an zerebraler Malaria oder unkontrollierter Parasitämie versterben, läuft eine Infektion mit *P. yoelii* 17NL (Py17NL) in der Regel nicht tödlich ab. Die Immunantwort führt zur Kontrolle der Parasitämie und schließlich zur Beseitigung Py17NL-infizierter Erythrozyten. Um den Effekt einer CTLA-4-Blockade auf den Verlauf einer Py17NL-Infektion zu untersuchen, wurde 6-10 Wochen alten Balb/c-Mäusen 500 µg anti-CTLA-4-Antikörper oder die gleiche Menge Kontroll-Antikörper i.p. injiziert. Einige Stunden später erfolgte die Py17NL-Infektion durch Injektion von Stabilat, wobei jeder Maus $5 \cdot 10^6$ infizierte Erythrozyten i.p. injiziert wurden. Eine zufällig bei der *in vivo*-Mauspassage auftretende Py17NL-Variante wurde Py-lethal genannt, da sie durch einen schnelleren Anstieg der Parasitämie und höhere Letalität gekennzeichnet war (reproduzierbar ca. 30 % Letalität in Balb/c-Mäusen). Stabilat der Variante Py-lethal wurde ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur Infektion von Balb/c-Mäusen verwendet. In regelmäßigen Abständen nach der Infektion mit Py17NL bzw. Py-lethal wurden zur Bestimmung der Parasitämie Ausstriche aus Schwanzblut mit Wright's stain gefärbt. Das Überleben der Mäuse wurde täglich beobachtet, wobei Mäuse mit einer Parasitämie >80 %, komatöse oder moribunde Mäuse getötet wurden.

2.2.5 Statistik

Sofern im Ergebnisteil der Arbeit nicht anders angegeben, wurde zur statistischen Auswertung der Experimente Student's t-test angewandt. ANOVA diente zur Analyse von Experimenten, bei denen mehr als zwei Gruppen an Mäusen (z.B. bei der Analyse von Parasitämien) miteinander verglichen wurden. Zur statistischen Auswertung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven diente der Log-Rank-Test. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil der Arbeit wird der Einfluss der Blockade des Koinhibitors CTLA-4 auf die Immunantwort im Verlauf der Infektion mit verschiedenen *P. yoelii*-Stämmen beschrieben. Der zweite Teil ist der Untersuchung der Funktion des Koinhibitors BTLA bei der T-Zellregulation im Verlauf der *P. berghei* ANKA-Infektion gewidmet.

3.1 Die Funktion von CTLA-4 bei der T-Zellregulation im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion

Der Effekt der Blockade des Koinhibitors CTLA-4 auf den Verlauf der PbA-Infektion wurde bereits untersucht (Jacobs et al., 2002). Die Applikation eines blockierenden Anti-CTLA-4-Antikörpers führte dabei zu einer Steigerung der Inzidenz an CM. Gleichzeitig kam es nach der Blockade von CTLA-4 zu einer verstärkten Leberpathologie (Jacobs et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der CTLA-4-Blockade auf den Verlauf der murinen *P. yoelii*-Infektion untersucht werden. Im Gegensatz zur PbA-Infektion, die eine polarisierte T_H1 -Antwort auslöst, ist eine *P. yoelii*-Infektion durch die regulierte Freisetzung von T_H1 - und T_H2 -Zytokinen gekennzeichnet (Omer et al., 2003). Für die *in vivo*-Blockade von CTLA-4 wurde ein von Prof. Dr. Jeffrey Bluestone zur Verfügung gestellter Anti-CTLA-4-Antikörper (4F10) verwendet, der die Interaktion von CTLA-4 mit B7-Molekülen blockiert (Walunas et al., 1998).

3.1.1 Induktion von CTLA-4 im Verlauf der *P. yoelii*-Infektionen

CTLA-4 stellt ein koinhibitorisches Molekül dar, das in naiven T-Zellen nicht exprimiert wird und erst im Verlauf der T-Zellaktivierung induziert wird (Egen et al., 2002). Die Induktion von CTLA-4 in der murinen PbA-Infektion wurde in früheren Arbeiten bereits nachgewiesen (Jacobs et al., 2002). Im Gegensatz zur PbA-Infektion verursacht die Infektion mit dem *P. yoelii*-Stamm Py17NL einen nicht-letalen Krankheitsverlauf mit einer transienten Parasitämie (Langhorne et al., 2002). Zelluläre und humorale Immunantwort sind an der Beseitigung Parasiten-infizierter Erythrozyten beteiligt, so dass etwa drei Wochen nach Beginn der Infektion keine Parasiten mehr im Blut vorhanden sind. Eine spontan bei der *in vivo*-Mauspassage auftretende Py17NL-Variante wurde Py-lethal genannt, da die Infektion mit dieser Variante zu einem schnelleren Anstieg der Parasitämie führte und reproduzierbar ca. 30 % der infizierten Balb/c-Mäuse an unkontrolliert ansteigender Parasitämie verstarben. Zur Untersuchung der CTLA-4-Expression

im Verlauf der Infektion mit Py17NL und Py-lethal wurden Zytospins muriner Milzzellen am Tag 6 p.i. erstellt und CTLA-4 zusammen mit den T-Zellmarkern CD4 bzw. CD8 gefärbt (Abb. 3.1). Dabei wurde CTLA-4 intrazellulär gefärbt, weil es nur kurzzeitig auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert wird und zu einem Großteil intrazellulär in Vesikeln gespeichert wird. Sowohl nach Infektion mit dem nicht-letalen *P. yoelii*-Stamm Py17NL (Abb. 3.1 A) als auch mit der virulenteren Variante Py-lethal (Abb. 3.1 B) exprimierten am Tag 6 p.i. etwa 25 % der CD4⁺ T-Zellen CTLA-4, während in uninfizierten Balb/c-Mäusen keine CTLA-4-Expression auf CD4⁺ T-Zellen detektiert wurde. Die Applikation des Anti-CTLA-4-Antikörpers 4F10 vor der *P. yoelii*-Infektion hatte keine veränderte CTLA-4-Expression zur Folge, was die Depletion von CD4⁺CTLA-4⁺ T-Zellen durch anti-CTLA-4 4F10 ausschließt. Im Gegensatz zur Induktion von CTLA-4 auf den CD4⁺ T-Zellen fand im Verlauf der Py17NL- und Py-lethal-Infektion keine Induktion auf CD8⁺ T-Zellen statt.

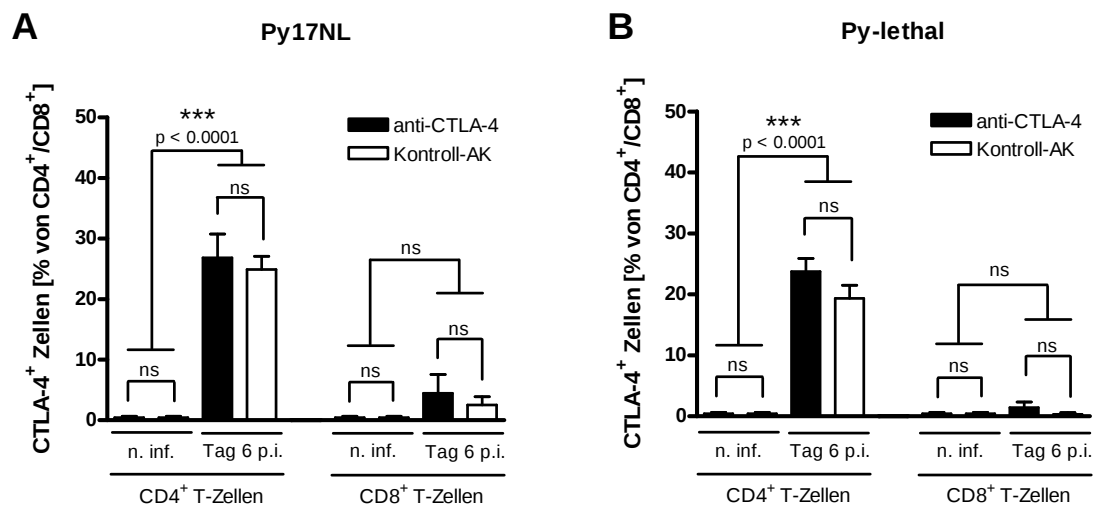


Abb. 3.1: Induktion der CTLA-4-Expression im Verlauf der *P. yoelii*-Infektionen

500 µg anti-CTLA-4 (4F10) bzw. Kontroll-Antikörper wurden Balb/c-Mäusen i.p. injiziert und diese am gleichen Tag mit Py17NL- oder Py-lethal-Stabilat (je 5 * 10⁶ infizierte Erythrozyten) infiziert. Am Tag 6 p.i. wurde der Anteil an CTLA-4⁺ T-Zellen auf Zytospins von Milzzellen gemessen. Es wurde eine intrazelluläre Färbung mit anti-CTLA-4 (Alexa568-konjugiert) durchgeführt, gefolgt von einer Färbung mit Anti-CD4- bzw. Anti-CD8-Antikörper (Alexa488- bzw. FITC-konjugiert). Der Anteil der CTLA-4⁺ Zellen an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Infektion mit Py17NL (A) oder Py-lethal (B) ist aufgetragen (jeweils Mittelwerte + SEM). Dargestellt ist die Zusammenfassung von drei Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Student's t-test (unpaired, two-tailed).

CTLA-4 wird zwar im Verlauf der T-Zellaktivierung exprimiert, stellt gleichzeitig jedoch auch einen Marker für regulatorische T-Zellen dar, auf deren Oberfläche es konstitutiv exprimiert wird (Sansom et al., 2006). Um zu überprüfen, ob T_{reg} an der im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion beobachteten Induktion von CTLA-4 auf $CD4^+$ T-Zellen beteiligt waren, wurde in der Milz von Py17NL- und Py-lethal-infizierten Balb/c-Mäusen der T_{reg} -Marker Foxp3 gefärbt (Abb. 3.2). Im Vergleich zu uninfizierten Balb/c-Mäusen war der prozentuale Anteil der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T_{reg} in der *P. yoelii*-Infektion unverändert (ca. 8 % der $CD4^+$ T-Zellen waren $CD25^+Foxp3^+$). Bei Applikation von anti-CTLA-4 4F10 am Tag -1 wurde ebenfalls keine Veränderung des Anteils der T_{reg} an den Milzzellen gemessen (Daten nicht dargestellt). Somit bewirkte die Behandlung der Mäuse mit anti-CTLA-4 keine Depletion der CTLA-4 $^+$ T_{reg} . Da der Anteil an T_{reg} im Verlauf der *P. yoelii*-Infektionen unverändert blieb, CTLA-4 aber auf 25 % der $CD4^+$ T-Zellen induziert wurde, beruhte diese Induktion auf der Expression von CTLA-4 auf aktivierten T-Effektorzellen.

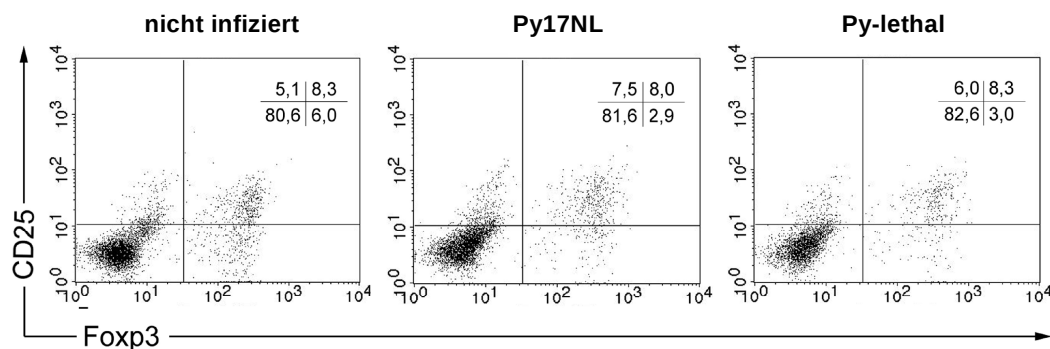


Abb. 3.2: Keine Veränderung des Anteils an T_{reg} im Verlauf der Infektion mit Py17NL bzw. Py-lethal

Der Anteil an T_{reg} in der Milz wurde am Tag 6 nach Infektion mit Py17NL oder Py-lethal anhand der Expression des spezifischen Markers Foxp3 analysiert. Dazu wurde auf $CD4^+$ T-Zellen gated und der Anteil an T_{reg} durch eine Kofärbung mit anti-CD25 und anti-Foxp3 detektiert. Als Kontrolle dienten Milzzellen aus uninfizierten Mäusen. Ein repräsentatives von drei Experimenten ist dargestellt.

3.1.2 Einfluss der CTLA-4-Blockade auf Parasitämie und Überleben

Um den Einfluss der CTLA-4-Blockade auf den klinischen Verlauf der Infektion mit Py17NL und Py-lethal zu untersuchen, wurden die Parasitämien in den mit anti-CTLA-4 bzw. Hamster-IgG behandelten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt (Abb. 3.3 A und B). Die Dosis von 500 µg anti-CTLA-4 wurde dabei entsprechend der CTLA-4-Blockade in der PbA-Infektion gewählt (Jacobs et al., 2002). Die Behandlung mit anti-CTLA-4 4F10 führte in der Py17NL-Infektion zu einer signifikant reduzierten Parasitämie von Tag 12 p.i. an (Abb. 3.3 A). Dabei wurde die maximale Parasitämie am Tag 12 p.i. gemessen (anti-CTLA-4: 19.3 ± 3.8 % vs. Hamster-IgG: 36.5 ± 5.4 %). Zudem waren im Blut der mit anti-CTLA-4 behandelten Mäuse etwa ab dem Tag 17 p.i. keine infizierten Erythrozyten mehr nachweisbar, während die Kontrollgruppe erst zwei bis fünf Tage parasitenfrei war. Beim Überleben ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen, da Py17NL einen *P. yoelii*-Stamm darstellt, der eine nicht-letale Infektion auslöst (Abb. 3.3 C). Balb/c-Mäuse, deren Parasitämie über 80 % lag, die starken Gewichtsverlust aufwiesen oder moribund waren, wurden getötet, um unnötiges Leiden zu vermeiden, so dass die Überlebensrate <100 % war. Eine Anti-CTLA-4-Behandlung vor der Py17NL-Infektion bewirkte somit eine Verkürzung der Krankheitsdauer, ohne das Überleben der Mäuse zu beeinflussen. Jedoch war die Behandlung der Mäuse vor der Infektion erforderlich, weil die Applikation von anti-CTLA-4 am Tag 3 oder 5 p.i. keinen Einfluss auf den Verlauf der Parasitämie hatte (Daten nicht dargestellt). Daraus ergibt sich, dass die CTLA-4-Blockade bereits während des Primings der T-Zellen notwendig ist.

Die Variante Py-lethal entstand spontan bei der *in vivo*-Mauspassage von Py17NL und führte bei der Infektion von Balb/c-Mäusen zu einem schnelleren Anstieg der Parasitämie und zu höherer Letalität (Abb. 3.3 B und D). Die maximale Parasitämie im Verlauf der Infektion mit Py-lethal wurde am Tag 12 p.i. erreicht (durchschnittlich etwa 50 % infizierte Erythrozyten). Die Blockade von CTLA-4 hatte im Gegensatz zur Py17NL-Infektion keinen Einfluss auf den Verlauf der Parasitämie (Abb. 3.3 B). Jedoch führte die Applikation von anti-CTLA-4 4F10 zu einer signifikant höheren Letalität, die von 30 % in der Kontrollgruppe auf 70 % nach CTLA-4-Blockade anstieg (Abb. 3.3 D). Während die anti-CTLA-4-Behandlung also in der nicht-letalen Py17NL-Infektion die Parasitämie verringerte und die Krankheitsdauer verkürzte, löste sie in der virulenteren Py-lethal-Infektion eine höhere Letalität ohne Beeinflussung der Parasitämie aus.

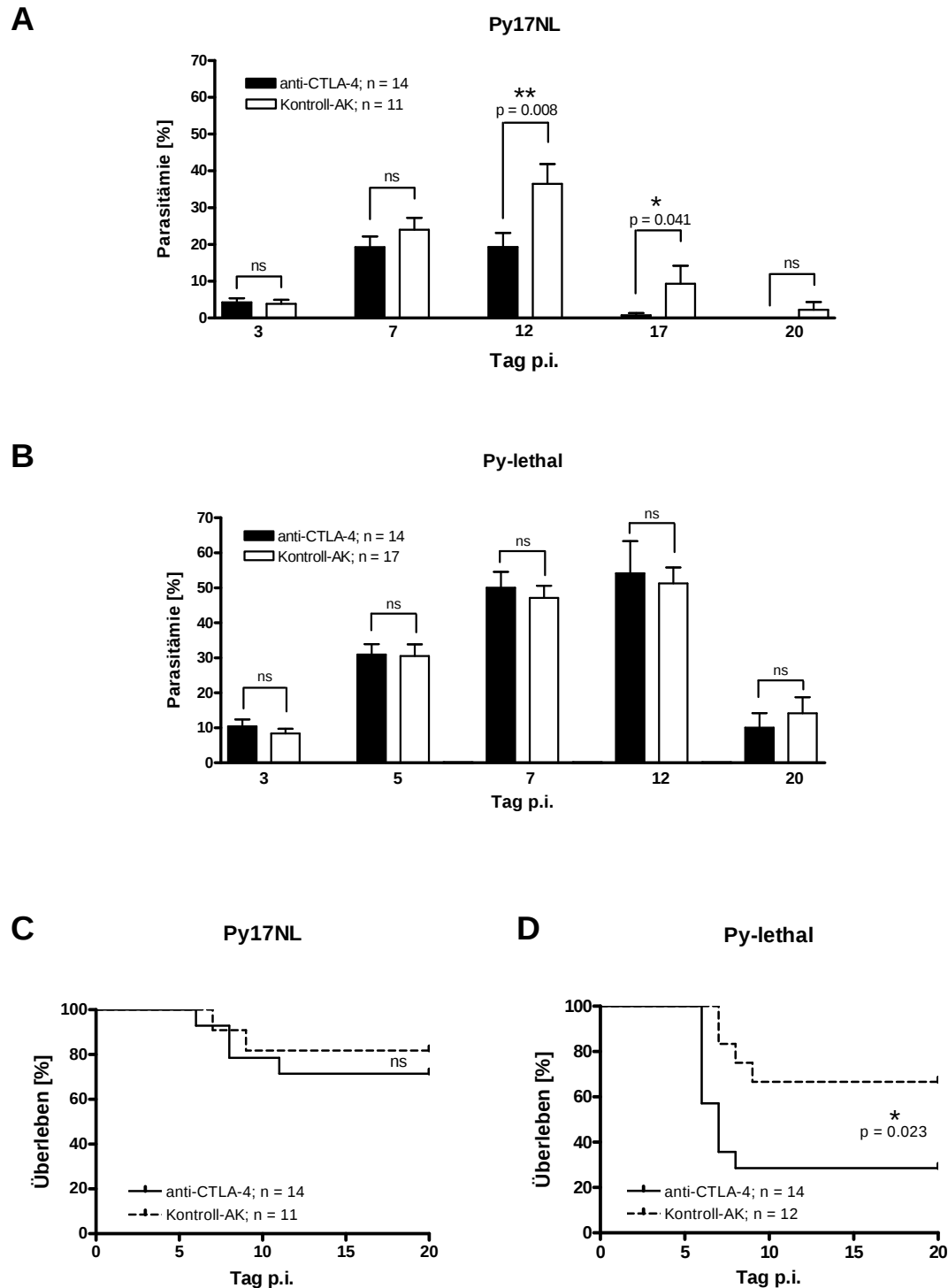


Abb. 3.3: Einfluss der CTLA-4-Blockade auf Parasitämie und Überleben in *P. yoelii*-Infektionen

500 µg anti-CTLA-4 (4F10) bzw. Kontroll-Antikörper wurden Balb/c-Mäusen i.p. injiziert und diese am gleichen Tag i.p. mit Py17NL- bzw. Py-lethal-Stabilat (je 5×10^6 infizierte Erythrozyten) infiziert. Die Parasitämien nach Infektion mit Py17NL (A) und Py-lethal (B) wurden bestimmt. Drei unabhängige Experimente sind zusammenfassend dargestellt (Mittelwerte + SEM). Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test (unpaired, one-tailed) berechnet. Da Mäuse im Verlauf der Infektion verstarben, basieren die Parasitämien am Tag 7, 12, 17 und 20 p.i. auf einer geringeren Zahl an Messwerten. Das Überleben der Mäuse nach Infektion mit Py17NL (C) und Py-lethal (D) wurde täglich beobachtet. Mäuse, deren Parasitämie >80 % betrug, die starken Gewichtsverlust aufwiesen oder moribund waren, wurden getötet. Der Log-Rank Test wurde angewandt, um die Überlebenskurven der Mäuse nach Behandlung mit anti-CTLA-4 und Kontroll-Antikörper zu vergleichen.

3.1.3 Einfluss der CTLA-4-Blockade auf klinische Parameter

Um die Ursache für die höhere Letalität der Py-lethal-infizierten Balb/c-Mäuse nach CTLA-4-Blockade zu untersuchen, wurden als zusätzliche klinische Parameter das Gewicht sowie die Transaminasen der Leber gemessen. Dabei wurde am Tag 5 nach der Infektion mit Py-lethal ein deutlicher Gewichtsverlust in den anti-CTLA-4-behandelten Mäusen beobachtet, der in der Py17NL-Infektion und auch der Py-lethal-infizierten Kontrollgruppe fehlte (Abb. 3.4 A).

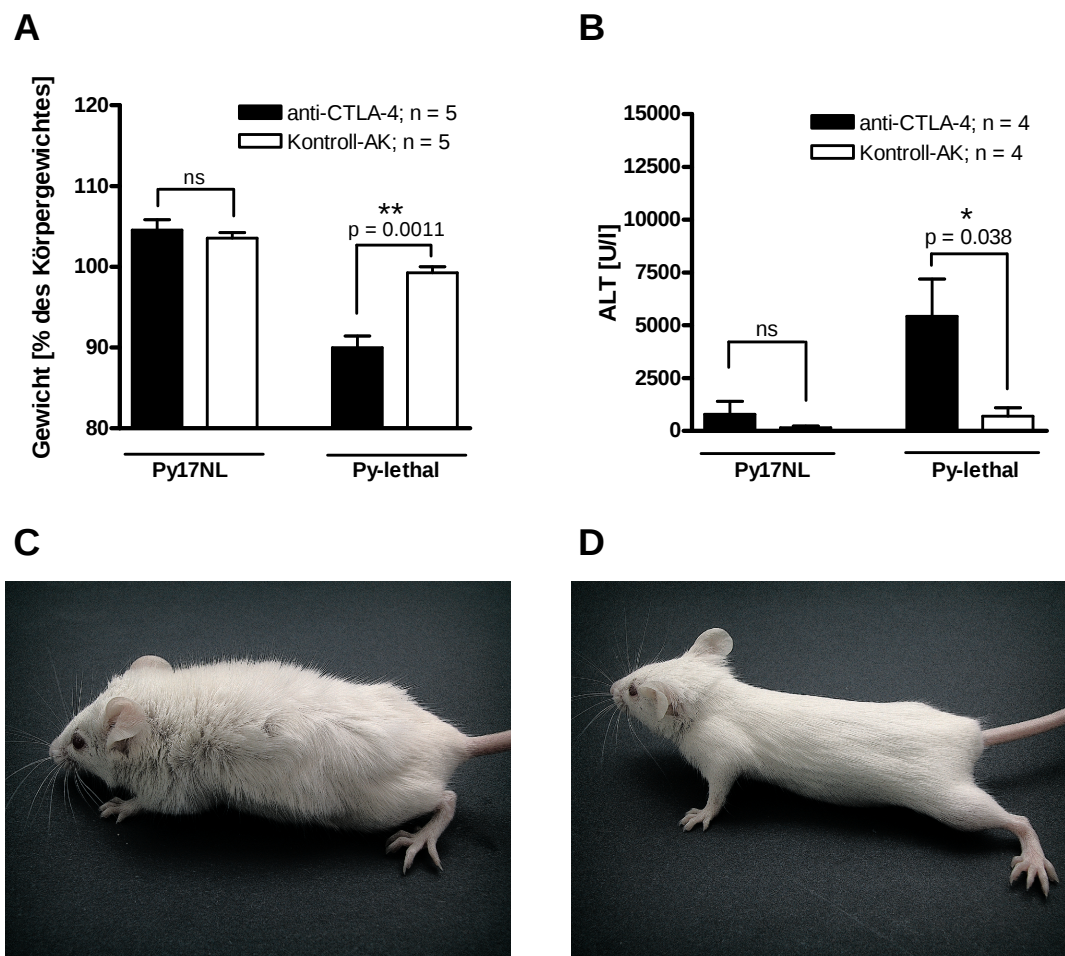


Abb. 3.4: Einfluss der CTLA-4-Blockade auf den klinischen Verlauf der *P. yoelii*-Infektionen

500 µg anti-CTLA-4 (4F10) bzw. Kontroll-Antikörper wurden Balb/c-Mäusen i.p. injiziert und diese am gleichen Tag i.p. mit Py17NL- bzw. Py-lethal-Stabilat (je $5 \cdot 10^6$ infizierte Erythrozyten) infiziert. Das Körpergewicht der infizierten Mäuse wurde am Tag 5 p.i. bestimmt und auf das Gewicht vor der Infektion bezogen (A). Das Leberenzym Alanin-Aminotransferase (ALT) wurde am Tag 6 p.i. in den Sera der Mäuse bestimmt (B). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte + SEM. Die Signifikanz wurde mit Student's t-test (unpaired, one-tailed) berechnet. Nach CTLA-4-Blockade zeigten Mäuse im Verlauf der Infektion mit Py-lethal ausgeprägte klinische Symptome (starke Gewichtsabnahme, Leberpathologie). Am Tag 6 p.i. wiesen Mäuse nach Behandlung mit anti-CTLA-4 (C) zudem ein struppigeres Fell auf als die Mäuse der Kontrollgruppe (D).

Nach der CTLA-4-Blockade war zudem ein fulminanter Anstieg der Serumkonzentration der Alanin-Aminotransferase (ALT) am Tag 6 nach Infektion mit Py-lethal bis auf 5000 U/l messbar, der auf eine schwere Leberpathologie hindeutete (Abb. 3.4 B). Dagegen betrug die Konzentration der ALT im Serum von uninfizierten Mäusen ca. 30 U/l und stieg im Verlauf der Py17NL-Infektion in der Kontrollgruppe nur geringfügig an. Der Anstieg war ausgeprägter nach der CTLA-4-Blockade, ohne dass jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied messbar war. Während die CTLA-4-Blockade somit im Verlauf der Py17NL-Infektion keine Leberschädigung auslöste, induzierte sie bei der Py-lethal-Infektion eine schwere Leberpathologie. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Aspartat-Aminotransferase (AST) erhalten, deren Konzentration im Serum nach Behandlung mit anti-CTLA-4 am Tag 6 nach Py-lethal-Infektion ebenfalls stark anstieg. Die durch eine CTLA-4-Blockade verstärkten klinischen Symptome im Verlauf der Py-lethal-Infektion zeigten sich auch an Aussehen und Aktivität der Mäuse. So wiesen die Mäuse der mit anti-CTLA-4 behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein struppigeres Fell auf und zeigten eine reduzierte Motilität (Abb. 3.4 C und D).

3.1.4 Verstärkte T-Zellaktivierung nach der CTLA-4-Blockade

Die Ligation von CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen durch B7-Moleküle führt zur Inhibition der CTLA-4⁺ T-Zellen, die durch eine Blockade von CTLA-4 verhindert wird. Um den Effekt der CTLA-4-Blockade auf die T-Zellaktivierung im Verlauf der *P. yoelii*-Infektionen näher zu untersuchen, wurde am Tag 6 p.i. der Anteil der aktivierten CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl an CD4⁺ T-Zellen in der Milz gemessen (Abb. 3.5 A und B). Es wurden nur Aktivierungsmarker auf CD4⁺ T-Zellen gemessen, da CTLA-4 im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion nur auf dieser T-Zellsubpopulation induziert wurde (vgl. Abb. 3.1). Dabei zeigte sich, dass bei der Py17NL- und Py-lethal-Infektion nach der CTLA-4-Blockade ein größerer Anteil der CD4⁺ T-Zellen einen aktivierten Phänotyp (CD25⁺, CD62L^{niedrig}, CD69⁺) aufwies. Der Effekt der CTLA-4-Blockade auf die T-Zellaktivierung begann dabei an Tag 4 p.i., war am Tag 6 p.i. am stärksten ausgeprägt und ging ab Tag 7 p.i. zurück (Daten nicht dargestellt). Im Verlauf der Py17NL-Infektion war jedoch nicht nur der Anteil der aktivierten CD4⁺ T-Zellen nach Applikation von anti-CTLA-4 gesteigert, sondern auch der Anteil aller CD4⁺ T-Zellen an den Milzzellen (Abb. 3.5 C). Zusammenfassend führte die CTLA-4-Blockade zu einem höheren Anteil an CD4⁺ T-Zellen in der Milz, von denen im Vergleich zur Kontrollgruppe zudem ein größerer Teil aktiviert war.

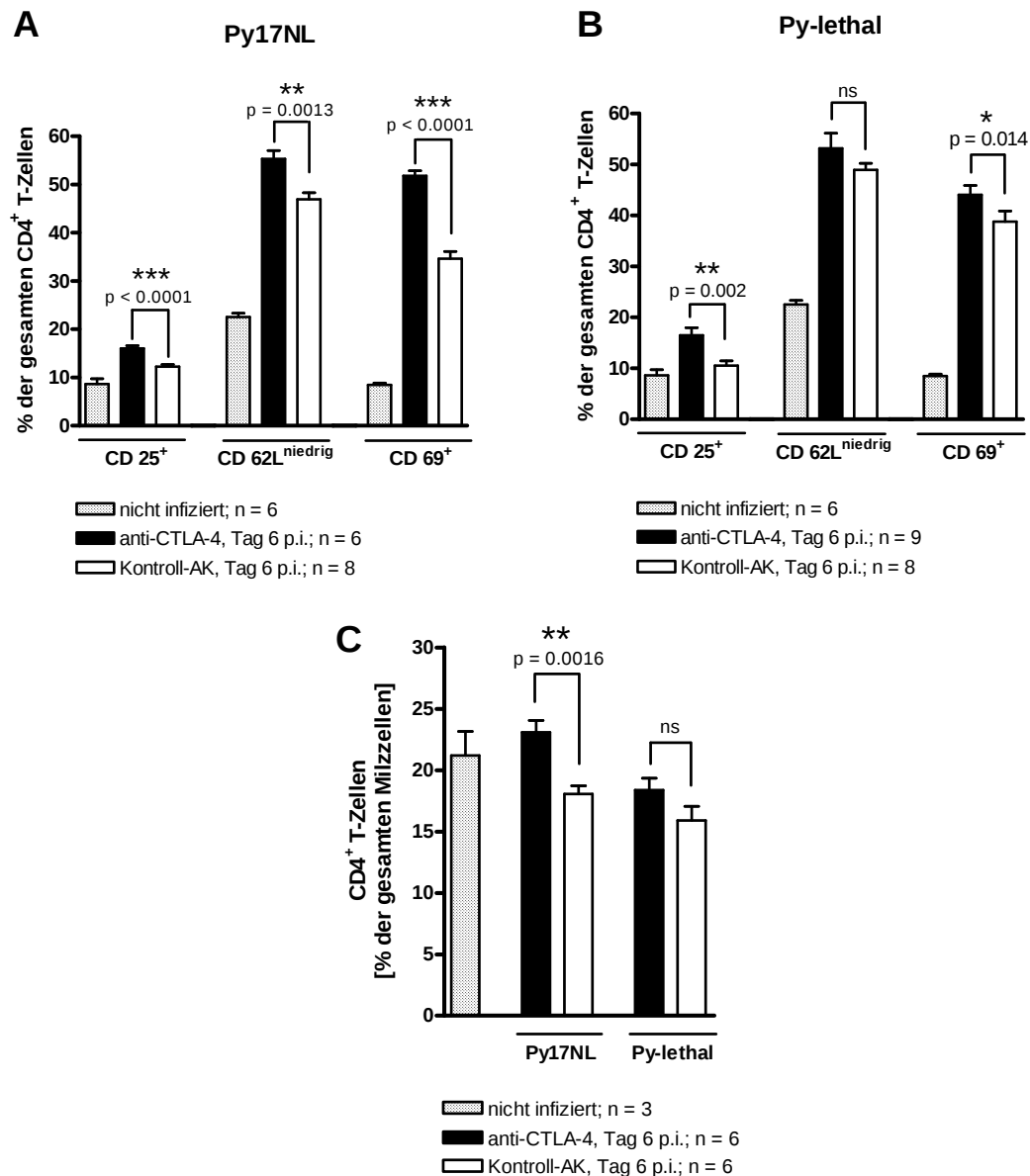


Abb. 3.5: Gesteigerte Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen nach der CTLA-4-Blockade

500 µg anti-CTLA-4 (4F10) bzw. Kontroll-Antikörper wurden Balb/c-Mäusen i.p. injiziert und diese am gleichen Tag i.p. mit Py17NL- bzw. Py-lethal-Stabilat (je $5 \cdot 10^6$ infizierte Erythrozyten) infiziert. Am Tag 6 p.i. wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD62L und CD69 auf CD4⁺ T-Zellen in der Milz bestimmt. Als Kontrolle dienten Milzzellen von uninfizierten Mäusen. Nach CTLA-4-Blockade war der Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen in der Milz bei Infektion mit Py17NL (A) und Py-lethal (B) erhöht. Der prozentuale Anteil der CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl an Milzzellen ist in C aufgetragen. Drei unabhängige Experimente sind zusammengefasst (Mittelwerte + SEM). Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test (paired, two-tailed) berechnet.

3.1.5 Gesteigerte Zytokinproduktion nach der CTLA-4-Blockade

Zur Beseitigung der Parasiten im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion sind zelluläre und humorale Immunantwort gemeinsam notwendig. So können infizierte Erythrozyten in der Abwesenheit von B-Zellen und Antikörpern nicht eliminiert werden (Roberts et al., 1979; Spencer Valero et al., 1998). Im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion werden dabei sowohl T_H1 -Zytokine wie IFN- γ und TNF- α freigesetzt, die direkt antiparasitär wirken, aber auch IL-4, IL-10 und TGF- β , die zur humoralen Immunantwort beitragen (Omer et al., 2003). Um den Effekt der CTLA-4-Blockade auf die Zytokinproduktion zu untersuchen, wurde deren Konzentration im Serum am Tag 6 nach Infektion mit Py17NL und Py-lethal untersucht (Abb. 3.6).

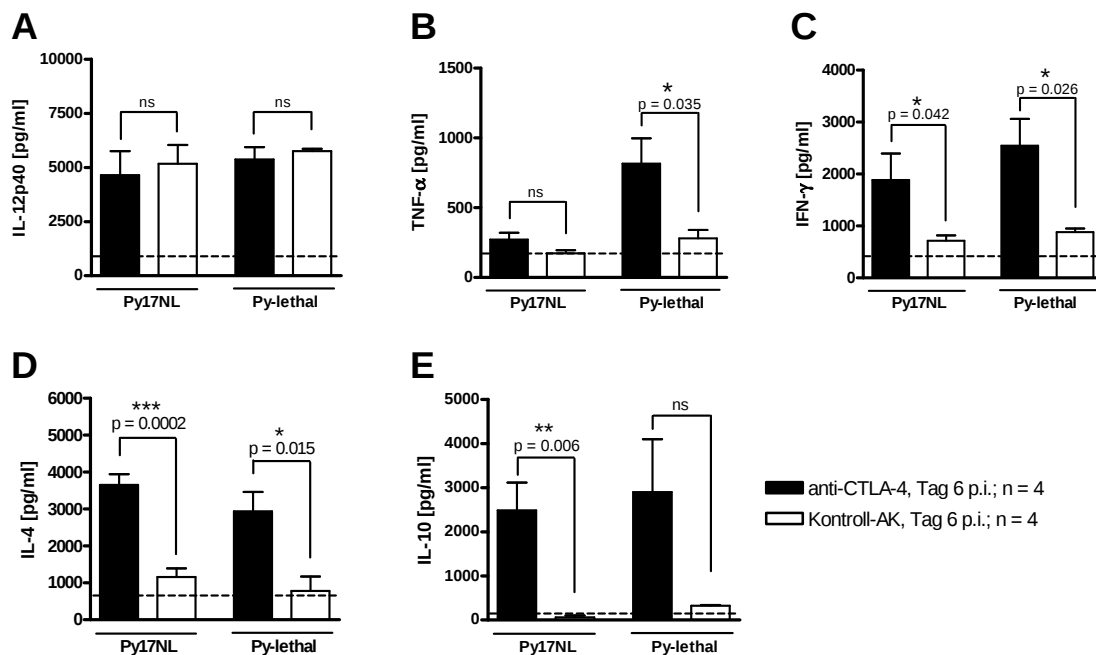


Abb. 3.6: Gesteigerte Produktion von T_H1 - und T_H2 -Zytokinen nach der CTLA-4-Blockade

500 μ g anti-CTLA-4 (4F10) bzw. Kontroll-Antikörper wurden Balb/c-Mäusen i.p. injiziert und diese am gleichen Tag i.p. mit Py17NL- bzw. Py-lethal-Stabilat (je $5 \cdot 10^6$ infizierte Erythrozyten) infiziert. Am Tag 6 p.i. wurden die Zytokine IL-12p40 (A), TNF- α (B), IFN- γ (C), IL-4 (D) und IL-10 (E) in den Sera der Mäuse bestimmt. Die Mittelwerte + SEM sind aufgetragen. Die statistische Signifikanz wurde mit Student's t-test (unpaired, one-tailed) berechnet.

Hinsichtlich der Konzentration an IL-12p40 gab es keinen Unterschied zwischen der Py17NL- und Py-lethal-Infektion, und auch die CTLA-4-Blockade hatte keinen Einfluss auf die IL-12-Produktion (Abb. 3.6 A). TNF- α wurde im Verlauf der Py17NL- und Py-lethal-Infektion nur geringfügig induziert (Abb. 3.6 B). Nach CTLA-4-Blockade kam es am Tag 6 nach Py-lethal-Infektion jedoch zu einem deutlichen Anstieg der TNF- α -Konzentration im Serum. TNF- α spielt allerdings nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Hemmung der Parasitenreplikation, sondern trägt gleichzeitig zur Pathologie bei (Grau et al., 1987). Die gesteigerte systemische Freisetzung an TNF- α nach CTLA-4-Blockade war somit vermutlich entscheidend an der Induktion der Leberpathologie und der höheren Letalität im Verlauf der Py-lethal-Infektion beteiligt. Bei den Zytokinen IFN- γ , IL-4 und IL-10 war nach der Anti-CTLA-4-Behandlung sowohl bei der Infektion mit Py17NL als auch Py-lethal ein deutlicher Anstieg im Serum detektierbar (Abb. 3.6 C-E). Dies verdeutlicht, dass die CTLA-4-Blockade die Immunantwort im Verlauf einer *P. yoelii*-Infektion verstärkte. Während die gesteigerte T-Zellaktivierung und Zytokinproduktion bei der nicht-letalen Py17NL-Infektion aber zu einer schnelleren Beseitigung von Parasiten-infizierten Erythrozyten führte, verursachten sie im Verlauf der virulenteren Py-lethal-Infektion verstärkte klinische Symptome und eine höhere Letalität.

3.2 Die Funktion von BTLA bei der T-Zellregulation im Verlauf der PbA-Infektion

Um die Bedeutung von BTLA für die Modulation pathologischer Prozesse, insbesondere der zerebralen Malaria, im Verlauf der PbA-Infektion zu untersuchen, wurden zunächst geeignete Hilfsmittel generiert, mit denen die BTLA/HVEM-Interaktion beeinflusst werden konnte. Im folgenden wird zuerst die Herstellung eines BTLA-Ig-Fusionsmoleküls beschrieben und danach die Charakterisierung eines Anti-BTLA-Antikörpers, der von Professor Dr. Kenneth Murphy (WUSTL, St. Louis, MO) zur Verfügung gestellt wurde. Danach wird auf die Expression von BTLA und seinem Liganden HVEM im Verlauf der PbA-Infektion eingegangen, bevor der Einfluss der Behandlung von Mäusen mit dem BTLA-Ig-Fusionsprotein bzw. dem Anti-BTLA-Antikörper auf den Verlauf der Malariaerkrankung beschrieben wird.

3.2.1 Klonierung und Expression des BTLA-Ig-Fusionsproteins

Lösliche Ig-Fusionsproteine bestehen aus den extrazellulären Domänen des zu untersuchenden kostimulatorischen Moleküls und dem F_c-Fragment von humanen oder murinen Antikörpern. Das betreffende Molekül liegt so als Dimer in löslicher Form vor und hat damit im Vergleich

zum Monomer eine höhere Avidität zu seinem Liganden. Daher werden Ig-Fusionsmoleküle häufig dazu genutzt, um die kostimulatorische Funktion von Molekülen *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren (Chapoval et al., 2002). Am Beispiel von BTLA-Ig ist die Herstellung eines Ig-Fusionsproteins schematisch in Abbildung 3.7 dargestellt. Bereits im Rahmen der Diplomarbeit wurde ein BTLA-Ig-Fusionsprotein generiert, indem die cDNA, die für die extrazelluläre BTLA-Domäne codierte, mit der cDNA des F_c-Fragmentes des humanen IgG₁-Moleküls fusioniert wurde (Lepenes, 2004). Der zu diesem Zweck verwendete Vektor *pcDNA1.1* wies jedoch den Nachteil auf, dass damit nur eine transiente Transfektion von Zellen möglich war. Zudem war das aufgereinigte BTLA-Ig-Fusionsmolekül noch durch Reste von Immunglobulinen kontaminiert, die dem fötalen Kälberserum (FCS) des Zellkulturmediums entstammten und nach der Reinigung über eine Protein-G-Säule ebenfalls im Eluat enthalten waren. Dies erschwerte funktionelle Studien, da nur ein geringer Teil der BTLA-Ig-Präparation das gewünschte Ig-Fusionsprotein darstellte. Hinzu kam, dass der BTLA-Ligand HVEM erst später identifiziert wurde (Sedy et al., 2005), so dass der Nachweis der Bindung von BTLA-Ig an seinen Liganden zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich war.

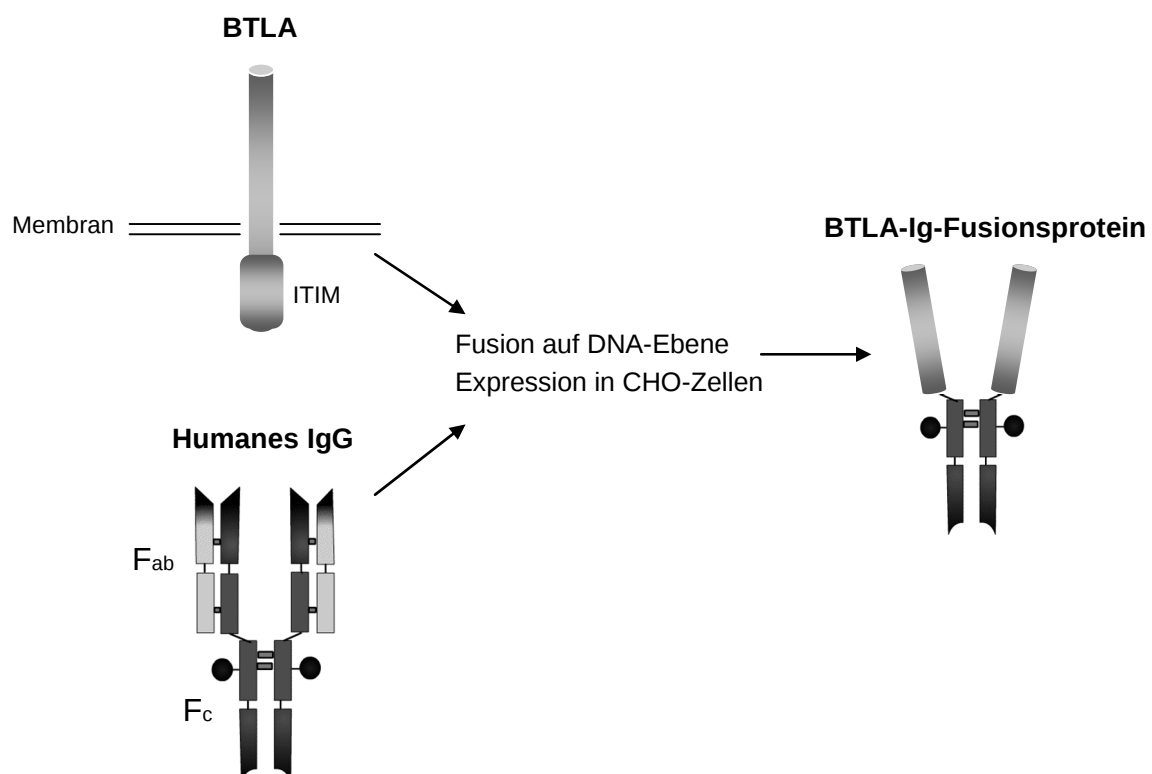


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Herstellung des BTLA-Ig-Fusionsproteins

Das BTLA-Ig-Fusionsmolekül setzt sich aus der extrazellulären Domäne von BTLA und dem F_c-Teil eines humanen Immunglobulin-Moleküls (IgG₁) zusammen. Auf diese Weise liegt BTLA in dimerer Form vor, weil die schweren Ketten des Immunglobulin-Moleküls über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Im Rahmen der Doktorarbeit sollte BTLA-Ig stabil exprimiert und seine Bindung an HVEM nachgewiesen werden. Zudem sollte mit Hilfe von BTLA-Ig die Bedeutung der BTLA/HVEM-Interaktion *in vitro* sowie im Verlauf der PbA-Infektion untersucht werden. Zunächst wurde dazu Gesamt-RNA aus Milzzellen präpariert und die mRNA unter Verwendung eines Oligo(dT)₁₅-Primers mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. In einer nachfolgenden PCR wurde daraus die für die extrazelluläre Domäne des BTLA-Moleküls codierende cDNA unter Verwendung der Primer „BTLA-Hind-s-neu-1“ und „BTLA-BamHI-as“ amplifiziert. Das erhaltene Produkt hatte eine Größe von 555 bp (Abb. 3.8 A) und wurde zunächst in den Zwischenklonierungsvektor *pDrive* ligiert. Die für das F_C-Fragment des humanen IgG₁-Moleküls codierende DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eag*I aus dem vorhandenen Vektor Hsp60-Ig ausgeschnitten (Abb. 3.8 B). Das cDNA-Fragment, das für die extrazelluläre BTLA-Domäne codierte, wurde aus dem Vektor *pDrive* mittels *Hind*III und *Bam*HI ausgeschnitten und zusammen mit der cDNA des F_C-Fragmentes von IgG₁ in den Vektor *pcDNA3.1* ligiert (Vektorkarte in Abb. 3.8 C).

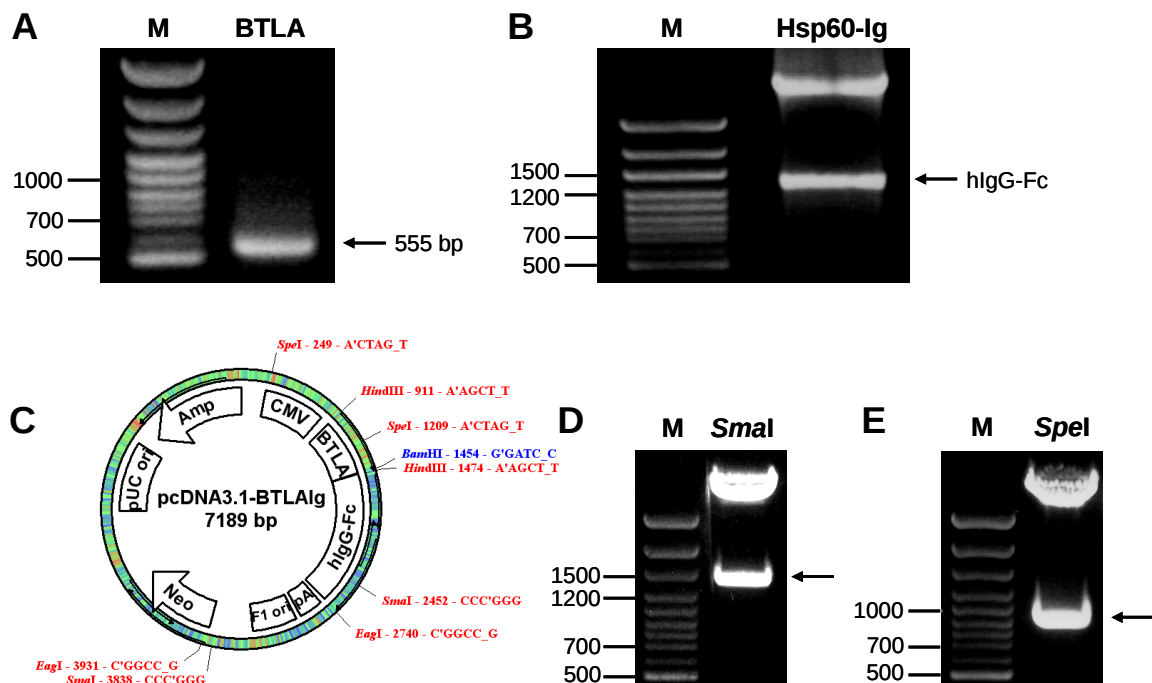


Abb. 3.8: Klonierung von BTLA-Ig

Das für die extrazelluläre Domäne von BTLA codierende cDNA-Fragment wurde mit Hilfe spezifischer Primer aus Milz-cDNA amplifiziert (A) und zusammen mit der für das F_C-Fragment des humanen IgG₁-Moleküls codierenden cDNA (B) in den Expressionsvektor *pcDNA3.1* ligiert (Vektorkarte in C). Zwei analytische Restriktionsverdaue des Vektors mit *Sma*I und *Spe*I zum Nachweis der inserierten DNA sind in D und E dargestellt.

Aufgrund des im Vektor vorhandenen Neomycin-Resistenzgens war dieser Vektor zur stabilen Transfektion geeignet, da dadurch eine Selektion in eukaryontischen Zellen möglich war. Die erfolgreiche Ligation beider DNA-Fragmente wurde durch zwei analytische Restriktionsverdaue mit den Endonukleasen *Sma*I und *Spe*I überprüft. Die erwarteten Fragmentgrößen betrugen dabei 1386 bp für den *Sma*I-Verdau und 960 bp für den *Spe*I-Verdau (in den Abb. 3.8 D und E jeweils durch Pfeile gekennzeichnet).

Vor der Transfektion wurde das Vektorkonstrukt *pcDNA3.1-BTLA*Ig mit dem Restriktionsenzym *Pvu*I linearisiert, um die Integration ins Genom der Zielzellen zu erleichtern. CHO-Zellen wurden anschließend stabil transfiziert und in Gegenwart des Selektionsantibiotikums G418 kultiviert. Die generierten Transfektanten wurden zehn Tage nach der Transfektion subkloniert, um eine homogene Zelllinie zu erhalten, die BTLA-Ig stabil exprimierten. Die Expression von BTLA-Ig wurde durch intrazelluläre Färbung der transfizierten CHO-Zellen mit Hilfe von Antikörpern überprüft, die gegen BTLA (Abb. 3.9 A) bzw. das F_c-Fragment des humanen IgG₁-Moleküls (Abb. 3.9 B) gerichtet waren. Als Kontrolle wurden CHO-Zellen verwendet, die mit leerem Vektor transfiziert wurden und BTLA-Ig daher nicht exprimierten. Die Färbungen in Abbildung 3.3 dokumentieren, dass BTLA-Ig nach der Transfektion des Vektorkonstruktes in CHO-Zellen von diesen stabil exprimiert wurde.

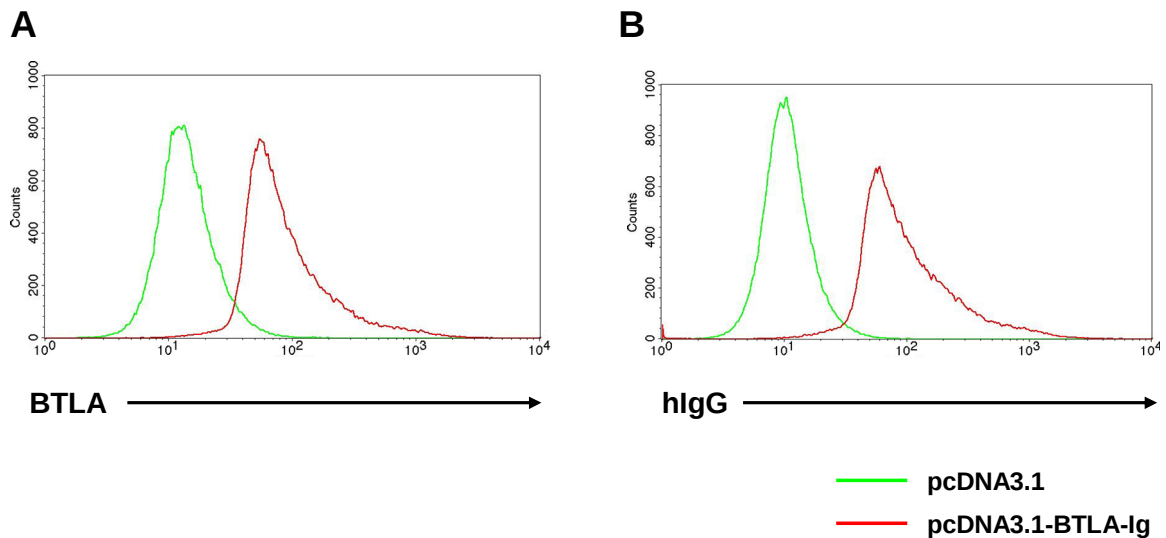


Abb. 3.9: Expression des BTLA-Ig-Fusionsproteins

Der Vektor pcDNA3.1-BTLA-Ig wurde mit dem Restriktionsenzym *Pvu*I linearisiert, woraufhin CHO-Zellen stabil mit dem für BTLA-Ig codierenden Konstrukt transfiziert wurden. Die transfizierten Zellen wurden in Gegenwart des Selektionsantibiotikums G418 kultiviert und subkloniert, um eine Zelllinie zu generieren, die BTLA-Ig stabil exprimierten. Die intrazelluläre Färbung eines stabil transfizierten Klonen mit anti-BTLA bzw. anti-hIgG ist als rote Linie in A bzw. B dargestellt. Als Kontrolle wurden CHO-Zellen verwendet, die zuvor mit leerem Vektor transfiziert worden waren (grüne Linie in A und B).

3.2.2 Bindung von BTLA-Ig an den Liganden HVEM *in vitro*

Die stabil mit BTLA-Ig transfizierten CHO-Zellen wurden in CELLLine-Bioreaktoren in Vollmedium kultiviert. Dieses wurde vor der Verwendung über eine Protein-G-Säule gegeben und dadurch von störenden, im FCS enthaltenen Immunglobulinen befreit. Nach dem Ernten des Kulturüberstandes wurde das darin enthaltene BTLA-Ig-Fusionsprotein über eine Protein-G-Säule aufgereinigt und seine Reinheit durch SDS-PAGE und nachfolgenden Westernblot überprüft (Abb. 3.10 A). Während aufgereinigtes BTLA-Ig eine singuläre Bande bei ca. 60 kDa aufwies, fehlte diese in der Kontrolle (Ig-depletiertes Medium). Da BTLA-Ig bei reduzierenden Bedingungen als Monomer vorliegt, verbleibt nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz von BTLA eine Gesamtzahl von 387 Aminosäuren (155 AS für das murine BTLA-Fragment und 232 AS für das humane F_c-Fragment). Nach einer Berechnung anhand der Aminosäuresequenz sollte die Molekülmasse von BTLA-Ig eigentlich ca. 44 kDa betragen. Da BTLA jedoch sechs N-Glykosylierungsstellen aufweist, zeigt BTLA-Ig ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE, so dass die apparente Molekülmasse höher liegt als die berechnete.

Um zu überprüfen, ob BTLA-Ig funktional war und an den BTLA-Liganden HVEM band, wurde die für das gesamte HVEM-Molekül codierende cDNA mit den Primern „fl-HVEM-HindIII-s“ und „fl-HVEM-XhoI-as“ amplifiziert und in den Vektor *pDrive* kloniert. Dieser wurde daraufhin mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XhoI* verdaut und die cDNA in den Expressionsvektor *pcDNA3.1* ligiert. COS1-Zellen wurden transient mit dem HVEM-Konstrukt transfiziert und die HVEM-Expression nach zweitägiger Kultivierung der Transfektanten im Westernblot überprüft. In Abbildung 3.10 B wird erkennbar, dass mit dem verwendeten Anti-HVEM-Antikörper bei den HVEM-Transfektanten eine Bande bei einer Größe von 33 kDa detektiert wurde, die bei mit leerem Vektor transfizierten COS1-Zellen fehlte. Zur Überprüfung, ob BTLA-Ig an das von den transfizierten COS1-Zellen exprimierte HVEM band, wurden diese mit BTLA-Ig inkubiert. Dessen Bindung an die Zellen wurde anschließend mit einem PE-konjugierten Anti-human-IgG-Antikörper überprüft, der als Sekundärantikörper das F_c-Fragment des BTLA-Ig-Fusionsproteins erkannte (Abb. 3.10 C). Als Kontrolle wurden COS1-Zellen verwendet, die zuvor mit dem leeren Vektor *pcDNA3.1* transfiziert worden waren. Eine Bindung des BTLA-Ig-Fusionsproteins war dabei nur an die HVEM-transfizierten COS1-Zellen, nicht jedoch an die mit leerem Vektor transfizierten Zellen nachweisbar. Daraus ergibt sich, dass BTLA-Ig spezifisch an HVEM band und das generierte BTLA-Ig-Fusionsprotein somit funktional war. Die Bindung von BTLA-Ig an die HVEM-Transfektanten war dabei sowohl durchflusszytometrisch als auch immunhistochemisch nachweisbar.

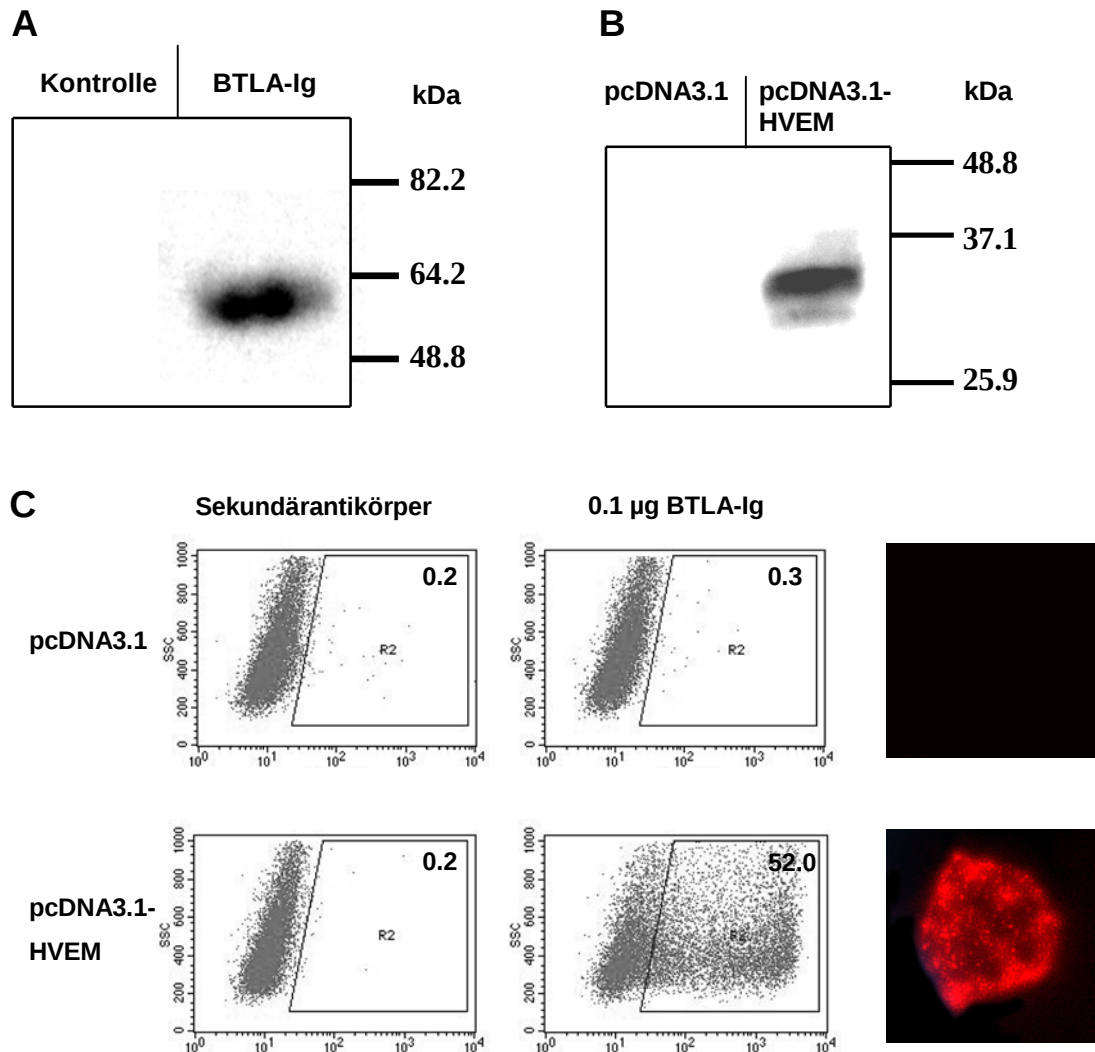


Abb. 3.10: BTLA-Ig ist funktional und bindet den BTLA-Liganden HVEM *in vitro*

BTLA-Ig wurde aus dem Überstand transfizierter CHO-Zellen aufgereinigt und im Western Blot mit anti-hIgG nachgewiesen (A). HVEM wurde kloniert und COS1-Zellen transient mit dem HVEM-Konstrukt transfiziert. Die HVEM-Expression wurde im Western Blot mit anti-HVEM detektiert (B). HVEM-transfizierte bzw. mit leerem Vektor transfizierte COS1-Zellen wurden mit 0.1 µg BTLA-Ig inkubiert und anschließend mit PE-konjugiertem anti-hIgG gefärbt. Die Bindung von BTLA-Ig an HVEM auf transient transfizierten COS1-Zellen war sowohl durchflusszytometrisch als auch immunhistochemisch nachweisbar (C).

Um das BTLA-Ig-Fusionsprotein für die Analyse der Funktion der BTLA/HVEM-Interaktion *in vitro* einzusetzen, war eine hohe Reinheit von BTLA-Ig notwendig. So wirkt z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) bereits in äußerst geringen Mengen stimulatorisch auf APCs, da es an Toll-like Rezeptor (TLR) 4 bindet und sie zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen anregt. Zur Bestimmung der LPS-Konzentration wurde der LAL-Assay angewandt (vgl. 2.2.2.5). In diesem Test, dessen Nachweisgrenze bei etwa 0.01 ng/ml für den LPS-Standard liegt, war BTLA-Ig noch bis zu einer Konzentration von 5 µg/ml LPS-frei. Als zusätzlicher Test auf die

Reinheit des BTLA-Ig-Fusionsproteins diente die Stimulation von Knochenmarksmakrophagen mit BTLA-Ig (Abb. 3.11). Während nach 24-stündiger Inkubation der Makrophagen mit LPS (TLR4-Agonist) und PamCys (TLR2-Agonist) große Mengen an TNF- α sezerniert wurden, kam es bei einer Kultivierung in Gegenwart von BTLA-Ig nicht zur Freisetzung dieses Zytokins. Daraus ergab sich einerseits, dass BTLA-Ig frei von kontaminierenden TLR-Agonisten (v.a. LPS) war, und andererseits, dass BTLA-Ig nicht stimulatorisch auf APCs wirkte.

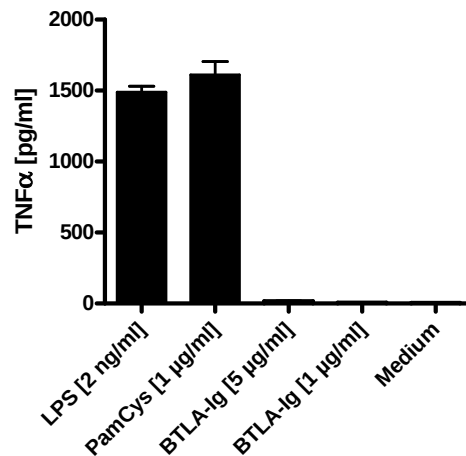


Abb. 3.11: BTLA-Ig ist frei von LPS-Kontamination

Knochenmarksmakrophagen von C57BL/6-Mäusen wurden mit LPS, PamCys, BTLA-Ig bzw. Medium 24 h inkubiert. TNF- α wurde im Kulturüberstand der Makrophagen mittels ELISA quantifiziert (jeweils Mittelwerte + SEM). Während in Gegenwart der TLR-Agonisten LPS (TLR4) und PamCys (TLR2) große Mengen TNF- α sezerniert wurden, löste BTLA-Ig keine Produktion von TNF- α in Makrophagen aus.

3.2.3 Inhibition der BTLA/HVEM-vermittelten T-Zellregulation durch BTLA-Ig

Die Rolle von BTLA als Koinhibitor wurde untersucht, indem Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen mit Anti-CD3-Antikörper in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an BTLA-Ig stimuliert wurden. Durch Stimulation über den CD3-Komplex werden dabei alle vorhandenen T-Zellen zur Proliferation und Sekretion des Zytokins IL-2 angeregt, so dass der Einfluss kostimulatorischer oder koinhibitorischer Moleküle auf diese Parameter untersucht werden kann. Dabei zeigte sich, dass nach zweitägiger Stimulation mit anti-CD3 die IL-2-Produktion in Gegenwart von BTLA-Ig gesteigert war (Abb. 3.12 A). Die statistische Auswertung von fünf unabhängigen Experimenten mit einer Konzentration von 1 µg/ml BTLA-Ig ist in Abbildung 3.12 B dargestellt. Dabei war der Effekt von BTLA-Ig am größten, wenn suboptimale Konzentrationen an anti-CD3 (10 bis 100 ng/ml) im Kulturmedium vorlagen. Während die Produktion an IL-2 in Gegenwart von 10 ng/ml anti-CD3 um 80 % gesteigert war, betrug die Steigerung nur noch 24 % bei einer

Stimulation mit 1000 ng/ml anti-CD3. Daraus ergibt sich, dass der Effekt von BTLA-Ig auf die IL-2-Produktion der T-Zellen durch die verstärkte Stimulation über den T-Zellrezeptor überlagert wird. Die in Gegenwart von BTLA-Ig verstärkte Sekretion von IL-2 im Verlauf der T-Zellaktivierung wird vermutlich durch dessen Bindung an den Liganden HVEM bewirkt, der auf naiven B- und T-Zellen exprimiert wird. Auf diese Weise werden die HVEM-Moleküle auf der Oberfläche dieser Zellen abgesättigt, so dass HVEM nicht mehr an BTLA binden kann. Das negative Signal, das über BTLA im Verlauf der Aktivierung ins Innere der T-Zelle vermittelt wird, unterbleibt somit in Gegenwart von BTLA-Ig. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit MACS-aufgereinigten T-Zellen erhalten, bei denen die Stimulation mit anti-CD3 in Gegenwart von BTLA-Ig ebenfalls zu einer verstärkten Bildung von IL-2 führte (Daten nicht dargestellt).

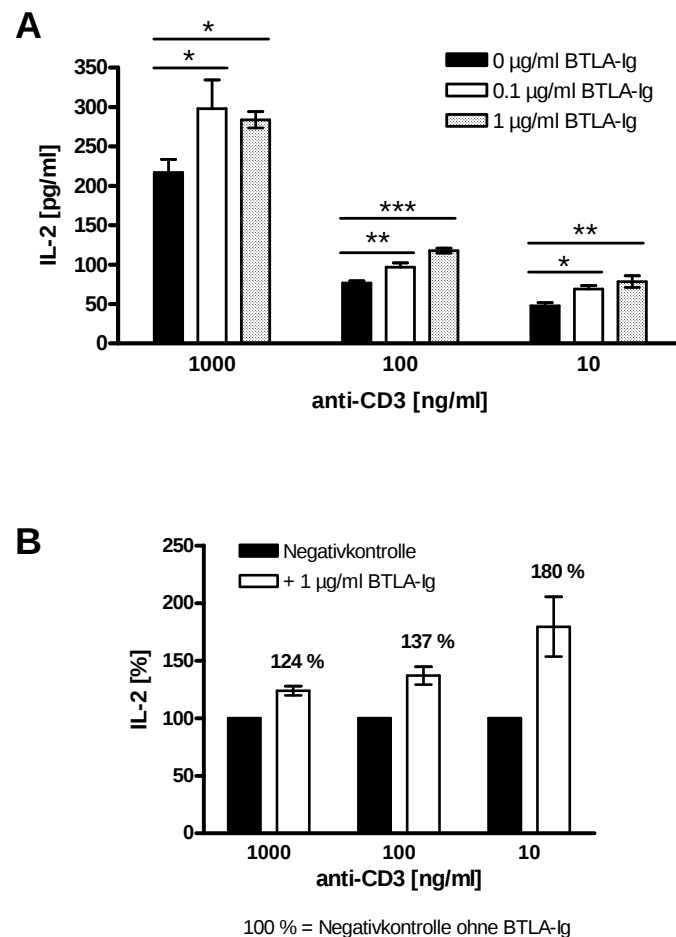


Abb. 3.12: Inhibition der HVEM/BTLA-vermittelten T-Zellregulation durch BTLA-Ig

C57BL/6-Milzzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen anti-CD3 $\pm$ BTLA-Ig stimuliert. Nach 48 h Kultivierung wurde IL-2 im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Ein repräsentatives von fünf unabhängigen Experimenten ist dargestellt (Mittelwerte $\pm$ SEM von Triplikaten). Die Signifikanz wurde mit Student's t-test (unpaired, two-tailed) berechnet (A). Die Zusammenfassung aller fünf Experimente ist in B dargestellt. Dabei wurde die Produktion von IL-2 in Abwesenheit des BTLA-Fusionsproteins gleich 100 % gesetzt. Die Mittelwerte $\pm$ SEM sind aufgetragen.

3.2.4 Kein Einfluss von BTLA-Ig auf die T-Zellsuppression durch T_{reg}

Ein möglicher Mechanismus, durch den die Proliferation von T-Zellen sowie die Synthese von IL-2 begrenzt wird, ist deren Suppression durch natürliche regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die neben CD4 als Marker auch CD25 und den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren (Hori et al., 2004). Um zu untersuchen, ob die BTLA/HVEM-Interaktion zur T_{reg}-vermittelten Suppression beiträgt, wurden aus der Milz von Balb/c-Mäusen MACS-gereinigte naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in Gegenwart von CD4⁺CD25⁺ T_{reg} mit anti-CD3 stimuliert. Als Maß für die Proliferation diente die Inkorporation von Radioaktivität durch Einbau von ³H-Thymidin in die DNA (Abb. 3.13 A).

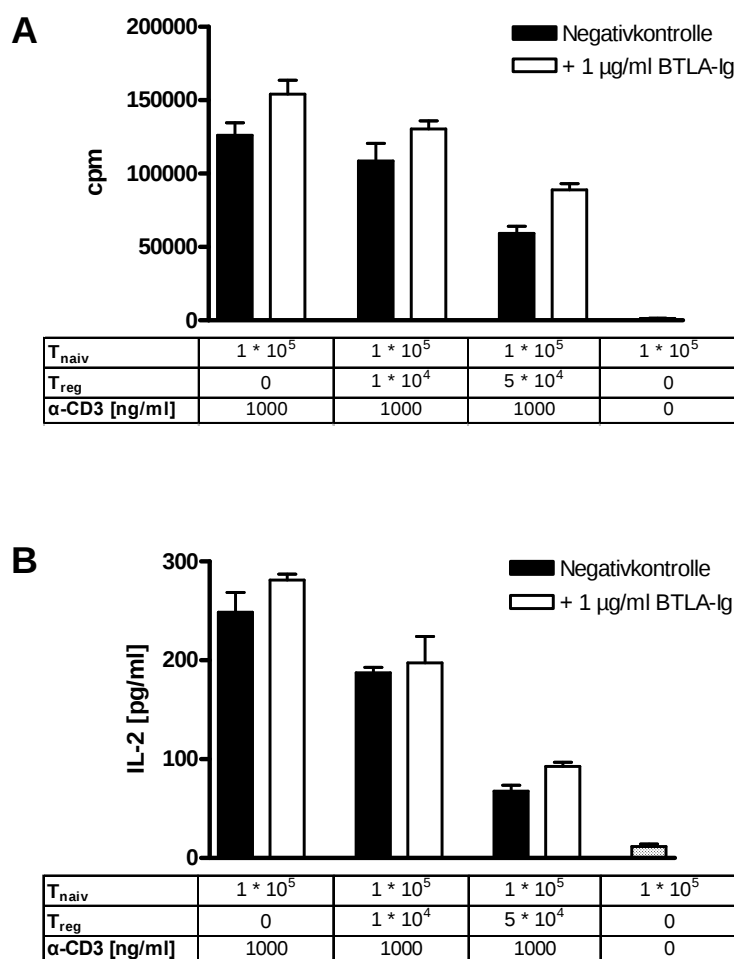


Abb. 3.13: Kein Einfluss von BTLA-Ig auf die T_{reg}-vermittelte Suppression von T-Zellfunktionen

1 * 10⁵ MACS-gereinigte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (T_{naiv}) aus Balb/c-Mäusen wurden mit anti-CD3 (1000 ng/ml) in Gegenwart von MACS-aufgereinigten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (T_{reg}) stimuliert. Die Zellen wurden nach 48 h Kultivierung für 8 h mit ³H-Thymidin gepulst und die inkorporierte Radioaktivität als Maß für die Proliferation im Szintillationszähler gemessen (A). IL-2 wurde im Überstand der Zellen mittels ELISA quantifiziert (B). Die Mittelwerte + SEM eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt (jeweils Triplikate).

Mit steigender Zahl an T_{reg} , die zu den naiven T-Zellen zugegeben wurde, ging die Proliferation der stimulierten T-Zellen erwartungsgemäß zurück. In Gegenwart von 1 $\mu\text{g/ml}$ BTLA-Ig war die Proliferation in jedem Ansatz im Vergleich zur Kontrolle gesteigert, da die Ligation von endogenem BTLA durch HVEM aufgrund der Bindung von BTLA-Ig an HVEM verhindert wurde (vgl. Abb. 3.12). Jedoch wurde die T_{reg} -vermittelte Suppression der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen durch BTLA-Ig nicht aufgehoben, weil die T-Zellproliferation mit steigender Zahl an T_{reg} stärker inhibiert wurde. Gleiches galt für die Produktion von IL-2, die auch in Gegenwart von BTLA-Ig mit zunehmender Anzahl an T_{reg} zurückging (Abb. 3.13 B). Somit scheint die BTLA/HVEM-Interaktion bei der Regulation von T-Effektorfunktionen durch T_{reg} keine Rolle zu spielen.

3.2.5 Charakterisierung des Anti-BTLA-Antikörpers 6A6

Neben der Verwendung von Ig-Fusionsmolekülen stellen Antikörper, die spezifisch gegen das zu untersuchende Oberflächenmolekül gerichtet sind, eine Möglichkeit dar, um dessen Einfluss auf die Kostimulation *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Von Professor Dr. Kenneth Murphy (WUSTL, St. Louis) wurde zu diesem Zweck ein aus einem armenischen Hamster stammendes Hybridom (Klon 6A6) zur Verfügung gestellt, das einen Anti-BTLA-Antikörper sezernierte. Bei anti-BTLA 6A6 handelt es sich um einen blockierenden Antikörper, da dieser nach Bindung an BTLA die Bindung eines HVEM-Ig-Fusionsproteins verhindert (Hurchla et al., 2005). Der Antikörper wurde dabei durch Immunisierung eines Hamsters mit BTLA-Ig generiert und erkennt spezifisch die C57BL/6-Isoform von BTLA. Das Hybridom 6A6 wurde in proteinfreiem PFHM-II-Medium kultiviert, und Anti-BTLA-Antikörper wurden aus dem Überstand über eine Protein-G-Säule aufgereinigt. Zur Überprüfung der Bindung von anti-BTLA 6A6 an BTLA wurde die für das gesamte BTLA-Molekül codierende cDNA mit den Primern „fl-BTLA-HindIII-s“ und „fl-BTLA-XhoI-as“ amplifiziert und in den Vektor *pDrive* kloniert. Nach Verdau mittels *HindIII* und *XhoI* wurde die BTLA-cDNA in den Expressionsvektor *pcDNA3.1* ligiert, woraufhin COS1-Zellen mit dem Konstrukt transfiziert wurden. Einen Tag nach der transienten Transfektion wurden die BTLA-Transfektanten mit dem aufgereinigten anti-BTLA 6A6 (0.1 μg pro Ansatz) inkubiert und nachfolgend mit einem PE-konjugierten Anti-Hamster-Antikörper gefärbt (Abb. 3.14 A). Dabei zeigte sich, dass der Anteil der COS1-Zellen, der transient mit BTLA transfiziert worden war, bei vorheriger Inkubation mit anti-BTLA 6A6 durch den Sekundärantikörper angefärbt wurde. Dagegen war keine Bindung von anti-BTLA 6A6 an COS1-Zellen nach Transfektion mit leerem Vektor feststellbar, so dass der Antikörper spezifisch an BTLA bindet.

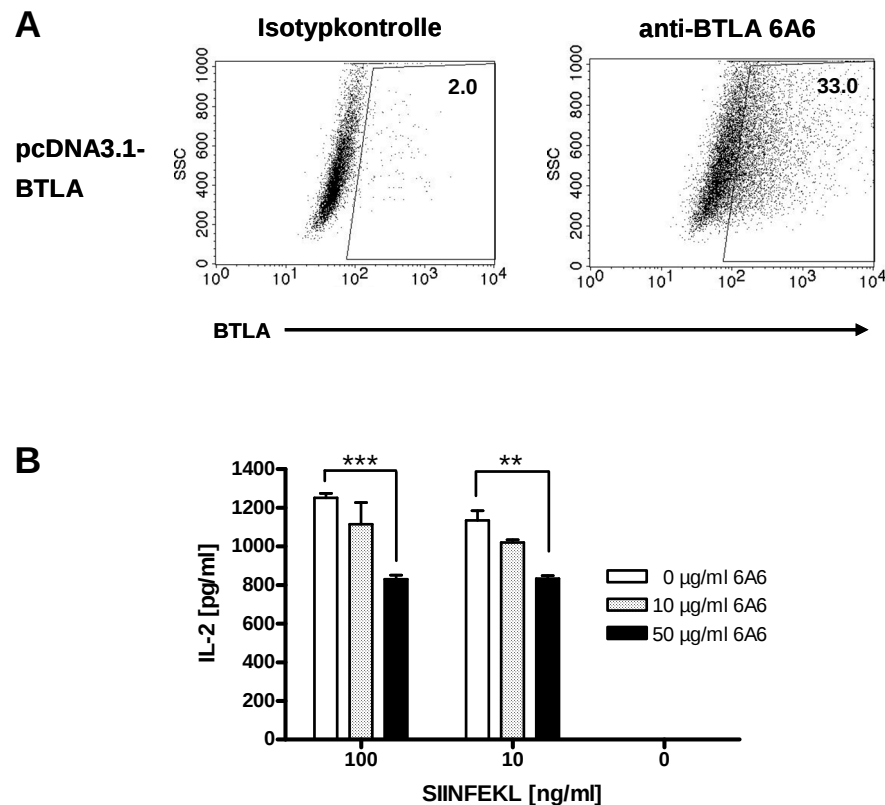


Abb. 3.14: Charakterisierung des anti-BTLA-Antikörpers 6A6

BTLA wurde kloniert, und COS1-Zellen wurden transient mit dem BTLA-Konstrukt transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit aufgereinigtem anti-BTLA 6A6 (aus Hamster) inkubiert und nachfolgend mit PE-konjugiertem anti-Hamster-Antikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden BTLA-transfizierte COS1-Zellen ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt (A). OT1-Milzzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) in Gegenwart von Platten-gebundenem anti-BTLA 6A6 bzw. Kontroll-Antikörper stimuliert. IL-2 wurde nach 48 h Kultivierung im Überstand mittels ELISA quantifiziert (B). Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt (Mittelwerte + SEM von Triplikaten). Die Signifikanz wurde mit Student's t-test (unpaired, two-tailed) berechnet.

Zur *in vitro*-Charakterisierung von anti-BTLA 6A6 wurden OT1-Milzzellen mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) in Gegenwart von anti-BTLA 6A6 oder Hamster-Ig als Kontrollantikörper stimuliert (Abb. 3.14 B). Das verwendete *in vitro*-Testsystem nutzt dabei die Spezifität TCR-transgener T-Zellen, die aus OT1-Mäusen isoliert wurden. Der transgene T-Zellrezeptor der CD8⁺ T-Zellen dieser Tiere erkennt das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ aus dem Hühnerovalbumin im Komplex mit MHC-I-Molekülen des Haplotyps H2-K^b auf der Oberfläche von Zellen. Auf diese Weise ist eine Antigen-spezifische Stimulation der OT1 CD8⁺ T-Zellen durch Zugabe des Peptids OVA₂₅₇₋₂₆₄ zum Kulturmedium möglich. Die Gegenwart steigender Konzentrationen von anti-BTLA 6A6 führte dabei zu einer reduzierten Produktion von IL-2 im

Vergleich zur Kontrolle, die auch bei unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 bzw. 100 ng/ml) nachweisbar war. Dies war allerdings nur dann der Fall, wenn anti-BTLA 6A6 in Platten-gebundener Form eingesetzt wurde, da der Antikörper in löslicher Form keinen Einfluss auf die IL-2-Produktion hatte (Daten nicht dargestellt). Anti-BTLA 6A6 blockiert somit nicht nur die Bindung von BTLA an HVEM, sondern wirkt unter bestimmten Bedingungen zudem agonistisch durch die Ligation von BTLA. Vergleichbare Ergebnisse wurden erhalten, wenn MACS-aufgereinigte T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen mit anti-CD3 stimuliert wurden, da es auch hier zu einer reduzierten Produktion von IL-2 in Gegenwart von anti-BTLA 6A6 kam (Daten nicht dargestellt).

3.2.6 Induktion von BTLA im Verlauf der *P. berghei* ANKA-Infektion

Um die BTLA-Expression im Verlauf murinen Malaria zu analysieren, wurde zunächst die Menge an BTLA-Transkript in verschiedenen Organen am Tag 9 nach PbA-Infektion bestimmt. Dazu wurde aus Gehirn, Leber, Milz und Niere von uninfizierten und PbA-infizierten C57BL/6-Mäusen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung spezifischer Primer wurde die Menge an BTLA-cDNA semiquantitativ bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch serielle Verdünnung der cDNA und Normierung auf das Haushaltsgen β -Aktin (Abb. 3.15 A). Die Abbildung dokumentiert, dass die BTLA-mRNA in den untersuchten Organen im Verlauf der PbA-Infektion hochreguliert wurde. Eine schwache basale Expression wurde in Gehirn, Leber, Milz und Niere detektiert, da BTLA von B- und T-Zellen, aber auch Makrophagen und DCs konstitutiv exprimiert wird. Die gesteigerte Menge an BTLA-Transkript während der murinen Malaria war in Milz und Niere besonders ausgeprägt, aber in Gehirn und Leber ebenfalls nachweisbar.

Um mit HVEM interagieren zu können, ist die Expression von BTLA auf der Zelloberfläche notwendig. Um die Regulation der BTLA-Expression auf Proteinebene zu analysieren, wurden Milzzellen aus uninfizierten und PbA-infizierten C57BL/6-Mäusen an den Tagen 6, 9 und 12 p.i. isoliert und die T-Zellmarker CD4/CD8 zusammen mit BTLA gefärbt (Abb. 3.15 B und C). BTLA wurde von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz konstitutiv exprimiert, die Expression am Tag 9 nach PbA-Infektion war jedoch auf beiden Zelltypen hochreguliert (Abb. 3.15 B). Die Kinetik der BTLA-Expression im Verlauf der murinen Malaria ist in der Abbildung 3.15 C dargestellt, wobei als Maß die mittlere Fluoreszenzintensität aufgetragen ist.

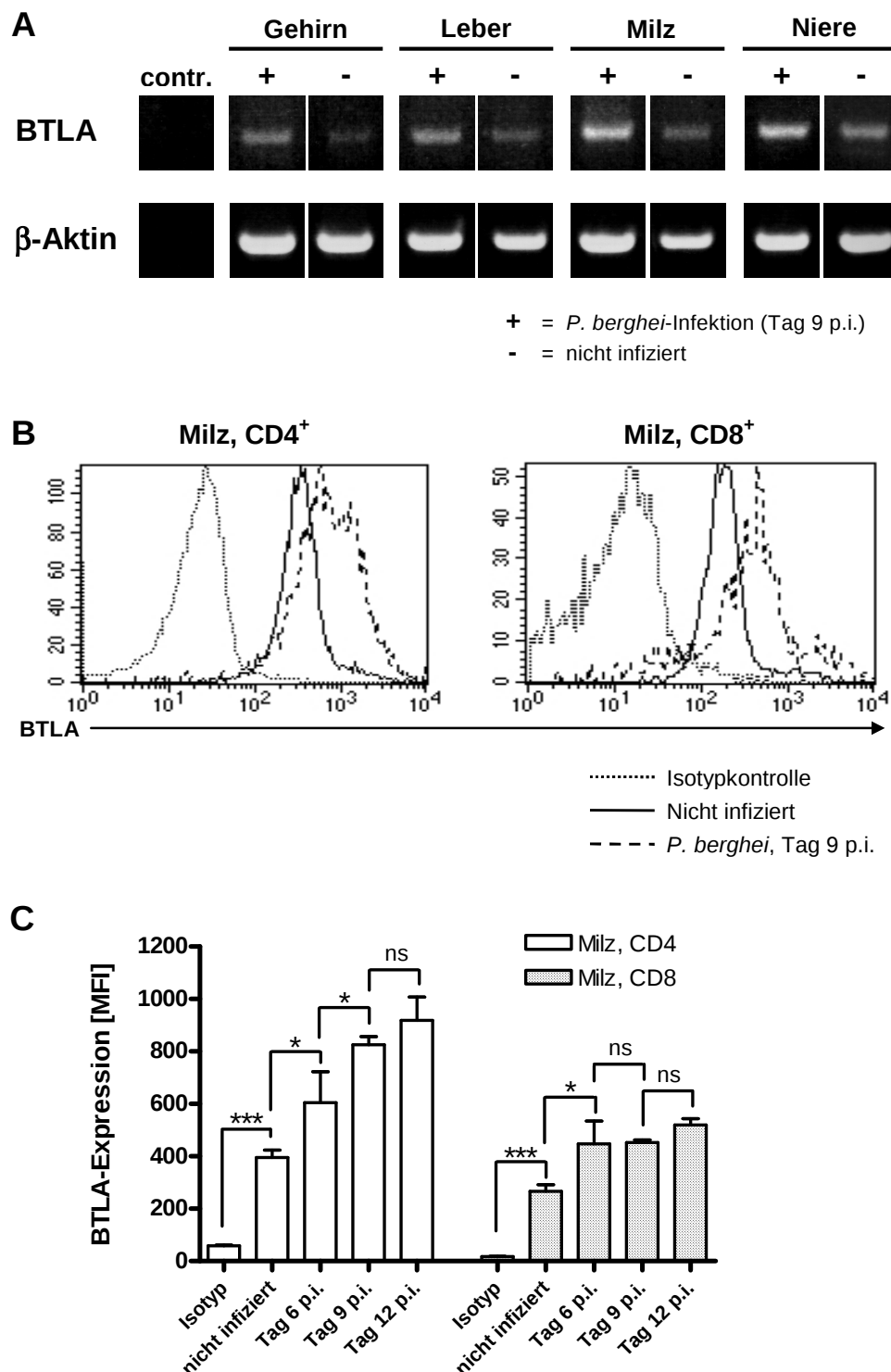


Abb. 3.15: Induktion von BTLA im Verlauf der murinen *P. berghei*-ANKA-Infektion

BTLA-mRNA wurde in verschiedenen Organen von uninfizierten bzw. PbA-infizierten C57BL/6-Mäusen am Tag 9 p.i. mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Dabei wurden die mRNA-Konzentrationen auf das Haushaltsgen β -Aktin normiert. Erkennbar ist die Induktion der BTLA-mRNA in Gehirn, Leber, Milz und Niere am Tag 9 p.i. (A). Die Kinetik der BTLA-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz im Verlauf der PbA-Infektion wurde durchflusszytometrisch durch Färbung mit anti-BTLA detektiert (B). Die Auswertung der BTLA-Expression ist in C dargestellt (Mittelwerte + SEM). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-test (unpaired, two-tailed) berechnet. Dargestellt ist die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

Die Abbildung dokumentiert, dass mit zunehmender Dauer der Malariainfektion die BTLA-Expression auf CD4⁺ T-Zellen der Milz kontinuierlich anstieg. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass zwischen Tag 6 und 8 nach der PbA-Infektion ein großer Teil der infizierten C57BL/6-Mäuse (ca. 80 %) an zerebraler Malaria verstarb. Die Bestimmung der BTLA-Expression an Tag 9 und 12 p.i. wurde daher bei den C57BL/6-Mäusen durchgeführt, die keine neurologischen Symptome entwickelten und zwischen Tag 15 und 20 an Anämie aufgrund der unkontrolliert ansteigenden Parasitämie verstarben. In Analogie zu den CD4⁺ T-Zellen wurde BTLA auch auf CD8⁺ T-Zellen der Milz hochreguliert, jedoch war ab Tag 6 p.i. kein weiterer Anstieg der BTLA-Expression messbar. Insgesamt wird also deutlich, dass die BTLA-Expression im Verlauf der PbA-Infektion auf den T-Zellen der Milz hochreguliert wurde.

3.2.7 Infiltration von BTLA⁺ T-Zellen in Leber und Gehirn

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass in der murinen Malaria aktivierte T-Zellen verstärkt in die Leber infiltrieren (Jacobs et al., 2004). Vor allem aktivierte CD8⁺ T-Zellen akkumulieren im Verlauf einer Immunantwort in der Leber, wo sie durch Apoptose abgeschaltet werden (Crispe et al., 2000). Die Akkumulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war erwartungsgemäß auf Gefrierschnitten der Leber immunhistochemisch im Verlauf der PbA-Infektion nachweisbar, während nahezu keine T-Zellen in der Leber von uninfizierten Mäusen detektiert wurden (Abb. 3.16 A). Zur Analyse der BTLA-Expression auf den infiltrierten T-Zellen wurden Lymphozyten aus der Leber isoliert und CD4/CD8 zusammen mit BTLA gefärbt (Abb. 3.16 B). Die BTLA-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Leber blieb im Verlauf der PbA-Infektion unverändert. Dies verdeutlicht, dass die während der Malaria beobachtete Induktion der BTLA-mRNA in der Leber durch die massive Infiltration von CD4⁺BTLA⁺ und CD8⁺BTLA⁺ T-Zellen verursacht wurde.

Da es auch im Gehirn zu einem Anstieg an BTLA-mRNA im Verlauf der PbA-Infektion kam (vgl. Abb. 3.15 A), wurde untersucht, ob der Verlauf der Erkrankung Einfluss auf die Expression von BTLA und seinem Liganden HVEM hatte. Dazu wurden mittels semiquantitativer RT-PCR die mRNA-Mengen an BTLA und HVEM im Gehirn von C57BL/6-Mäusen verglichen, die CM entwickelten und solchen, die keine neurologischen Symptome zeigten (Abb. 3.17 A). Dabei war im Verlauf einer unkomplizierten Malaria ein leichter Anstieg an BTLA- und HVEM-Transkript am Tag 9 p.i. nachweisbar. Die Steigerung der mRNA-Mengen für BTLA und seinen Liganden HVEM war jedoch viel deutlicher ausgeprägt, sofern die Mäuse CM entwickelten.

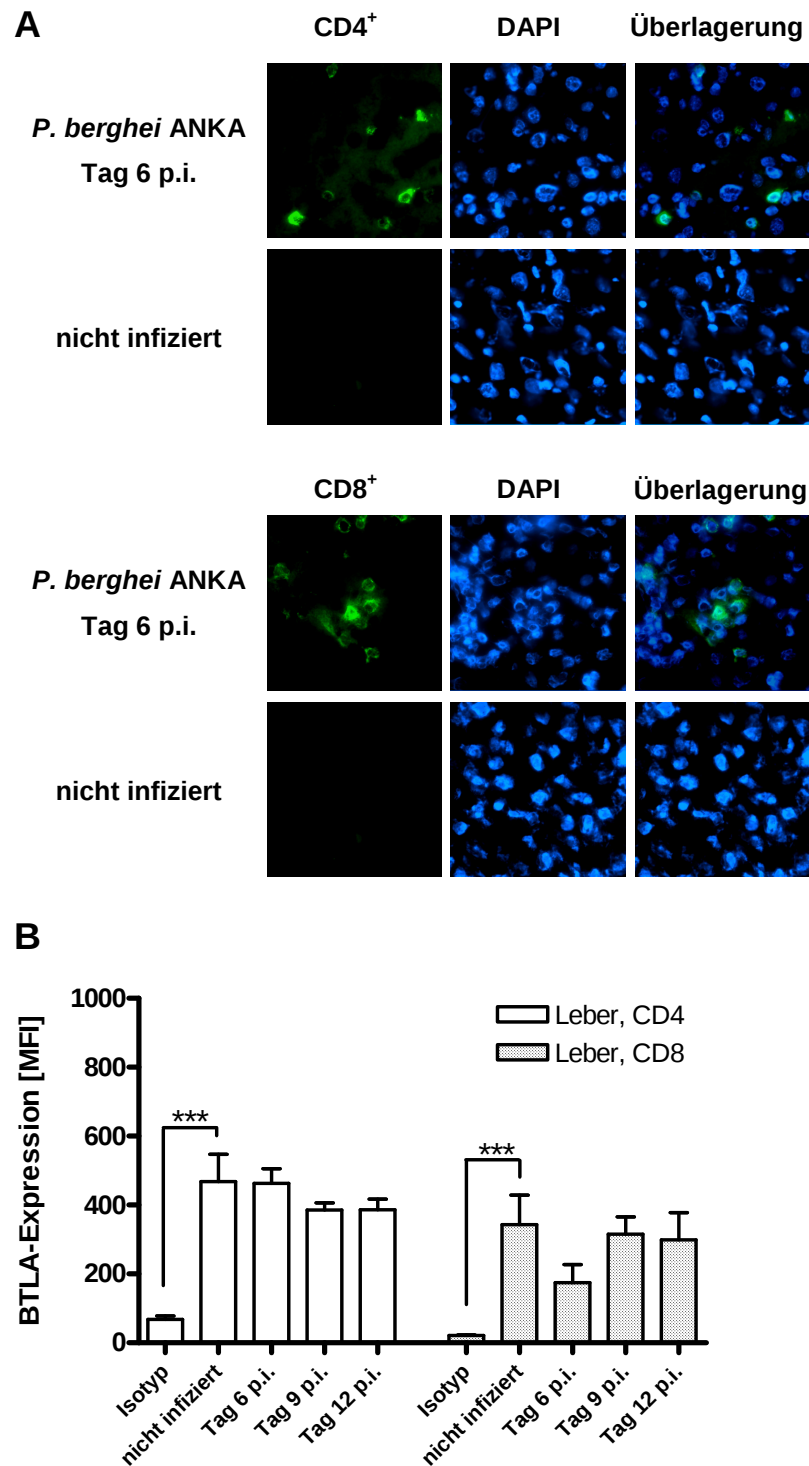


Abb. 3.16: Infiltration von T-Zellen in die Leber im Verlauf einer PbA-Infektion

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden auf Gefrierschnitten der Leber von uninfizierten und PbA-infizierten C57BL/6-Mäusen am Tag 6 p.i. durch Färbung mit FITC-konjugiertem anti-CD4 bzw. anti-CD8 detektiert. Dabei war eine Akkumulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Leber während der PbA-Infektion erkennbar (A). Zur Messung der BTLA-Expression wurden Lymphozyten aus der Leber zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der PbA-Infektion isoliert und die BTLA-Expression durchflusszytometrisch bestimmt (B). Die Mittelwerte + SEM von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Student's t-test (unpaired, two-tailed) berechnet.

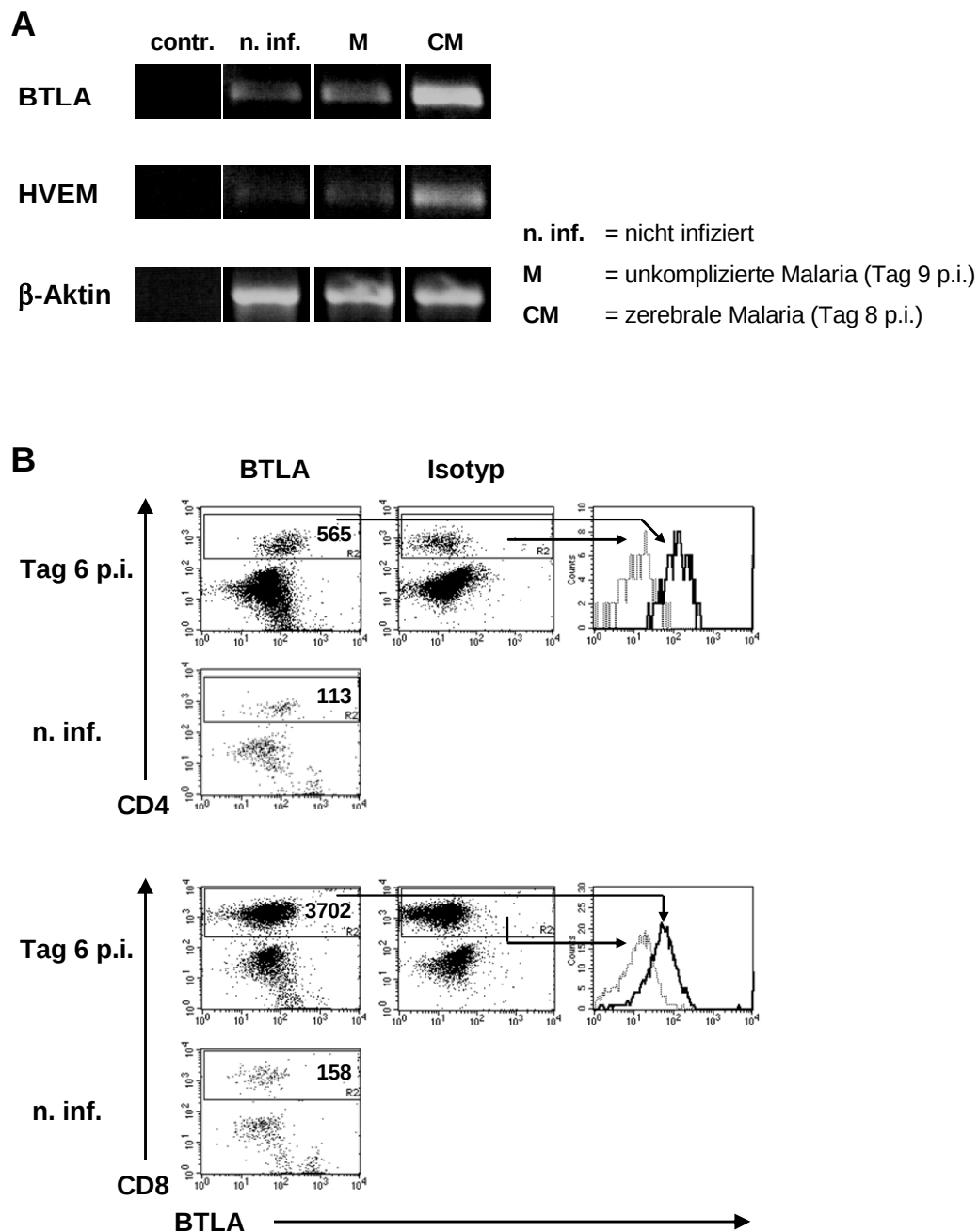


Abb. 3.17: Infiltration von T-Zellen ins Gehirn im Verlauf einer PbA-Infektion

Die Menge an mRNA von BTLA und HVEM wurde in Hirnbiopsien von uninfizierten und PbA-infizierten C57BL/6-Mäusen durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. BTLA und HVEM wurden verstärkt im Gehirn von Mäusen exprimiert, die eine zerebrale Malaria (CM) entwickelten (A). Die Anzahl an im Gehirn sequestrierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch in Hirnbiopsien von PbA-infizierten C57BL/6-Mäusen bestimmt (als Kontrolle wurden uninfizierte Mäuse verwendet). Eine Gesamtzahl von $5 \cdot 10^6$ Zellen wurde aufgenommen und auf CD45⁺ Zellen gated (B). Am Tag 6 nach PbA-Infektion war eine Akkumulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Hirn nachweisbar, die BTLA exprimierten. Ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass sowohl im Verlauf der humanen *P. falciparum*-Infektion als auch während der murinen PbA-Infektion durch die Einwanderung aktivierter T-Zellen und deren Sequestration an das Hirnendothel die Blut-Hirn-Schranke durchlässig wird (Pino et al., 2005; Medana et al., 2006). Vor allem CD8⁺ T-Zellen sequestrieren im Gehirn und sind auch essentiell für die Induktion der CM (Nitcheu et al., 2003). Zur Quantifizierung der Anzahl an sequestrierten T-Zellen wurden am Tag 6 nach der PbA-Infektion die Zellpopulationen im Hirn durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.17 B). Dabei wurde auf CD45⁺ Zellen gated und gleichzeitig die T-Zellmarker CD4/CD8 zusammen mit BTLA gefärbt. Während in uninfizierten C57BL/6-Mäusen nahezu keine T-Zellen im Gehirn nachweisbar waren, akkumulierten am Tag 6 p.i. sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen im Gehirn. Alle sequestrierten T-Zellen exprimierten BTLA, so dass die Induktion von BTLA-mRNA im Gehirn im Verlauf der PbA-Infektion –wie in der Leber– auf die Infiltration von BTLA⁺ T-Zellen zurückzuführen ist. Eine verstärkte Infiltration von T-Zellen wurde auch in der Niere beobachtet, so dass der Anstieg an BTLA-mRNA in diesem Organ ebenfalls auf der Einwanderung von CD4⁺BTLA⁺ und CD8⁺BTLA⁺ T-Zellen beruhte (Daten nicht dargestellt).

3.2.8 Einfluss von BTLA-Ig auf die Inzidenz an zerebraler Malaria

Bei der humanen CM handelt es sich um eine im Verlauf der *P. falciparum*-Infektion auftretende Komplikation, die mit neurologischen Störungen einhergeht und unbehandelt zum Tod führt (Mackintosh et al., 2004). Ein Mausmodell für CM, das einige Charakteristika der humanen CM aufweist, stellt die *P. berghei* ANKA-Infektion dar (Li et al., 2001). Während jedoch die humane CM von der Sequestration Parasiten-infizierter Erythrozyten begleitet wird, spielen in der murinen PbA-Infektion die Sequestration von T-Zellen und die systemische Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen eine entscheidende Rolle (Renia et al., 2006). Um die Bedeutung der BTLA/HVEM-Interaktion auf die Induktion der CM zu untersuchen, wurden C57BL/6-Mäuse vor der PbA-Infektion mit dem hergestellten BTLA-Ig-Fusionsprotein behandelt. Dabei wurde BTLA-Ig einen Tag vor der PbA-Infektion in einer Dosis von 20 µg i.p. injiziert und die Mäuse täglich auf neurologische Symptome hin beobachtet (Abb. 3.18 A). Die verwendete Dosis an BTLA-Ig (1 mg/kg Körpergewicht) wurde dabei anhand von Studien mit Fusionsmolekülen gewählt, die in ähnlicher Dosis eingesetzt wurden (Daikh et al., 1997). Die Abbildung dokumentiert, dass alle PbA-infizierten Mäuse zwischen Tag 6 und 7 neurologische Symptome entwickelten und an CM verstarben, so dass die Applikation von BTLA-Ig keinen Einfluss auf die Inzidenz an CM hatte. Die Parasitämie wurde ebenfalls nicht durch das BTLA-Ig-

Fusionsproteins beeinflusst (Abb. 3.18 B). *In vitro* führte BTLA-Ig aufgrund seiner Bindung an endogenes HVEM und der dadurch bedingten Blockade der koinhibitorischen BTLA/HVEM-Interaktion zu einer gesteigerten Proliferation und IL-2-Produktion von T-Zellen (vgl. Abb. 3.12). Deshalb wäre bei der Applikation von BTLA-Ig *in vivo* eine Verschlimmerung des Krankheitsverlaufes (höhere Inzidenz an CM oder früheres Einsetzen der neurologischen Symptome) zu erwarten gewesen. Allerdings betrug die Inzidenz an CM in der Kontrollgruppe bereits 100 %, so dass eine Steigerung in der mit BTLA-Ig behandelten Mausgruppe nicht hätte nachgewiesen werden können.

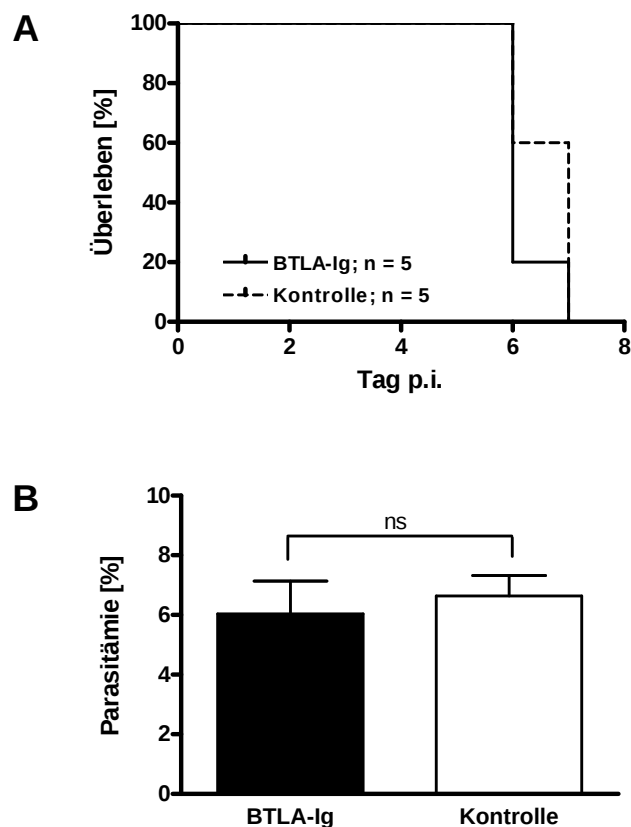


Abb. 3.18: Einfluss von BTLA-Ig auf den Verlauf einer PbA-Infektion

20 µg BTLA-Ig bzw. PBS wurden C57BL/6-Mäusen am Tag -1 intraperitoneal injiziert und diese am nachfolgenden Tag i.p. mit 2×10^6 PbA-infizierten Erythrozyten infiziert. Die Mäuse wurden täglich auf neurologische Symptome beobachtet. Mäuse, die eine zerebrale Malaria entwickelten, wurden getötet (A). Die Parasitämien wurden am Tag 6 p.i. bestimmt (B). Die Mittelwerte + SEM der Parasitämien von je fünf Mäusen sind aufgetragen. Ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Student's t-test (unpaired, two-tailed) wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanz verwendet.

3.2.9 Einfluss des Anti-BTLA-Antikörpers 6A6 auf die Inzidenz an CM

Es wurde bereits gezeigt, dass Platten-gebundener Anti-BTLA-Antikörper 6A6 agonistisch wirkt und zur verringerten IL-2-Sekretion durch aktivierte T-Zellen führt (vgl. Abb. 3.14). Um den Effekt der BTLA-Ligation im Verlauf der PbA-Infektion zu untersuchen, wurden je 200 µg anti-BTLA 6A6 oder Hamster-IgG am Tag -1 i.p. in C57BL/6-Mäuse injiziert und diese täglich auf neurologische Symptome hin beobachtet (Abb. 3.19 A). In der Kontrollgruppe verstarben dabei durchschnittlich 80 % der infizierten C57BL/6-Mäuse an CM. Es gab interexperimentelle Abweichungen, da Stabilate verschiedener Präparationen für die PbA-Infektion verwendet wurden (Inzidenz an CM in jedem Experiment zwischen 70 und 100 %). Die Applikation von anti-BTLA am Tag -1 bewirkte eine deutliche Reduktion der Inzidenz an CM, da nur 15 % der PbA-infizierten C57BL/6-Mäuse neurologische Symptome entwickelten. Dieser Effekt der Anti-BTLA-Behandlung beruhte nicht auf einer veränderten Parasitämie, da es keinen signifikanten Unterschied zwischen mit anti-BTLA und Hamster-IgG behandelten Mäusen gab (Abb. 3.19 B).

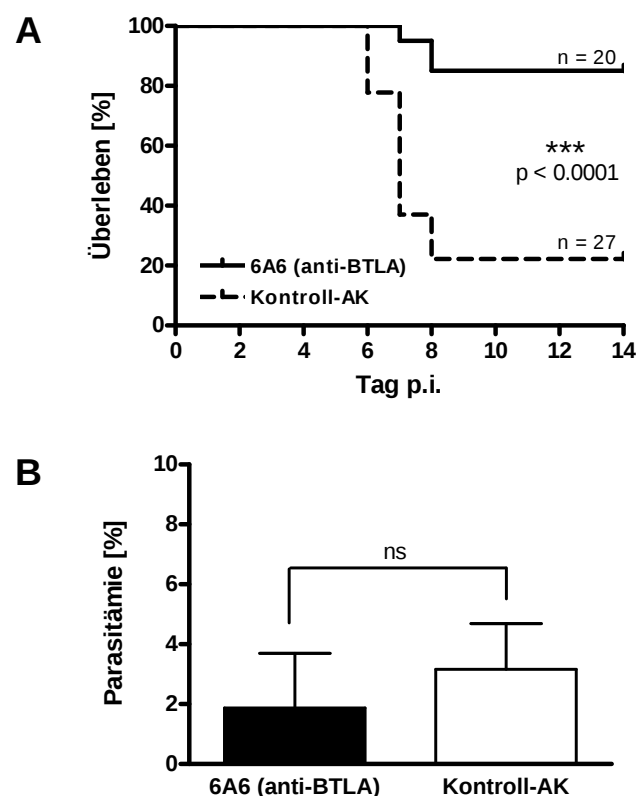


Abb. 3.19: Einfluss von anti-BTLA 6A6 auf den Verlauf einer PbA-Infektion

200 µg anti-BTLA 6A6 bzw. Kontroll-Antikörper wurden C57BL/6-Mäusen am Tag -1 i.p. injiziert und diese mit 1×10^6 PbA-infizierten Erythrozyten infiziert. Mäuse, die CM entwickelten, wurden getötet. Der Log-Rank Test wurde angewandt, um die Überlebenskurven der Mäuse nach Behandlung mit anti-BTLA bzw. Kontroll-Antikörper zu vergleichen (A). Die Parasitämien wurden am Tag 6 p.i. bestimmt (B). Die Mittelwerte + SEM der Parasitämien sind aufgetragen (anti-BTLA: n=20, Kontroll-Antikörper: n=27). Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test (unpaired, two-tailed) berechnet. Dargestellt ist die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.10 Reduktion der T-Zellsequestration im Gehirn nach Anti-BTLA-Behandlung

Die Induktion der CM im Verlauf der PbA-Infektion wird von einer Sequestration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an das Hirnendothel begleitet (Yanez et al., 1996). Zur Untersuchung des Effektes von anti-BTLA 6A6 auf die T-Zellsequestration wurde C57BL/6-Mäusen am Tag -1 anti-BTLA bzw. Hamster-IgG injiziert und die Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Gehirn am Tag 6 p.i. durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.20 B). Es wurde auf CD45⁺ Zellen gated und gleichzeitig eine Kofärbung von CD4/CD8 sowie dem Aktivierungsmarker CD62L durchgeführt, um zwischen naiven und aktivierten T-Zellen zu unterscheiden. CD62L (auch als L-Selektin bezeichnet) reguliert dabei das Homing von T-Zellen in lymphatische Organe (Rosen, 2004). Es bindet u.a. die Liganden GlyCAM-1 auf postkapillären Venolen mit hohem Endothel und MadCAM-1, das vom Endothel der Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe exprimiert wird. Nach der T-Zellaktivierung wird die Expression von CD62L herunterreguliert, so dass aktivierte T-Zellen nicht mehr in die lymphatischen Gewebe gelangen, sondern zum Ort der Infektion wandern. Nach der Behandlung der Mäuse mit anti-BTLA 6A6 und nachfolgender PbA-Infektion war die Zahl der CD45⁺ Zellen im Hirn im Vergleich zur Behandlung mit Hamster-IgG reduziert (Abb. 3.20 A, linke Spalte). Nahezu alle sequestrierten CD8⁺CD45⁺ T-Zellen wiesen erwartungsgemäß einen CD62L^{niedrig}-Phänotyp auf und waren somit aktiviert. Eine Behandlung mit anti-BTLA führte zu einer Reduktion der Zahl an CD8⁺ T-Zellen im Hirn um etwa 50 % (Abb. 3.20 A, rechte Spalte). Zwar war die T-Zellsequestration nicht bis auf das Niveau von uninfizierten Mäusen reduziert, jedoch war der beobachtete Effekt statistisch signifikant und betraf auch die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen im Gehirn (Abb. 3.20 B). Insgesamt überstieg die Anzahl an sequestrierten CD8⁺ T-Zellen die der CD4⁺ T-Zellen um das Doppelte bis Dreifache.

3.2.11 Reduzierte pro-inflammatorische Immunantwort durch anti-BTLA 6A6

Pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 oder LT- α , die in der frühen Phase der Malaria freigesetzt werden, führen zur Induktion von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) auf dem Gefäßendothel und begünstigen dadurch die Sequestration von T-Zellen (Wassmer et al., 2005). Da die Applikation von anti-BTLA 6A6 die T-Zellsequestration im Gehirn während der PbA-Infektion inhibierte, wurde untersucht, ob dieser Effekt mit einer veränderten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine korrelierte. Dazu wurden am Tag 6 p.i. Serumzytokine von Mäusen analysiert, die vor der PbA-Infektion mit anti-BTLA 6A6 oder Hamster-IgG behandelt worden waren (Abb. 3.21).

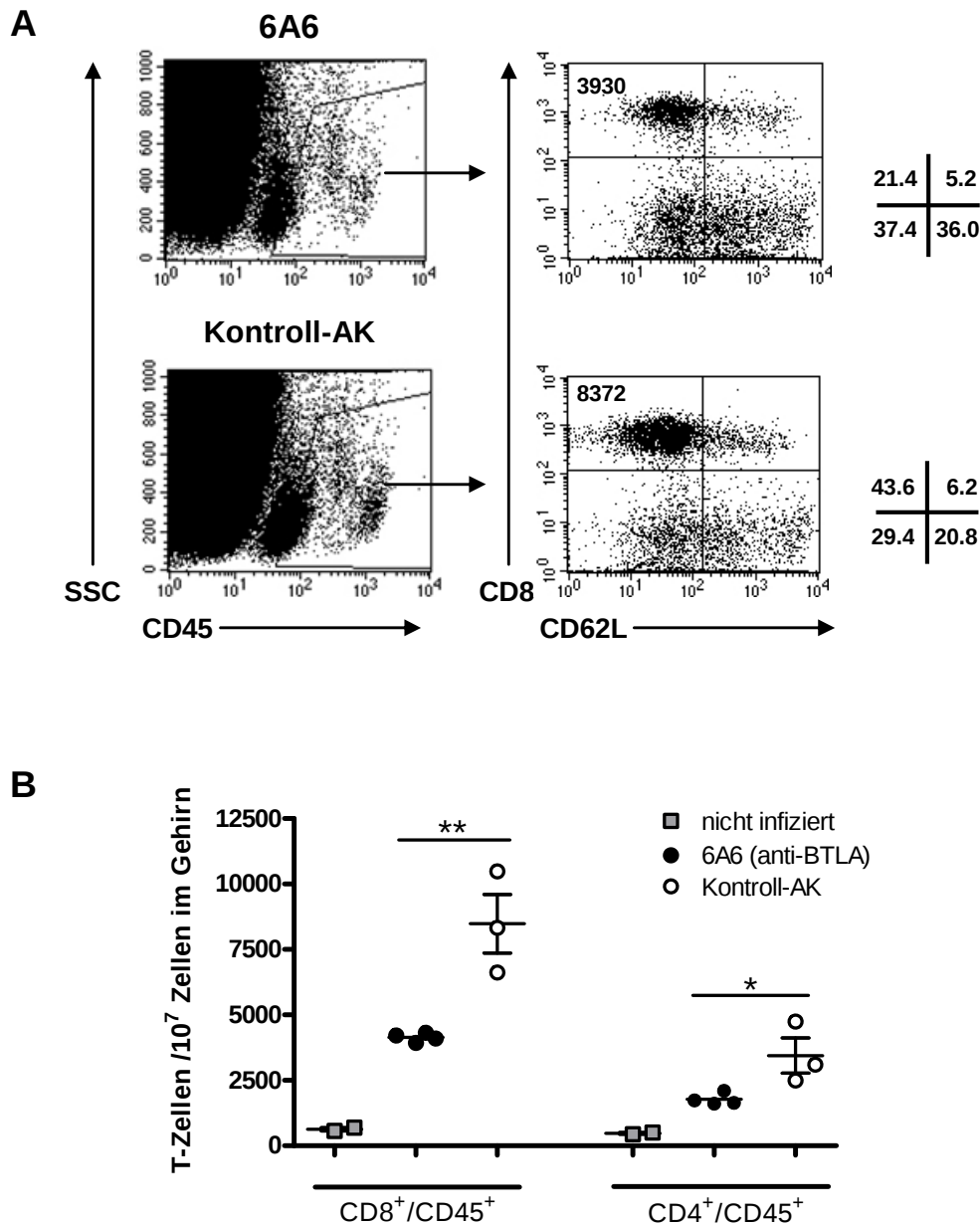


Abb. 3.20: Reduktion der Sequestration von T-Zellen im Gehirn nach Behandlung mit anti-BTLA 6A6

200 µg anti-BTLA 6A6 bzw. Kontroll-Antikörper wurden C57BL/6-Mäusen am Tag -1 i.p. injiziert und diese am folgenden Tag i.p. mit 1×10^6 PbA-infizierten Erythrozyten infiziert. Die Anzahl an CD45⁺CD8⁺ T-Zellen in Hirnbiopsien wurde am Tag 6 p.i. durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Quantifizierung der aktivierten CD8⁺ T-Zellen wurde der Aktivierungsmarker CD62L auf den CD45⁺CD8⁺ T-Zellen gefärbt (A). Die Auswertung zeigt, dass die Anzahl an CD45⁺CD8⁺ und CD45⁺CD4⁺ T-Zellen im Gehirn nach Behandlung der Mäuse mit anti-BTLA 6A6 im Vergleich zum Kontroll-Antikörper etwa 50 % reduziert ist (B). Die Querbalken geben die Mittelwerte $\pm$ SEM der Mäuse einer Gruppe an (uninfiziert: n=2, anti-BTLA: n=4, Kontroll-AK: n=3). Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test (unpaired, two-tailed) ermittelt. Ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Dabei ergab sich, dass nach Anti-BTLA-Behandlung die Konzentrationen der Zytokine IL-18 und IFN- γ signifikant reduziert waren (Abb. 3.21 A und B). Die Konzentration an IL-6 im Serum war ebenfalls reduziert, allerdings erreichten die Werte keine statistische Signifikanz (Abb. 3.21 C). Hinsichtlich der Konzentration der übrigen untersuchten Zytokine im Serum war entweder kein Unterschied zwischen Anti-BTLA- und Kontrollgruppe nachweisbar (IL-12p40) oder die Konzentrationen lagen unter der ELISA-Nachweisgrenze (IL-1 β , IL-10, IL-12p70, TNF- α ; Daten nicht dargestellt). Die BTLA-Ligation *in vivo* durch anti-BTLA 6A6 führte also zu einer verringerten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine.

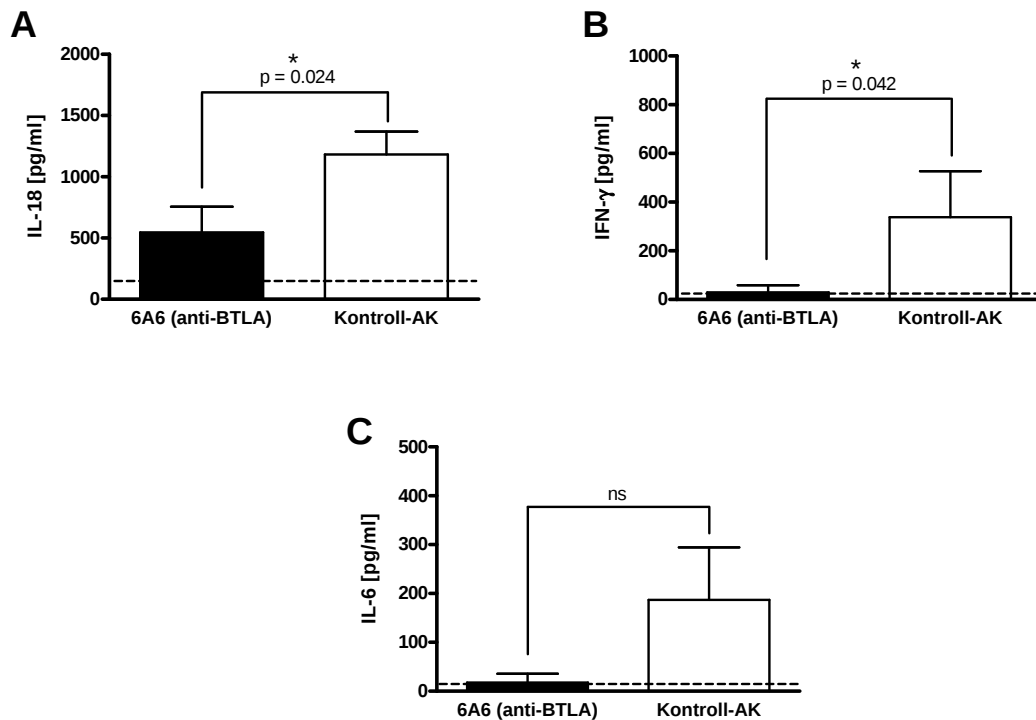


Abb. 3.21: Reduktion der Serumzytokine im Verlauf der PbA-Infektion nach Behandlung mit anti-BTLA 6A6
 200 μ g anti-BTLA 6A6 bzw. Kontroll-Antikörper wurden C57BL/6-Mäusen am Tag -1 i.p. injiziert und diese am folgenden Tag i.p. mit 1×10^6 PbA-infizierten Erythrozyten infiziert. Am Tag 6 p.i. wurden die Zytokine IL-18 (A), IFN- γ (B) und IL-6 (C) in Sera der PbA-infizierten Mäuse bestimmt. Die Mittelwerte + SEM sind aufgetragen (anti-BTLA: n=7, Kontroll-AK: n=6). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-test (unpaired, one-tailed) berechnet.

3.2.12 Kein Einfluss auf die Expression von ICAM-1 durch anti-BTLA 6A6

Die Behandlung von Mäusen mit Anti-LFA-1-Antikörper, der die Interaktion von LFA-1 auf den T-Zellen mit ICAM-1 auf aktiviertem Endothel blockiert, schützt diese vor CM (Grau et al., 1991; Falanga et al., 1991). Zur Analyse der Expression von ICAM-1 auf Hirnendothel wurden Gefrierschnitte der Gehirne von Mäusen am Tag 6 nach PbA-Infektion hergestellt und ICAM-1 immunhistochemisch detektiert (Abb. 3.22). Dabei wurde CD31 als ein konstitutiv exprimierter Endothelmarker erwartungsgemäß in uninfizierten und PbA-infizierten C57BL/6-Mäusen auf dem Hirnendothel nachgewiesen. Dagegen wurde ICAM-1 nur nach der PbA-Infektion induziert, wobei jedoch kein Unterschied in der ICAM-Expression zwischen den mit anti-BTLA 6A6 und Hamster-IgG behandelten Mäusen festgestellt wurde. Somit hatte die Anti-BTLA-Behandlung keinen Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Hirnendothel im Verlauf der PbA-Infektion. Durch Färbung der CD8⁺ T-Zellen auf den Gefrierschnitten des Gehirns wurde immunhistochemisch die reduzierte T-Zellsequestration nach Applikation von anti-BTLA 6A6 bestätigt (vgl. auch Abb. 3.20).

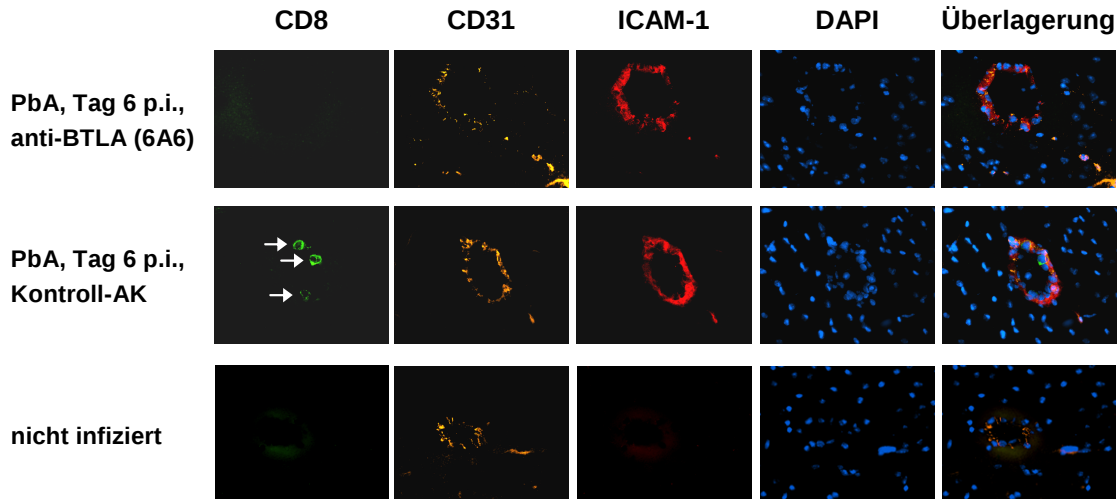


Abb. 3.22: Kein Einfluss auf die Expression von ICAM-1 durch Behandlung mit anti-BTLA 6A6

200 µg anti-BTLA 6A6 bzw. Kontroll-Antikörper wurden C57BL/6-Mäusen am Tag -1 i.p. injiziert und diese am folgenden Tag i.p. mit 1×10^6 PbA-infizierten Erythrozyten infiziert. Am Tag 6 nach der PbA-Infektion wurden Gefrierschnitte des Gehirns hergestellt. Es wurden CD8⁺ T-Zellen gefärbt (grün), und die Expression von CD31 (gelb) und ICAM-1 (rot) auf Hirnendothelien wurde immunhistochemisch analysiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

3.2.13 Keine systemische Immunsuppression nach Anti-BTLA-Behandlung

Weil in den mit anti-BTLA 6A6 behandelten C57BL/6-Mäusen die Konzentration an IFN- γ im Serum reduziert war, wurde untersucht, ob die BTLA-Ligation *in vivo* zur Suppression der T-Zellaktivierung führte. Dazu wurden Milzzellen von Anti-BTLA- oder Hamster-IgG-behandelten Mäusen am Tag 6 nach der PbA-Infektion isoliert und die Zusammensetzung der Milz sowie die T-Zellaktivierung durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle wurden dabei Milzzellen aus uninfizierten Mäusen verwendet (Abb. 3.23). Sowohl der prozentuale Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz war nach der Applikation von anti-BTLA am Tag -1 und nachfolgende PbA-Infektion unverändert als auch die Expression von Aktivierungsmarkern in beiden Gruppen (jeweils gleiche Anteile an CD4⁺ T-Zellen waren CD62L^{niedrig}, CD69⁺ und CD25⁺). Daraus ergibt sich, dass T-Zell-Priming und die Expansion von T-Effektorzellen durch die BTLA-Ligation nicht inhibiert wurden. Außerdem fand keine Depletion der BTLA⁺ T-Zellen statt, da die Zusammensetzung der Milz nach Applikation von anti-BTLA 6A6 unverändert war.

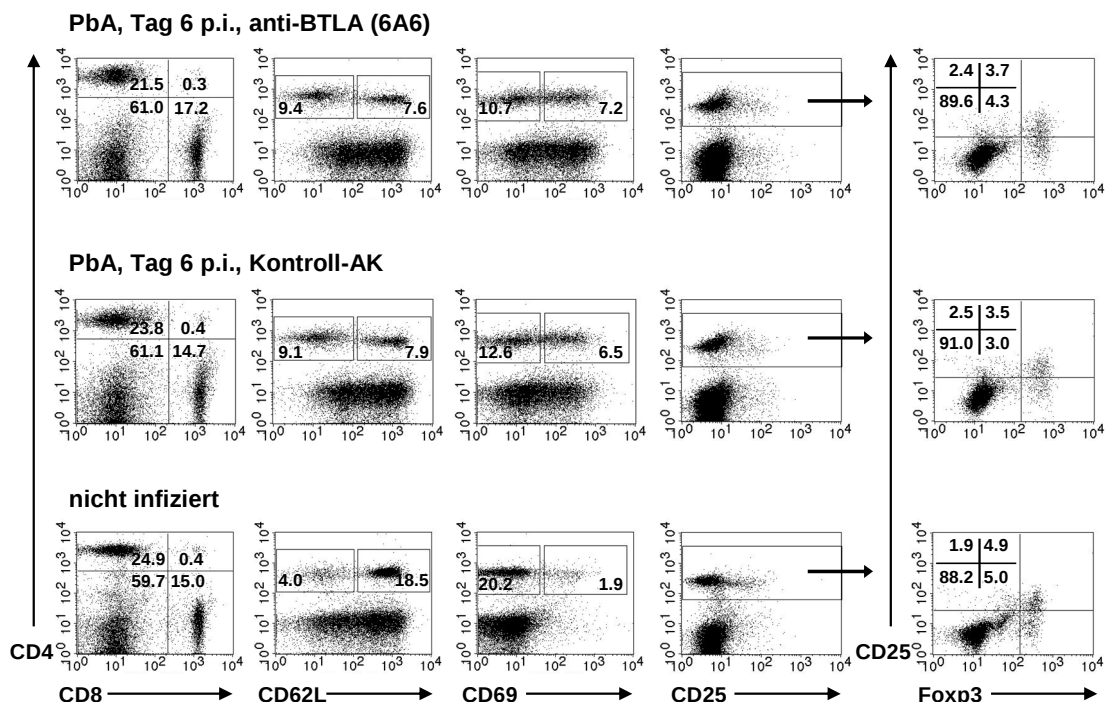


Abb. 3.23: Kein Einfluss auf die Expression von Aktivierungsmarkern durch anti-BTLA-Behandlung

200 μ g anti-BTLA 6A6 bzw. Kontroll-Antikörper wurden C57BL/6-Mäusen am Tag -1 i.p. injiziert und diese am folgenden Tag i.p. mit 1×10^6 PbA-infizierten Erythrozyten infiziert. Am Tag 6 p.i. wurde der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz und die Expression der Aktivierungsmarker CD62L, CD69 und CD25 auf CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Zusätzlich wurde die Frequenz an T_{reg} anhand der Expression des T_{reg}-spezifischen Markers Foxp3 analysiert. Als Kontrolle dienten Milzzellen aus uninfizierten Mäusen. Ein repräsentatives von drei Experimenten ist dargestellt.

Um einen möglichen Effekt von anti-BTLA 6A6 auf regulatorische T-Zellen zu analysieren, wurde der Anteil an T_{reg} in der Milz durch intrazelluläre Färbung des T_{reg}-Transkriptionsfaktors Foxp3 bestimmt (Abb. 3.23, rechte Spalte). Hinsichtlich des Anteils an CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg} ergab sich am Tag 6 p.i. kein signifikanter Unterschied zwischen anti-BTLA- und Hamster-IgG-behandelter Gruppe, so dass ein Effekt der BTLA-Ligation auf die T_{reg}-vermittelte Suppression der T-Zellaktivierung unwahrscheinlich ist.

Die Inzidenz an CM nach einmaliger Injektion von 200 µg anti-BTLA 6A6 war signifikant reduziert, wenn diese vor der PbA-Infektion stattfand. Für eine therapeutische Anwendung wäre die Wirksamkeit jedoch nach dem Auftreten der ersten neurologischen Symptome notwendig. Um den Effekt der Anti-BTLA-Behandlung zu späteren Zeitpunkten nach der PbA-Infektion zu testen, wurde anti-BTLA 6A6 an den Tagen 2 und 4 p.i. sowie nach dem Auftreten der ersten neurologischen Symptome eingesetzt (Tabelle 3.I). Da nach dem Tag 2 p.i. die Applikation des Anti-BTLA-Antikörpers nicht mehr zu einer Reduktion der Inzidenz an CM führte, scheint die BTLA-Ligation bereits während des T-Zellprimings erforderlich zu sein.

Tabelle 3.I: Reduzierte Inzidenz an CM bis zum Tag 2 nach PbA-Infektion

Behandlung ^a	Parasitämie an Tag 6 [% ± SEM]	Anzahl CM/Gesamtzahl ^b
Kontroll-Antikörper (Tag -1)	4,76 ± 0,56	7/8 (87,5 %)
anti-BTLA (Tag -1)	4,53 ± 0,72	2/8 (25,0 %) ^d
anti-BTLA (Tag 2 p.i.)	4,04 ± 0,42	2/8 (25,0 %) ^e
anti-BTLA (Tag 4 p.i.)	5,00 ± 1,18	5/8 (62,5 %) ^f
anti-BTLA (während CM) ^c	n. d.	4/4 (100 %)

^a C57BL/6-Mäuse wurden mit 1 x 10⁶ PbA-infizierten Erythrozyten infiziert, und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 200 µg anti-BTLA 6A6 bzw. Hamster-IgG i.p. injiziert. Die Parasitämie wurde am Tag 6 p.i. bestimmt, und die Mäuse wurden täglich auf neurologische Symptome beobachtet. Die statistische Analyse der Parasitämien wurde mit ANOVA durchgeführt. Die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

^b Die Anzahl an Mäusen, die an CM starben, ist bezogen auf die Gesamtzahl an PbA-infizierten Mäusen angegeben. Der Log-Rank Test wurde angewandt, um das Überleben der Mäuse nach Behandlung mit anti-BTLA 6A6 und Hamster-IgG zu vergleichen.

^c Die Applikation von anti-BTLA 6A6 erfolgte beim Auftreten der ersten neurologischen Symptome (Ataxie, Reflexausfälle) zwischen Tag 6 und Tag 8 p.i.

^d *, p = 0.014 (verglichen mit Hamster-IgG)

^e **, p = 0.006 (verglichen mit Hamster-IgG)

^f nicht signifikant, p > 0.05 (verglichen mit Hamster-IgG)

3.2.14 PbA-Infektion von HVEM^{-/-}-Mäusen

Neben der koinhibitorischen BTLA/HVEM-Interaktion besteht die Möglichkeit, dass HVEM als Adhäsionsmolekül fungiert, dessen Expression (z.B. durch das Hirnendothel) direkt zu einer Sequestration BTLA-exprimierender T-Zellen beiträgt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden HVEM^{-/-}-Mäuse, die von Professor Dr. Klaus Pfeffer (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurden, mit *P. berghei* ANKA infiziert. HVEM^{-/-}-Mäuse wurden durch homologe Rekombination generiert, wobei das HVEM-Wildtyp-Allel durch eine Kasette mit inaktiviertem HVEM-Allel ersetzt wurde (Wang et al., 2005). Die Zucht der auf C57BL/6-Hintergrund rückgekreuzten HVEM^{-/-}-Mäuse erfolgte durch die Paarung von HVEM^{+/-}-Mäusen. Die HVEM-Defizienz wurde durch PCR-Amplifikation des HVEM-Wildtyp-Allels bzw. des inaktivierten Allels in aus Schwanzstücken isolierter genomischer DNA überprüft (Abb. 3.24). Bei homozygoten HVEM^{-/-}-Mäusen waren nur die inaktivierten HVEM-Allele nachweisbar, während beide Wildtyp-Allele fehlten. Aufgrund der HVEM-Defizienz fehlt in diesen Mäusen die koinhibitorische BTLA/HVEM-Interaktion, gleichzeitig kann jedoch auch die Bindung von HVEM an LIGHT nicht mehr stattfinden.

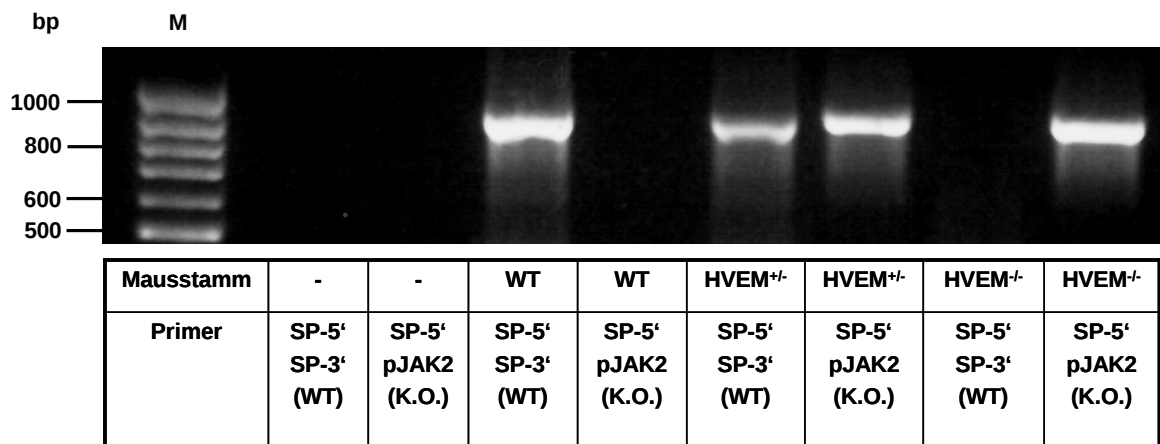


Abb. 3.24: Genotypisierung der HVEM^{-/-}-Mäuse

Die Abbildung zeigt die Produkte der Genotypisierungs-PCR von Wildtyp-, HVEM^{+/-}- und HVEM^{-/-}-Mäusen. Zur Detektion des Wildtyp-Allels wurden die Primer SP-5' und SP-3' verwendet, während das inaktivierte HVEM-Allel mit den Primern SP-5' und pJAK2 amplifiziert wurde. In HVEM^{+/-}-Mäusen lieferten beide Primerkombinationen ein PCR-Produkt.

Würde HVEM als Adhäsionsmolekül fungieren und durch Bindung an BTLA auf T-Zellen direkt zu deren Sequestration an das Hirnendothel führen, sollten HVEM^{-/-}-Mäuse aufgrund des Fehlens der BTLA/HVEM-Interaktion nicht mehr an CM erkranken. Bei der PbA-Infektion von HVEM^{-/-}-Mäusen und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen zeigte sich jedoch, dass ein vergleichbarer Anteil der Mäuse beider Gruppen an CM verstarb und das Fehlen der BTLA/HVEM-Interaktion keinen Einfluss auf die Inzidenz an CM hatte (Abb. 3.25 A). Somit scheint auch die Interaktion des kostimulatorischen Moleküls LIGHT mit HVEM nicht essentiell für die Induktion der CM zu sein. Wurden die HVEM^{-/-}-Mäuse jedoch am Tag -1 mit anti-BTLA 6A6 behandelt, war die Inzidenz an CM statistisch signifikant reduziert. Diese Beobachtung stellt einen weiteren Beleg dafür dar, dass anti-BTLA 6A6 *in vivo* agonistisch wirkt und BTLA ligiert. Im Fall einer Blockade der BTLA/HVEM-Interaktion durch den Anti-BTLA-Antikörper hätte die Behandlung von HVEM^{-/-}-Mäusen keine Auswirkung auf die Inzidenz an CM gehabt. Der Effekt der BTLA-Ligation auf die Reduktion der Inzidenz an CM war in den HVEM^{-/-}-Mäusen allerdings geringer ausgeprägt als in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (vgl. Abb. 3.19). Dies beruht möglicherweise darauf, dass in den HVEM^{-/-}-Mäusen BTLA nicht durch endogenes HVEM ligiert werden kann, während die BTLA/HVEM-Interaktion in den Wildtyp-Mäusen neben der Ligation durch den Anti-BTLA-Antikörper möglich ist. Die Parasitämie in HVEM^{-/-}-Mäusen im Verlauf der PbA-Infektion war vergleichbar mit den Wildtyp-Mäusen und blieb auch nach Behandlung mit anti-BTLA 6A6 unverändert (Abb. 3.25 B). Neben der verringerten Inzidenz an CM führte die Anti-BTLA-Behandlung der HVEM^{-/-}-Mäuse zu einer reduzierten Sequestration von T-Zellen im Gehirn (Abb. 3.25 C). Anti-BTLA 6A6 wirkte also *in vivo* nicht als blockierender Antikörper, sondern agonistisch durch BTLA-Ligation.

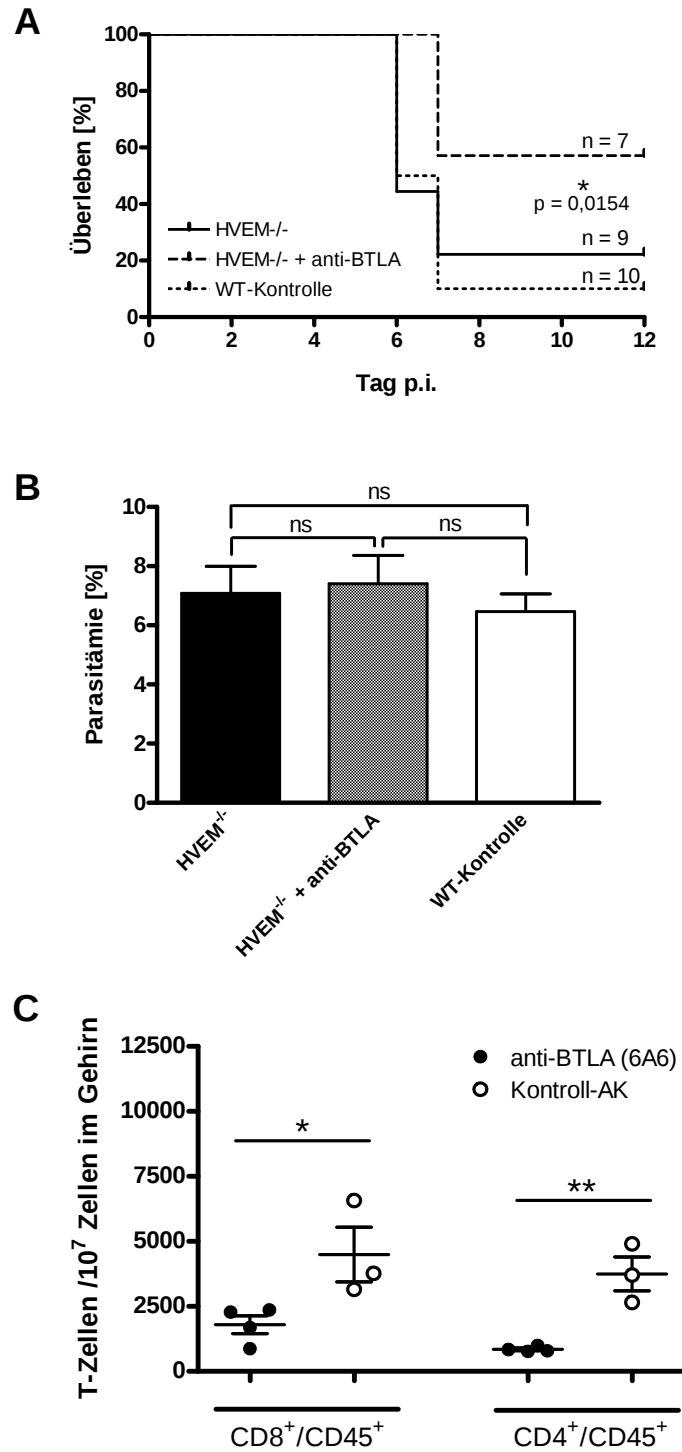


Abb. 3.25: Infektion von HVEM^{-/-}-Mäusen mit PbA

200 µg anti-BTLA 6A6 bzw. Kontroll-Antikörper wurden HVEM^{-/-}-Mäusen am Tag -1 i.p. injiziert und diese mit 2×10^6 PbA-infizierten Erythrozyten infiziert. Als Kontrolle dienten PbA-infizierte C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (WT). Die Mäuse wurden auf neurologische Symptome beobachtet und getötet, wenn sie CM entwickelten. Der Log-Rank Test wurde zum Vergleich der Überlebenskurven angewendet (A). Die Parasitämien wurden am Tag 6 p.i. bestimmt. Die Mittelwerte + SEM sind aufgetragen (HVEM^{-/-}: n=9, HVEM^{-/-} + anti-BTLA: n=7, WT: n=10). Die Signifikanz wurde mit ANOVA ermittelt (B). Die Anzahl an CD45⁺CD8⁺ und CD45⁺CD4⁺ T-Zellen in Hirnhomogenaten von HVEM^{-/-}-Mäusen nach Behandlung mit anti-BTLA bzw. Kontroll-AK wurde am Tag 6 p.i. bestimmt (C). Querbalken geben die Mittelwerte ± SEM der Mäuse einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit Student's t-test (unpaired, two-tailed) berechnet.

3.2.15 Einfluss von anti-BTLA 6A6 auf die T-Zellinfiltration in die Leber

Die Leber stellt das wichtigste Organ dar, in das aktivierte $CD8^+$ T-Zellen infiltrieren und dort die Apoptose durchlaufen (Crispe et al., 2000). Da anti-BTLA 6A6 die T-Zellsequestration im Gehirn reduzierte, wurde untersucht, ob ein vergleichbarer Effekt auch in der Leber nachweisbar war. Dazu wurden Gefrierschnitte der Leber von mit anti-BTLA und Hamster-IgG behandelten C57BL/6-Mäusen am Tag 6 nach der PbA-Infektion angefertigt. Die T-Zellmarker CD4 und CD8 wurden auf den Schnitten gefärbt und die Anzahl an T-Zellen pro Gesichtsfeld ausgezählt (Abb. 3.26). Dabei zeigte sich, dass anti-BTLA 6A6 zu einer verringerten Anzahl an T-Zellen in der Leber führte, wenngleich der Effekt auf die T-Zellsequestration nicht so ausgeprägt war wie im Gehirn (vgl. Abb. 3.20). So war die Zahl an $CD4^+$ T-Zellen nach Anti-BTLA-Behandlung nur leicht verringert, während die Reduktion der Zahl an $CD8^+$ T-Zellen statistisch signifikant war.

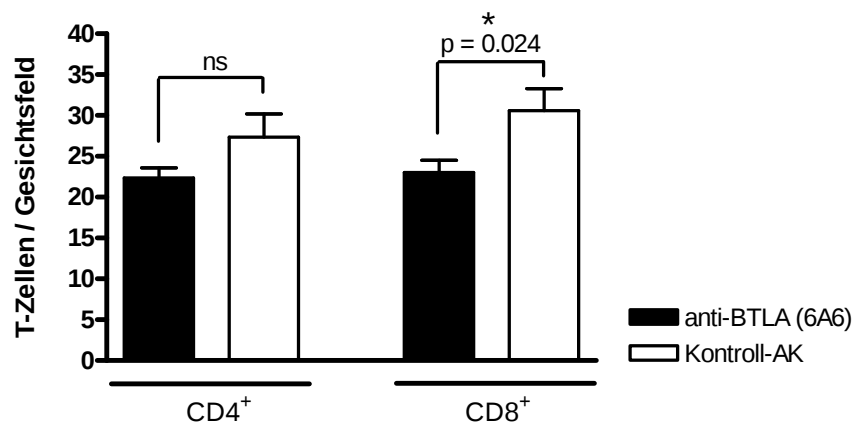


Abb. 3.26: Reduktion der Infiltration von T-Zellen in die Leber nach Behandlung mit anti-BTLA 6A6

200 µg anti-BTLA 6A6 bzw. Kontroll-Antikörper wurden C57BL/6-Mäusen am Tag -1 i.p. injiziert und diese am folgenden Tag i.p. mit 1×10^6 PbA-infizierten Erythrozyten infiziert. Am Tag 6 p.i. wurden Gefrierschnitte der Leber hergestellt. Die Anzahl an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen pro Gesichtsfeld ist aufgetragen (Mittelwerte + SEM von je drei Gesichtsfeldern). Dargestellt ist die Zusammenfassung von drei Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Einfluss der CTLA-4-Blockade auf den Verlauf der *P. yoelii*-Infektionen

T-Zellen sind für protektive Immunreaktionen im Verlauf von Infektionen essentiell, unterliegen jedoch der Regulation, da eine überschießende Immunantwort durch unkontrollierte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine Pathologie verursacht. In dieser Arbeit sollte die Funktion der koinhibitorischen Molekülen CTLA-4 und BTLA bei der Regulation von T-Effektorfunktionen im Verlauf der murinen Malaria untersucht werden.

Im ersten Teil wurde der Einfluss der Blockade des Koinhibitors CTLA-4 auf den Verlauf der *P. yoelii*-Infektion in Balb/c-Mäusen untersucht. Während die PbA-Infektion eine T_H1-dominierte pro-inflammatorische Immunantwort auslöst, kommt es in der *P. yoelii*-Infektion zur Freisetzung von IFN- γ , aber auch IL-4, IL-10 und TGF- β (Omer et al., 2003). Zur Kontrolle der Parasitämie im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion sind T_H1- und T_H2-Antwort gemeinsam notwendig (Riley et al., 2006). Diese balancierte Immunreaktion stellt eine mögliche Erklärung dafür da, dass im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion im Gegensatz zur PbA-Infektion keine zerebrale Malaria induziert wird.

Um den Effekt der CTLA-4-Blockade in einem virulenteren *P. yoelii*-Modell zu untersuchen, bei dem eher die pro-inflammatorische Immunantwort dominierte, wurde die Infektion mit der Variante Py-lethal durchgeführt. Diese Variante entstand spontan bei der *in vivo*-Mauspassage des nicht-letalen *P. yoelii*-Stammes Py17NL und war durch einen schnelleren Anstieg der Parasitämie und eine höhere Letalität (ca. 30 % in Balb/c-Mäusen) gekennzeichnet. Vergleichbar zur humanen *P. falciparum*-Infektion (Schlotmann et al., 2000) und der murinen PbA-Infektion (Jacobs et al., 2002) wurde auch in der Blutphase der Py17NL- und der Py-lethal-Infektion eine Induktion von CTLA-4 auf CD4⁺ T-Zellen beobachtet. Von CD8⁺ T-Zellen wurde CTLA-4 im Verlauf der *P. yoelii*-Infektionen dagegen nicht exprimiert.

Der Verlauf einer Immunantwort hängt nicht nur von der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine in der frühen Phase der Infektion ab, die für Bekämpfung eingedrungener Pathogene essentiell ist, sondern auch von der nachfolgenden Aktivierung anti-inflammatorischer bzw. regulatorischer Signalwege, um Immunpathologie zu verhindern. Für die *P. falciparum*-Infektion wurde gezeigt, dass ein reguliertes Verhältnis von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen wichtig ist, um einerseits Protektion zu erreichen und andererseits Pathologie zu vermeiden (Chaiyaroj et al., 2004). Vergleichbare Resultate wurden für die murine PbA-Infektion erhalten.

So reduzierte die Suppression anti-inflammatorischer Signale zwar die Parasitämie, verstärkte gleichzeitig jedoch die Pathologie, während die Neutralisierung pro-inflammatorischer Zytokine den gegenteiligen Effekt hatte (Singh et al., 2002).

CTLA-4 stellt einen Koinhibitor dar, der von T-Zellen im Verlauf der Immunantwort exprimiert wird und wie CD28 an die B7-Moleküle CD80 und CD86 bindet (Chambers et al., 2001). Dabei ist CTLA-4 essentiell für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz, da Mutationen im CTLA-4-Gen mit einer erhöhten Inzidenz an Autoimmunerkrankungen korrelieren (Ueda et al., 2003). Die wichtige Bedeutung für CTLA-4 in der Abschaltung von T-Effektorfunktionen wurde durch die Verwendung von blockierenden Anti-CTLA-4-Antikörpern bestätigt. Während eine Blockade von CTLA-4 zu einer verstärkten protektiven Immunantwort gegen Tumoren und Infektionserkrankungen führte (Gregor et al., 2004; Martins et al., 2004), hatte die CTLA-4-Blockade bei Autoimmunerkrankungen eine Verschlimmerung des Krankheitsverlaufes zur Folge (Zhu et al., 2001). Daneben wurde die Blockade der CTLA-4/B7-Interaktion dazu genutzt, um die Wirksamkeit von Impfungen zu erhöhen (Keler et al., 2003).

Im PbA-Mausmodell resultierte die CTLA-4-Blockade in einem schweren Krankheitsverlauf (Jacobs et al., 2002). Die Applikation eines blockierenden Anti-CTLA-4-Antikörpers verhinderte die Abschaltung aktivierter $CD4^+$ T-Zellen und wurde von der gesteigerten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen begleitet, die letztlich zu einer erhöhten Inzidenz an CM und einer gesteigerten Leberpathologie führte (Jacobs et al., 2002; Jacobs et al., 2004). Dagegen bewirkte die CTLA-4-Blockade bei einer Prime-Boost-Immunisierung gegen das Circumsporoziten-Protein (CSP) von PbA ein effektives Priming von protektiven $CD8^+$ T-Zellen und schützte Mäuse vor einer nachfolgenden Infektion mit PbA-Sporozoiten (Tartz et al., 2006).

Neben aktivierten T-Zellen ist CTLA-4 auf der Oberfläche von T_{reg} vorhanden, die CTLA-4 konstitutiv exprimieren (von Boehmer, 2005). Um zwischen beiden Zelltypen zu unterscheiden, wurde der Anteil an $Foxp3^+ T_{reg}$ der Milz gemessen. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 wird dabei selektiv von T_{reg} exprimiert (Sakaguchi, 2005). Im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion wurde in einer Studie ein Anstieg an Foxp3-mRNA nachgewiesen (Hisaeda et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit zwar eine deutliche Zunahme der Anzahl der $CD4^+CTLA-4^+$ T-Zellen beobachtet, wobei der Anteil der $Foxp3^+$ T-Zellen in der Milz in den *P. yoelii*-Infektionen jedoch unverändert blieb. Diese Diskrepanz kann entweder durch eine sehr kurzzeitige Induktion der Foxp3-Expression verursacht sein oder durch das Auswandern von $Foxp3^+ T_{reg}$ aus der Milz. Da am Tag 6 nach *P. yoelii*-Infektion 25 % der $CD4^+$ T-Zellen CTLA-4 exprimierten, handelt es sich bei einem Großteil der $CD4^+CTLA-4^+$ T-Zellen in der Milz um aktivierte $CD4^+$ T-Zellen.

Nach der CTLA-4-Blockade stieg der Anteil an aktivierten $CD4^+$ T-Zellen im Verlauf der Py17NL-Infektion, und die Mäuse zeigten einen verkürzten Krankheitsverlauf mit reduzierter Parasitämie. Diese verstärkte T-Zellaktivierung korrelierte mit einer Zunahme der Konzentration an IFN- γ , aber auch IL-4 und IL-10 im Serum. Dies verdeutlicht, dass die CTLA-4-Blockade nicht das Zytokinmuster der Immunantwort veränderte, sondern die bei der *P. yoelii*-Infektion ablaufende Immunreaktion verstärkte. Indem durch die CTLA-4-Blockade die Abschaltung der aktivierten T-Zellen verhindert wurde, kam es gleichermaßen zu einer Stimulation der T_H1 - und T_H2 -Antwort. Im Gegensatz dazu induzierte die CTLA-4-Blockade im Verlauf der virulenteren Py-lethal-Infektion eine gesteigerte Letalität. Wie bei der Infektion mit Py17NL verursachte die Anti-CTLA-4-Behandlung eine verstärkte T-Zellaktivierung, aber bei der Infektion mit Py-lethal wurde die gesteigerte IFN- γ -Produktion von einer Zunahme der Konzentration an TNF- α im Serum begleitet. Da TNF- α nicht nur für die Inhibition der Parasitenreplikation wichtig ist, sondern auch Pathomechanismen induziert (Grau et al., 1987), stellt die gesteigerte TNF- α -Sekretion wahrscheinlich die Ursache für die Leberpathologie und den starken Gewichtsverlust in den infizierten Balb/c-Mäusen dar. Eine zu starke Stimulation der bei der Py-lethal-Infektion ohnehin schon T_H1 -dominierten Immunantwort ist also offensichtlich gefährlich, weil diese zu verstärkter Pathologie führt. Diese Beobachtung ist konsistent mit Studien in IL-10-defizienten Mäusen, die bei der Infektion mit *P. chabaudi* ebenfalls eine gesteigerte Pathologie und Letalität zeigten (Sanni et al., 2004).

Im Verlauf der PbA-Infektion wurde die Infiltration von T-Zellen in die Leber und andere periphere Organe nachgewiesen (Jacobs et al., 2004). Vor allem in der Leber werden aktivierte T-Zellen abgeschaltet, so dass eine Pathologie vermieden wird. Diese Abschaltung war nach der CTLA-4-Blockade verhindert, so dass es in Folge der Inflammation zu einer Leberschädigung kam. Im Verlauf der Py17NL- und Py-lethal-Infektion wanderten ebenfalls T-Zellen in das Leberparenchym ein (Daten nicht dargestellt). Es bleibt zu untersuchen, ob die regulierte Produktion von T_H1 - und T_H2 -Zytokinen bei der *P. yoelii*-Infektion dafür verantwortlich ist, dass im Normalfall keine Immunpathologie auftritt.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von CTLA-4 für die Protektion und Pathologie im Verlauf der murinen Malaria nachgewiesen. CTLA-4 wurde in den *P. yoelii*-Infektionen auf aktivierten $CD4^+$ T-Zellen induziert. Die *in vivo*-Blockade von CTLA-4 zeigte, dass dieses Molekül einen wichtigen Regulator der Immunantwort im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion darstellt, durch dessen Expression die T-Zellantwort limitiert und eine überschießende Inflammation verhindert wird.

4.2 Klonierung, Expression und Charakterisierung des BTLA-Ig-Fusionsproteins

Ig-Fusionsmoleküle stellen wichtige Hilfsmittel dar, um die Funktion von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Kostimulatoren *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen (Chapoval et al., 2002). Mit ihrer Hilfe lässt sich beispielsweise die Expression ihrer Liganden auf Zellen analysieren, wie für VCAM-1-Ig und dessen Bindung an VLA-4 gezeigt wurde (Jakubowski et al., 1995). Zudem können Zytokine mit dem F_c-Fragment humaner oder muriner Antikörper verknüpft werden und in dieser Form zur Immuntherapie eingesetzt werden. In einem Mausmodell für Typ-I-Diabetes wurde IL-4-Ig zur Modulation der Immunantwort eingesetzt und führte zu einer Reduktion von T_H1-Zytokinen (Walz et al., 2002). Die wichtigste Bedeutung haben die Ig-Fusionsmoleküle jedoch bei der Aufklärung von kostimulatorischen Signalwegen und der Intervention in diese. So verhinderte CD40-Ig in einem allogenen Transplantationsmodell die Abstoßung transplanterter Organe, weil es den Kostimulator CD40-L blockierte (Guillonnet et al., 2007). Auch B7.2-Ig und PD-L1-Ig wurden zur Immunmodulation verwendet (Yamaguchi et al., 2004; Ding et al., 2006). Therapeutisch spielt CTLA-4-Ig (Abatacept) die größte Rolle, das bereits in klinischen Studien zur Therapie der rheumatoiden Arthritis mit Erfolg eingesetzt wurde (Kremer et al., 2003; Perniok et al., 2003). Im Mausmodell führte die kombinierte Immuntherapie mit CD40-Ig und CTLA-4-Ig zu verringerten Abstoßungsreaktionen in allogenen Transplantationsmodellen (Yamashita et al., 2003; Kanaya et al., 2003). In zahlreichen Studien wurden adenovirale Transfektionssysteme verwendet, um die effektive Konzentration an CTLA-4-Ig durch dessen Expression am Ort der Inflammation zu erhöhen (Laumonier et al., 2003; Guillot et al., 2000; Guillot et al., 2003).

Um die Bedeutung der BTLA/HVEM-Interaktion näher zu untersuchen, wurde im zweiten Teil der Arbeit ein BTLA-Ig-Fusionsprotein, das aus dem extrazellulären Anteil des murinen BTLA-Moleküls und dem F_c-Fragment des humanen IgG₁-Moleküls bestand, kloniert, exprimiert und charakterisiert. BTLA-Ig wurde aus dem Überstand transfizierter CHO-Zellen aufgereinigt und wies eine hohe Reinheit auf. Bindungsstudien mit dem generierten BTLA-Ig-Fusionsprotein auf HVEM-transfizierten Zellen zeigten, dass es spezifisch an den Liganden HVEM band und somit funktionell war. Die Untersuchung der Funktion der BTLA/HVEM-vermittelten Regulation bei der T-Zellaktivierung erfolgte durch die Stimulation von Milzzellen mit anti-CD3 in Gegenwart von BTLA-Ig. In diesem *in vitro*-Testsystem führten zunehmende Konzentrationen an BTLA-Ig zu einer gesteigerten T-Zellproliferation und IL-2-Produktion. Dabei war der Effekt am deutlichsten ausgeprägt, wenn die Zellen mit einer niedrigen Konzentration anti-CD3 stimuliert wurden, und wurde bei stärkeren Stimuli über den TCR geringer. Die Ergebnisse bestätigen die

Funktion von BTLA als koinhibitorisches Molekül, da in diesem Testsystem BTLA-Ig an HVEM band, das von APCs und naiven B- und T-Zellen exprimiert wurde. Durch Absättigung von HVEM auf deren Oberfläche wurde die Interaktion mit BTLA auf den T-Zellen verhindert. Weil somit kein negatives Signal im Verlauf der T-Zellaktivierung an die BTLA⁺ T-Zelle gegeben wurde, proliferierten die stimulierten T-Zellen in Gegenwart von BTLA-Ig stärker.

Mit Hilfe des generierten BTLA-Ig-Fusionsproteins wurde somit die koinhibitorische Funktion von BTLA *in vitro* bestätigt. Gleichzeitig wurde in einem *in vitro*-Testsystem, in dem naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit CD4⁺CD25⁺ T_{reg} kokultiviert wurden, die Funktion von BTLA bei der T_{reg}-vermittelten Suppression der T-Zellproliferation und IL-2-Produktion untersucht. Da die Suppression dieser T-Zellfunktionen in Gegenwart von BTLA-Ig nicht aufgehoben wurde, ist die BTLA/HVEM-Interaktion hierfür vermutlich nicht essentiell. Dies steht ebenfalls im Einklang mit bereits publizierten Daten, die zeigen, dass BTLA zwar auf anergen T-Zellen vorhanden ist, im Gegensatz zu CTLA-4 und PD-1 jedoch nicht von T_{reg} exprimiert wird (Hurchla et al., 2005).

Die mit dem BTLA-Ig-Konstrukt stabil transfizierten CHO-Zellen wurden in einem Bioreaktor (350 ml) kultiviert. Die Aufreinigung von Kulturüberstand nach einer Expression über vier bis sechs Wochen lieferte jeweils 100 bis 200 µg an BTLA-Ig, was hinsichtlich einer Verwendung *in vivo* eine zu geringe Menge darstellte. Somit sind Optimierungen beim Expressionsvektor und der verwendeten Zelllinie erforderlich, um die Ausbeute an BTLA-Ig zu erhöhen. Dennoch wurde BTLA-Ig *in vivo* eingesetzt, um einen möglichen Einfluss auf den Verlauf der murinen Malaria zu untersuchen. Allerdings hatte die einmalige Injektion von 20 µg BTLA-Ig (entsprach einer Dosis von 1 mg/kg) vor der PbA-Infektion keine Auswirkung auf die Parasitämie und den Krankheitsverlauf, da alle infizierten Mäuse nach der Behandlung mit BTLA-Ig oder PBS an CM verstarben. Möglicherweise war die zu geringe Dosis an BTLA-Ig verantwortlich dafür, dass kein Effekt von BTLA-Ig in der PbA-Infektion nachgewiesen wurde. In einigen Studien mit anderen Ig-Fusionsproteinen wurden zwar vergleichbare Mengen an Ig-Fusionsmolekül *in vivo* eingesetzt (Daikh et al., 1997), oft erfolgten aber häufigere Gaben oder adenovirale Vektoren wurden zur *in vivo*-Transfektion verwendet (Wang et al., 2002; Mihara et al., 2000; Guilloneau et al., 2007). Eine plausiblere Erklärung dafür, dass kein Effekt von BTLA-Ig auf die Inzidenz an CM beobachtet wurde, ist jedoch, dass BTLA-Ig *in vitro* die koinhibitorische BTLA/HVEM-Interaktion blockierte. Daher war eigentlich eine Verschlimmerung des Krankheitsverlaufes nach der Applikation von BTLA-Ig zu erwarten. Für therapeutische Zwecke, d.h. zur Reduktion der Inzidenz an CM, käme eher die Verwendung von LIGHT-Ig in Betracht, weil dadurch die Kostimulation durch die Bindung von HVEM an LIGHT auf den aktivierten T-Zellen blockiert

würde. Zudem wäre aufgrund der unterschiedlichen Bindungsstellen von HVEM an BTLA bzw. LIGHT in Gegenwart von LIGHT-Ig die BTLA/HVEM-vermittelte Koinhibition weiter möglich (Compaan et al., 2005). Auch die Generierung von HVEM-Ig wäre nützlich, um die Bedeutung der Balance zwischen Koinhibition/Kostimulation über die HVEM/BTLA- und HVEM/LIGHT-Interaktion im Verlauf der murinen Malaria näher zu charakterisieren. Da HVEM-Ig an BTLA und an LIGHT binden würde, könnte man dadurch sowohl die kostimulatorische als auch koinhibitorische Interaktion unterbinden. Auf diese Weise ließe sich die Bedeutung der beiden Signalwege für den Verlauf der PbA-Infektion untersuchen.

4.3 Induktion von BTLA im Verlauf der PbA-Infektion

Im letzten Teil der Arbeit wurde anhand der *P. berghei* ANKA-Infektion von C57BL/6-Mäusen untersucht, ob BTLA im Verlauf der Malaria auf T-Zellen induziert wurde. Die Induktion des Koinhibitors CTLA-4 auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen im Verlauf der PbA-Infektion wurde bereits beschrieben und dessen Funktion bei der Modulation von T-Effektorfunktionen in der Malaria nachgewiesen (Jacobs et al., 2002; Jacobs et al., 2004). Neben CTLA-4 stellt BTLA ein weiteres koinhibitorisches Molekül auf T-Zellen dar, dessen Ligation durch HVEM letztlich über ITIM-Motive in der intrazellulären Domäne zu reduzierten T-Effektorfunktionen führt (Watanabe et al., 2003). Im Gegensatz zu CTLA-4 wird BTLA jedoch konstitutiv von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert, während der T-Zellaktivierung *in vitro* aber weiter hochreguliert (Han et al., 2004). In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass im Verlauf der PbA-Infektion BTLA verstärkt von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz exprimiert wurde, was den Ergebnissen bei der *in vitro*-Stimulation von T-Zellen entsprach. Kürzlich wurde in einem murinen Allergiemodell die essentielle Bedeutung von BTLA für die Beendigung der Immunantwort gezeigt, da BTLA^{-/-}-Mäuse einen verlängerten Krankheitsverlauf aufwiesen (Deppong et al., 2006). Zudem kam es in den BTLA^{-/-}-Mäusen zu einer verstärkten Inflammation der Lunge, die durch die Infiltration von Lymphozyten und Eosinophile hervorgerufen wurde. Im Verlauf dieser T_H2-dominierten Immunantwort war die BTLA-Expression auf CD4⁺ T-Zellen, die aus der broncho-alveolären Flüssigkeit isoliert wurden, gesteigert. Die Induktion von BTLA im murinen Allergiemodell ist konsistent mit der in der PbA-Infektion beobachteten gesteigerten BTLA-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der Milz. Der Anstieg der BTLA-Expression auf den T-Zellen dieses zentralen lymphatischen Organs beruht vermutlich darauf, dass in der Blutphase der Malaria eine große Zahl an Parasiten-infizierten Erythrozyten vorliegt, die in der Milz eliminiert werden. Auf diese Weise wird den T-Zellen eine große Menge an PbA-Antigen durch die APCs der Milz

präsentiert. Das T-Zellpriming führt zur Expansion Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen, die zur Beseitigung Parasiten-infizierter Erythrozyten beitragen. Im Verlauf der erythrozytären Phase wird aber auch die angeborene (unspezifische) Immunantwort ausgelöst (Stevenson et al., 2006). Rezeptoren auf APCs, wie die Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie erkennen konservierte Antigenstrukturen von Pathogenen und bilden den ersten Kontakt mit dem Immunsystem des Wirtes (Akira et al., 2006). TLR-vermittelte Signale führen zur Aktivierung von MAP-Kinasen oder Transkriptionsfaktoren wie NFκB und dadurch zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (Zhu et al., 2005; Franklin et al., 2007; Lepenies et al., 2007). Studien in diversen Mausmodellen der Malaria haben gezeigt, dass die frühe Freisetzung von TNF-α und IFN-γ in der Blutphase notwendig für die Kontrolle der Parasitämie ist (de Souza et al., 1997; Mitchell et al., 2005). Während in der frühen Phase der Infektion vor allem NK-Zellen und γδ-T-Zellen eine wichtige Quelle für IFN-γ darstellen, werden im weiteren Verlauf naive T-Zellen in der Milz von APCs durch die Präsentation prozessierter Parasitenantigene über MHC-II-Moleküle aktiviert (Kobayashi et al., 2007; D’Ombrain et al., 2007; Stevenson et al., 2006). Die induzierten T_H1-Zellen übernehmen die IFN-γ-Produktion von den NK-Zellen und aktivieren Makrophagen zur Freisetzung von Immunmediatoren wie NO oder auch TNF-α (Riley et al., 2006).

Da eine zu starke T_H1-Immunantwort Pathologie induziert, werden bei der T-Zellaktivierung regulatorische Moleküle exprimiert, die eine überschießende Immunantwort verhindern. Insofern war die beobachtete BTLA-Induktion auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der Milz während der PbA-Infektion ein erster Hinweis, dass die BTLA/HVEM-Interaktion in diesem Infektionsmodell bei der Modulation der Immunantwort eine Rolle spielen könnte. Neben der verstärkten BTLA-Expression auf T-Zellen der Milz kam es im Verlauf der PbA-Infektion zu einer Induktion von BTLA-mRNA in Gehirn, Leber und Niere, die durch die Infiltration von BTLA⁺ T-Zellen in diese Organe ausgelöst wurde. Dies ist von Bedeutung, weil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Pathologie der Malaria spielen. So stellt eine Glomerulonephritis eine im Verlauf einer Malariaerkrankung häufig auftretende Komplikation dar (Eiam-Ong, 2003). Diese Organmanifestation wird durch die Infiltration von T-Zellen in die Niere ausgelöst und ist somit ein immunpathologisches Ereignis. In der Leber waren im Verlauf der PbA-Infektion ebenfalls verstärkt T-Zellen nachweisbar, die zudem BTLA exprimierten. Im Verlauf einer Immunantwort akkumulieren aktivierte CD8⁺ T-Zellen in der Leber, wo in ihnen eine Apoptose induziert wird (Crispe et al., 2000). Somit kommt der Leber eine grundlegende Bedeutung bei der Regulation von Immunantworten in der Peripherie und der Aufrechterhaltung der Toleranz zu. Für BTLA wurde ebenfalls eine Beteiligung an der peripheren Toleranz postuliert. Es bleibt zu untersuchen,

ob BTLA-abhängige Mechanismen bei der Modulation der Leberpathologie im Verlauf der Malaria eine Rolle spielen.

Eine wichtige Voraussetzung dafür, dass die BTLA/HVEM-Interaktion in der Peripherie an der T-Zellregulation mitwirkt, ist die Bindung von BTLA⁺ T-Zellen an HVEM-exprimierende Zellen. In einer Studie wurde beschrieben, dass die HVEM-Expression nicht auf Zellen des Immunsystems beschränkt ist, sondern auch Endothelzellen HVEM exprimieren (Chang et al., 2005). Im Verlauf der PbA-Infektion wurde eine Induktion von HVEM-mRNA im Gehirn beobachtet, die bei Mäusen mit CM weiter gesteigert war. Da kein für die Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie geeigneter Anti-HVEM-Antikörper vorhanden war, wurde jedoch in dieser Arbeit nicht näher untersucht, ob die gesteigerte HVEM-Expression während der CM durch die Induktion von HVEM auf Hirnendothel oder die Sequestration von HVEM⁺ T-Zellen bedingt war.

4.4 Einfluss von anti-BTLA 6A6 auf die Inzidenz an zerebraler Malaria

Um zu untersuchen, ob BTLA funktionell an der T-Zellregulation in der murinen Malaria und der Modulation der Pathologie beteiligt ist, wurde ein Anti-BTLA-Antikörper (Klon 6A6) *in vivo* eingesetzt. Dieser wurde als ein blockierender Antikörper beschrieben, da er die Bindung eines HVEM-Ig-Fusionsproteins an BTLA *in vitro* inhibierte (Hurchla et al., 2005). Anti-BTLA 6A6 wurde in dieser Arbeit in einem *in vitro*-Testsystem charakterisiert, in dem TCR-transgene CD8⁺ T-Zellen in Gegenwart von anti-BTLA 6A6 stimuliert wurden. Der transgene T-Zellrezeptor der CD8⁺ T-Zellen war dabei spezifisch für das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄, das im Komplex mit MHC-I-Molekülen des Haplotyps H2-K^b auf der Oberfläche von APCs präsentiert wird (Hogquist et al., 1994). Überraschenderweise wurde eine reduzierte Produktion an IL-2 gemessen, wenn OT1-Zellen mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ in Gegenwart von Platten-gebundenem anti-BTLA 6A6 stimuliert wurden. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass anti-BTLA 6A6 nicht nur die BTLA/HVEM-Interaktion blockierte, sondern gleichzeitig BTLA ligierte und somit als agonistischer Antikörper wirkte. Jedoch war dies nur dann der Fall, wenn anti-BTLA 6A6 in Platten-gebundener Form eingesetzt wurde, da in löslicher Form kein Effekt auf die Proliferation oder Zytokinsekretion von T-Zellen *in vitro* nachweisbar war. Die Injektion von 200 µg anti-BTLA 6A6 einen Tag vor der PbA-Infektion bewirkte eine statistisch signifikante Reduktion der Inzidenz an CM in den C57BL/6-Mäusen im Vergleich zur Behandlung mit Kontrollantikörper. Zugleich wurden am Tag 6 p.i. verringerte Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokinen IL-18, IFN-γ und IL-6 im Serum der mit anti-BTLA behandelten Mäuse detektiert.

Die Blockade des Koinhibitors CTLA-4 im Verlauf der PbA-Infektion führte in C57BL/6-Mäusen zu einer erhöhten Inzidenz an CM und gesteigerter Letalität (Jacobs et al., 2002). Diese wurde durch eine verstärkte T-Zellaktivierung verursacht, die eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu bewirkte die CTLA-4-Blockade in Infektionsmodellen der Leishmaniose, der Infektion mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* und der *Helicobacter pylori*-induzierten Gastritis eine verstärkte T-Zellantwort, die protektiv war (Murphy et al., 1998; McCoy et al., 1997; Watanabe et al., 2004). Diese Studien dokumentieren, dass T-Zellen einerseits zur Protektion beitragen, andererseits –wie in der PbA-Infektion– aber auch Pathologie induzieren können, so dass T-Effektorfunktionen im Verlauf einer Immunantwort genau reguliert werden müssen. Der Koinhibitor BTLA ist wie CTLA-4 im Verlauf der PbA-Infektion offenbar an der Modulation der Immunantwort beteiligt, da seine Ligation zu einer verringerten Zytokinproduktion und einer reduzierten Inzidenz an CM führte.

Die reduzierte Inzidenz an CM im Verlauf der PbA-Infektion nach der Anti-BTLA-Behandlung ging mit einer verringerten Anzahl an sequestrierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Gehirn einher. In zahlreichen Studien wurde im PbA-Mausmodell gezeigt, dass während der CM Leukozyten im Hirn akkumulieren (Neill et al., 1992; Hearn et al., 2000). Eine Untersuchung der Kinetik zeigte, dass die Infiltration der Leukozyten zeitgleich zum Auftreten der ersten neurologischen Symptome stattfindet. Der größte Teil der im Gehirn sequestrierten Leukozyten wird dabei von Makrophagen, T-Zellen und Neutrophilen gebildet, während DCs, B-Zellen und NK-Zellen zu einem geringeren Teil vorliegen (Belnoue et al., 2002). Studien, in denen neutralisierende Antikörper oder T-Zell-defiziente Mäuse verwendet wurden, belegen, dass T-Zellen essentiell für die Induktion der CM sind. So sind SCID-Mäuse, Thymus-defiziente („nude“) Mäuse oder RAG^{-/-}-Mäuse vor CM geschützt (Finley et al., 1982; Grau et al., 1986; Yanez et al., 1996; Boubou et al., 1999). Quantitative Analysen im Gehirn von Mäusen mit CM zeigten, dass es während der CM zu einer selektiven Zunahme an CD8⁺ T-Zellen kommt. So vermittelte die Depletion von CD8⁺ T-Zellen am Tag 6 p.i., einen Tag vor dem Auftreten der neurologischen Symptome, Schutz vor CM (Belnoue et al., 2002). Dies wurde durch den adoptiven Transfer von CD8⁺ T-Zellen aus der Milz von Mäusen mit CM in RAG-2^{-/-}-Mäuse bestätigt, da sie in das Gehirn der Rezipienten einwanderten und in ihnen CM auslösten (Nitcheu et al., 2003). Aus Hirnhomogenaten aufgereinigte CD8⁺ T-Zellen haben einen CD44⁺CD62L⁻-Phänotyp, sind also aktivierte T-Zellen (Nitcheu et al., 2003; Bagot et al., 2004). Die selektive Anreicherung von CD8⁺CD62L^{niedrig} T-Zellen im Hirn von Mäusen, die CM entwickelten, wurde in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen.

Die reduzierte Inzidenz an CM nach der Anti-BTLA-Behandlung wurde von einem Rückgang der Anzahl an CD8⁺ T-Zellen um 50 % begleitet. Sofern es sich bei den CD8⁺ T-Zellen um die entscheidenden Mediatoren bei der Induktion der CM handelt, ist die durch anti-BTLA bedingte reduzierte Inzidenz an CM vermutlich auf die verminderte Sequestration an CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen. Ein vergleichbarer Effekt wurde jedoch auch für die CD4⁺ T-Zellen beobachtet. Insgesamt war die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen im Gehirn von Mäusen mit CM im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen niedriger, allerdings wurde auch bei ihnen eine selektive Anreicherung im Verlauf der PbA-Infektion beobachtet. Dies entspricht publizierten Daten, in denen ebenfalls ein Anstieg der CD4⁺ T-Zellen im Gehirn von PbA-infizierten Mäusen und sogar eine Beteiligung der sequestrierten CD4⁺ T-Zellen an der Pathogenese der CM nachgewiesen wurde (Yanez et al., 1996; Boubou et al., 1999; Belnoue et al., 2002). Da die Akkumulation von T-Zellen im Gehirn zeitgleich mit den neurologischen Symptomen auftritt, findet das T-Zellpriming nicht erst dort statt, sondern bereits in der Milz. Entsprechend waren Mäuse, die einer Splenektomie unterzogen und anschließend mit *P. berghei* K173 infiziert wurden, vor CM geschützt (Curfs et al., 1989; Hermesen et al., 1988). In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass eine einmalige Applikation von 200 µg anti-BTLA 6A6 einen Tag vor der PbA-Infektion und am Tag 2 p.i. zu einem Schutz der C57BL/6-Mäuse vor CM führte, jedoch ab Tag 4 p.i. nicht mehr wirksam war. Dies dokumentiert, dass das koinhibitorische Signal über BTLA *in vivo* wahrscheinlich schon beim T-Zellpriming notwendig ist, da bei einer Applikation nach Tag 2 p.i. die Infiltration von T-Zellen in das Gehirn nicht mehr inhibiert wurde. Es ist bekannt, dass kostimulatorische Signale für ein effizientes T-Zellpriming erforderlich sind. Dabei ist eine Vielzahl von Molekülen wie CD28, CD40L, 4-1BB, OX40L und ICOS auf den T-Zellen sowie CD40, CD80, CD86, OX40 und ICOS-L auf den APCs an diesem Prozess beteiligt (Frauwirth et al., 2002). Auch Adhäsionsmoleküle (LFA-1, ICAM-1) wirken als Kostimulatoren beim T-Zellpriming (Sharpe, 1995). Die Expression dieser Moleküle wird wesentlich durch pro-inflammatorische Zytokine, insbesondere IFN-γ, reguliert, dessen Konzentration während der CM gesteigert ist (Amani et al., 2000; Bauer et al., 2002). CD40^{-/-}- und CD40L^{-/-}-Mäuse sind resistent gegenüber CM, so dass diese Kostimulatoren entscheidend an der Pathogenese der CM beteiligt sind (Favre et al., 1999; Piguet et al., 2001; Li et al., 2003). ICAM-1^{-/-}-Mäuse erkrankten ebenfalls nicht an CM, und auch die Behandlung von Mäusen mit Antikörpern gegen LFA-1 verhinderte die T-Zellsequestration und vermittelte Schutz vor CM (Grau et al., 1991; Falanga et al., 1991). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Kostimulatoren und Adhäsionsmoleküle als Mediatoren der CM von essentieller Bedeutung sind.

Ein möglicher Mechanismus, über den die Pathogenese der CM erklärt werden kann, ist die Phagozytose von infizierten Erythrozyten, deren Prozessierung und nachfolgende Präsentation von PbA-Antigen durch Endothelzellen des Hirns. Dieser Prozess wird dadurch begünstigt, dass die Blut-Hirn-Schranke im Verlauf der PbA-Infektion durchlässig wird (Clark et al., 1987; Thumwood et al., 1988; Combes et al., 2004). Während ruhende Endothelzellen schlechte APCs darstellen, präsentieren sie nach Stimulation durch Zytokine, insbesondere $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$, Antigene sehr effektiv (Pober et al., 1991). MHC-I- und MHC-II-Moleküle werden im Verlauf der PbA-Infektion auf dem Hirnendothel hochreguliert (Monso-Hinard et al., 1997). Dabei ist die Induktion von MHC-II-Molekülen auf Endothelzellen nach der Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ auf Mausstämmen beschränkt, die suszeptibel für CM sind. Zudem ist seit langem bekannt, dass die systemische Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Verlauf der PbA-Infektion essentiell für die Entwicklung der CM ist (Grau et al., 1987; Grau et al., 1990).

Somit ergibt sich folgendes Modell der Wirkung von anti-BTLA: Die Ligation von BTLA *in vivo* durch die Applikation von anti-BTLA 6A6 führt beim T-Zellpriming dazu, dass der Anteil an $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen und/oder die systemische Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine reduziert ist. Dies hat möglicherweise eine verringerte Endothelaktivierung und reduzierte Prozessierung von PbA-Antigen zur Folge. Die dadurch bedingte verminderte T-Zellsequestration an das Hirnendothel bewirkt die Reduktion der Inzidenz an CM. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass die Sequestration von T-Zellen nicht völlig inhibiert war, sondern nur auf etwa 50 % reduziert war. Außerdem hatte anti-BTLA 6A6 keinen Einfluss auf die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf Hirnendothel, da ICAM-1 nach Behandlung mit anti-BTLA und Kontrollantikörper im Verlauf der PbA-Infektion gleichermaßen induziert wurde. Dies schließt allerdings eine verringerte Endothelaktivierung nicht aus, zumal die immunhistochemische Quantifizierung der ICAM-1-Expression nur näherungsweise möglich war. Für die Verschiebung der Immunantwort von $\text{T}_{\text{H}1}$ zu $\text{T}_{\text{H}2}$ als mögliche Ursache für die reduzierte Inzidenz an CM spricht, dass für BTLA eine Funktion bei der $\text{T}_{\text{H}1}/\text{T}_{\text{H}2}$ -Differenzierung postuliert wurde. So wurde BTLA von $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen nach der T-Zellaktivierung dauerhaft exprimiert, wohingegen die BTLA-Expression auf $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen wieder herunterreguliert wurde (Watanabe et al., 2003).

4.5 PbA-Infektion von HVEM^{-/-}-Mäusen

Da HVEM nicht nur von ruhenden B- und T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und DCs exprimiert wird, sondern auch von Endothelzellen, wurde untersucht, ob HVEM als Adhäsionsmolekül durch Bindung an BTLA⁺ T-Zellen deren Akkumulation im Hirn bewirkt. In diesem Fall würde die reduzierte Inzidenz an CM nach der Anti-BTLA-Behandlung tatsächlich auf einer Blockade der BTLA/HVEM-Interaktion beruhen. Um die Bedeutung von HVEM für die Sequestration von T-Zellen zu untersuchen, wurden HVEM-defiziente Mäuse mit PbA infiziert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass HVEM nicht nur an BTLA, sondern auch an LIGHT, ein Mitglied der TNF-Superfamilie bindet, und dadurch ein kostimulatorisches Signal an die LIGHT⁺ T-Zelle übermittelt (Wang et al., 2004). Da die HVEM^{-/-}-Mäuse eine vergleichbare Parasitämie und Inzidenz an CM aufwiesen wie Wildtyp-Mäuse, scheint die kostimulatorische LIGHT/HVEM-Interaktion weder an der Kontrolle der Parasitämie noch an der Induktion der CM beteiligt zu sein. Außerdem schließt diese Beobachtung aus, dass die BTLA/HVEM-Interaktion direkt an der Adhäsion von T-Zellen an das Hirnendothel mitwirkt, wie dies für die LFA-1/ICAM-1-Interaktion beschrieben wurde (Grau et al., 1991; Falanga et al., 1991). Dass die Behandlung mit anti-BTLA 6A6 auch in HVEM^{-/-}-Mäusen zu einer verminderten Sequestration von T-Zellen im Gehirn führte, ist ein weiterer Beleg dafür, dass die reduzierte Inzidenz an CM durch die Ligation von BTLA und nicht eine Blockade der BTLA/HVEM-Interaktion bewirkt wurde.

In zwei Studien wurde anti-BTLA 6A6 bisher eingesetzt und als blockierender Antikörper beschrieben: In einem Transplantationsmodell wurden allogene Herztransplantate von Wildtyp-Mäusen mehr als 100 Tage toleriert, während sie in BTLA^{-/-}-Mäusen innerhalb kurzer Zeit abgestoßen wurden (Tao et al., 2005). Diese beschleunigte Abstoßung konnte in Wildtyp-Mäusen auch durch die Behandlung mit anti-BTLA 6A6 erzielt werden. In einer neueren Arbeit wurde anti-BTLA 6A6 im Modell der akuten Graft-vs.-Host-Erkrankung (GvH) eingesetzt (Hurchla et al., 2007). Während der Transfer von BTLA⁺ T-Zellen in allogene Rezipienten eine GvH-Erkrankung auslöste, führte der Transfer von BTLA^{-/-} T-Zellen überraschenderweise nicht zur Ausbildung der GvH-Erkrankung. Dieser Befund deutete auf eine unerwartete Funktion von BTLA bei der Aufrechterhaltung der Immunantwort hin und zeigte, dass BTLA möglicherweise nicht nur als Koinhibitor, sondern unter bestimmten Bedingungen als Kostimulator fungieren kann. Die Applikation von anti-BTLA 6A6 verhinderte die Ausbildung der GvH-Erkrankung und wirkte immunregulatorisch, was ebenfalls der Blockade der BTLA/HVEM-Interaktion zugeschrieben wurde. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch gezeigt wurde, dass die Inzidenz der

CM in PbA-infizierten HVEM^{-/-}-Mäusen durch anti-BTLA 6A6 reduziert werden konnte, wirkt der Antikörper *in vivo* zumindest unter den hier vorliegenden Bedingungen ligierend.

Um auszuschließen, dass die reduzierte Inzidenz der CM auf der Depletion von BTLA⁺ T-Zellen beruhte, wurde die Zusammensetzung der Milz und der Anteil an aktivierten T-Zellen analysiert. Da keine Unterschiede zwischen anti-BTLA- und Hamster-IgG-behandelten Mäusen gefunden wurden, kam es durch die Anti-BTLA-Behandlung nicht zur Depletion von BTLA⁺ T-Zellen. Gleichzeitig konnte BTLA auf T-Zellen der Milz von Mäusen nach der Anti-BTLA-Behandlung mit einem gegen ein anderes Epitop gerichteten Anti-BTLA-Antikörper (6F7) gefärbt werden, was die Depletion von BTLA⁺ T-Zellen ebenfalls ausschließt (Daten nicht gezeigt). Zudem bewirkte anti-BTLA 6A6 keine systemische Immunsuppression, da der Anteil der aktivierten T-Zellen in der Milz nach der Anti-BTLA-Behandlung unverändert war.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass T-Zellen an der Ausbildung der CM im Verlauf der PbA-Infektion von C57BL/6-Mäusen beteiligt sind und dass die *in vivo*-Ligation von BTLA einen Schutz vor der CM vermittelte. Die Applikation von anti-BTLA 6A6 führte zu einer reduzierten T-Zellsequestration im Hirn und der verringerten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Daher könnte eine Intervention in die BTLA/HVEM-Interaktion eine Möglichkeit darstellen, um T-Effektorfunktionen im Verlauf einer Inflammation zu modulieren. Auch die Humangenetik könnte dazu beitragen, die Funktion von BTLA bei der Pathogenese der Malaria aufzuklären. Eine Methode stellt die Analyse von Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) im BTLA-Gen dar, um mögliche Korrelationen zwischen BTLA-Polymorphismen und der Schwere des Krankheitsverlaufes zu untersuchen.

4.6 Ausblick: Monoklonale Antikörper und Ig-Fusionsmoleküle als Therapie?

Monoklonale Antikörper kommen heute vor allem in der Krebstherapie zum Einsatz. So finden Antikörper gegen das humane CD52-Antigen (Alemtuzumab) und gegen CD20 (Rituximab) in der Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie und von Non-Hodgkin-Lymphomen Anwendung (Fraser et al., 2007; Collins-Burow et al., 2007). Der gegen den Wachstumsfaktor VEGF gerichtete Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]) wird therapeutisch bei Darm- und Brustkrebskrankungen eingesetzt (Traina et al., 2007). Am besten charakterisiert ist der gegen den auf Krebszellen exprimierten Wachstumsfaktor Her2/neu gerichtete monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]), der ebenfalls zur Therapie von Brustkrebs zugelassen ist (Mehra et al., 2006; Kurian et al., 2007). Daneben finden monoklonale Antikörper in der Immuntherapie

Anwendung, um die Immunantwort z.B. bei Autoimmunerkrankungen zu modulieren. So führen die gegen das Zytokin TNF- α gerichteten Antikörper Adalimumab (Humira®) und Infliximab (Remicade®) bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis und Morbus Crohn zu einer Inhibition der Inflammation (Nakamura et al., 2006; Bayry et al., 2007). Adhäsionsmoleküle, die an der Sequestration von Monozyten und Lymphozyten an Endothelien beteiligt sind, bilden ebenfalls ein Ziel von monoklonalen Antikörpern. Ein Beispiel stellt der zur Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzte Antikörper Natalizumab (Tysabri®) dar, der gegen das α_4 -Integrin CD49d gerichtet ist (Miller et al., 2003; Ransohoff, 2007).

Bei dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern in der Klinik muss in jedem Fall sorgfältig zwischen dem therapeutischen Nutzen und möglichen Risiken abgewogen werden. Die Gefahren einer Immuntherapie zeigte der tragische Ausgang einer Phase-I-Studie in Großbritannien, bei der sechs Probanden ein superagonistischer Anti-CD28-Antikörper verabreicht wurde (Mehrishi et al., 2007). Im Tiermodell bewirkte der gegen den Kostimulator CD28 auf T-Zellen gerichtete Antikörper selektiv die Expansion regulatorischer T-Zellen, so dass er für den therapeutischen Einsatz bei T-Lymphopenie und Autoimmunerkrankungen geeignet schien (Lin et al., 2003; Elflein et al., 2003; Beyersdorf et al., 2006). Im Menschen führte der superagonistische Anti-CD28-Antikörper aber zur polyklonalen Aktivierung aller T-Zellen und löste so die systemische Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine mit daraus resultierendem Multi-Organversagen aus (Suntharalingam et al., 2006). Letztlich dokumentiert der unerwartete, tragische Verlauf dieser Studie, dass im Tiermodell erzielte Ergebnisse häufig nicht vollständig auf den Menschen übertragbar sind.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch eine Blockade des Koinhibitors CTLA-4 die Immunantwort im Verlauf einer *P. yoelii*-Infektion verstärkt wurde. Während dies bei einer nicht-letalen *P. yoelii*-Infektion jedoch zu einem schnelleren Abklingen der Infektion führte, verlief die Infektion mit der virulenteren Variante Py-lethal mit höherer Letalität. Da T-Zellen essentiell für die Protektion sind, aber auch Pathologie induzieren können, zeigt dieses Ergebnis auch die möglichen Gefahren auf, die mit einer Stimulation der Immunantwort verbunden sind. Da CTLA-4 notwendig für die Abschaltung von T-Effektorfunktionen ist, erscheint es als Ziel eines therapeutisch eingesetzten blockierenden Antikörpers aufgrund der möglichen Risiken als zu gefährlich. Dagegen ist der Koinhibitor BTLA möglicherweise an der Feinregulation der Immunantwort in der Peripherie beteiligt und könnte eher das Ziel einer Immuntherapie darstellen.

Ebenfalls zur Immuntherapie geeignet sind Ig-Fusionsmoleküle, weil ihre Affinität zu ihren jeweiligen Liganden niedriger ist als die von monoklonalen Antikörpern und ihre Wirkung daher im Voraus häufig besser eingeschätzt werden kann. So wird CTLA-4-Ig (Abatacept, Orencia®) bereits erfolgreich zur Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt, weil es durch die Bindung an die B7-Moleküle CD80 und CD86 deren Interaktion mit CD28 auf den T-Zellen verhindert (Alegre et al., 2006). Die BTLA/HVEM- und wahrscheinlich mehr noch die LIGHT/HVEM-Interaktion kommen ebenfalls als Signalwege in Betracht, über die eine Immunantwort moduliert werden kann. Während BTLA-Ig dabei aber –wie in dieser Arbeit *in vitro* nachgewiesen– durch die Blockade der koinhibitorischen BTLA/HVEM-Wechselwirkung zu einer Stimulation der Immunantwort führt, würde LIGHT-Ig die Immunantwort vermutlich eher inhibieren. Insgesamt sind monoklonale Antikörper und Ig-Fusionsmoleküle grundsätzlich therapeutisch verwendbar, ihr Einsatz ist jedoch nicht gefahrlos, so dass klinische Studien sorgfältig geplant und mögliche Risiken berücksichtigt werden müssen (Liedert et al., 2007).

5 Zusammenfassung

Die Aktivierung von naiven T-Zellen erfordert neben dem über den T-Zellrezeptor vermittelten Signal einen zweiten Stimulus. In Abwesenheit dieses sogenannten kostimulatorischen Signals wird die T-Zelle anerg oder tritt in die Apoptose ein. Daneben gibt es auch koinhibitorische Signale, die dazu dienen, Immunantworten zu regulieren und Toleranz gegenüber Autoantigenen in der Peripherie aufrechtzuerhalten. Als koinhibitorische Moleküle wurden CTLA-4 (CD152), PD-1 (CD279) und BTLA (CD272) beschrieben. Da T-Zellen für eine protektive Immunantwort notwendig sind, im Falle einer unkontrollierten Aktivierung aber auch Pathologie induzieren können, ist die effektive Regulation der T-Zellaktivität durch Koinhibitoren wichtig.

Das Ziel des ersten Teils der Arbeit war die Analyse der Funktion des Koinhibitors CTLA-4 im Verlauf der murinen *P. yoelii*-Infektion. Der Einfluss einer Blockade der CTLA-4/B7-Interaktion auf den Verlauf der Malaria wurde in einer früheren Studie in der PbA-Infektion untersucht. So führte die Applikation eines blockierenden Anti-CTLA-4-Antikörpers in diesem Mausmodell zu einer höheren Inzidenz an zerebraler Malaria (Jacobs et al., 2002). Wie schon für die PbA-Infektion nachgewiesen, wurde CTLA-4 während der Infektion mit dem nicht-letalen *P. yoelii*-Stamm Py17NL auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen induziert. Im Gegensatz zur PbA-Infektion führte die CTLA-4-Blockade in der Py17NL-Infektion jedoch zu einem verkürzten Krankheitsverlauf mit einer reduzierten Parasitämie. Dies korrelierte mit einer verstärkten Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und der Zunahme des T_H1-Zytokins IFN- γ , aber auch der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-10 im Serum. Somit veränderte die CTLA-4-Blockade während der *P. yoelii*-Infektion nicht die Qualität der Immunantwort, sondern verstärkte die ablaufende T_H1- und T_H2-Antwort.

In der Infektion mit einer virulenteren Py17NL-Variante (Py-lethal), die zu einem schnelleren Anstieg der Parasitämie führte, löste die CTLA-4-Blockade dagegen eine gesteigerte Letalität aus. Die verstärkte Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen infolge der CTLA-4-Blockade wurde dabei von einer gesteigerten TNF- α -Produktion begleitet. Die systemische Freisetzung dieses pro-inflammatorischen Zytokins verursachte verstärkte klinische Symptome wie einen ausgeprägten Gewichtsverlust und Leberpathologie. Dies zeigt das Risiko der Stimulation einer ohnehin schon T_H1-dominierten Immunantwort durch die CTLA-4-Blockade, weil dadurch Pathologie induziert wurde. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von CTLA-4 für Protektion und Pathologie in der murinen Malaria gezeigt. Die CTLA-4-Blockade *in vivo* dokumentierte, dass CTLA-4 ein wichtiger Regulator der Immunantwort im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion ist, durch dessen Expression die T-Zellantwort limitiert und überschießende Inflammation verhindert wird.

Kürzlich wurde BTLA (CD272) als ein weiterer Koinhibitor identifiziert (Watanabe et al., 2003). Seine koinhibitorische Funktion wurde in Mausmodellen für Allergie (Deppong et al., 2006), Autoimmunität (Watanabe et al., 2003) und Transplantation (Tao et al., 2005) nachgewiesen. Die Beteiligung von BTLA an der T-Zellregulation im Verlauf von Infektionen wurde dagegen noch nicht untersucht. Daher war das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit, die Funktion von BTLA in der murinen *P. berghei* ANKA-Infektion (PbA) zu analysieren. Dabei stellt die PbA-Infektion von C57BL/6-Mäusen ein Modell für die zerebrale Malaria (CM) dar, die als Komplikation der *P. falciparum*-Malaria in seltenen Fällen auch beim Menschen auftritt.

Im Verlauf der PbA-Infektion wurde ein Anstieg der BTLA-mRNA in Gehirn, Leber, Niere und Milz nachgewiesen. Während die BTLA-Induktion in der Milz von einer gesteigerten Expression von BTLA auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verursacht wurde, beruhte die Zunahme an BTLA-Transkript in Gehirn, Leber und Niere auf der Infiltration von BTLA⁺ T-Zellen in diese Organe. Um in die Interaktion von BTLA mit seinem Liganden HVEM eingreifen zu können, wurde zunächst ein Fusionsprotein aus der extrazellulären BTLA-Domäne und dem F_c-Fragment des humanen IgG₁-Moleküls generiert und seine Bindung an HVEM *in vitro* nachgewiesen. Die Stimulation von Milzzellen führte in Gegenwart von BTLA-Ig zu einer gesteigerten Proliferation und IL-2-Produktion, da BTLA-Ig die koinhibitorische Interaktion von HVEM mit endogenem BTLA blockierte. Neben dem BTLA-Ig-Fusionsprotein wurde ein Anti-BTLA-Antikörper (6A6) *in vivo* eingesetzt, der die Bindung von BTLA an HVEM blockierte, gleichzeitig jedoch BTLA ligierte. Während die Applikation von BTLA-Ig keinen Einfluss auf die Inzidenz an CM hatte, führte die Behandlung mit anti-BTLA 6A6 einen Tag vor der PbA-Infektion zu einer signifikant reduzierten Inzidenz an CM. Damit verbunden war eine verringerte Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und eine verminderte T-Zellsequestration an das Hirnendothel. Anti-BTLA 6A6 induzierte keine systemische Immunsuppression, da die Endothelaktivierung und die T-Zellaktivierung nicht beeinflusst wurden. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BTLA im Verlauf der PbA-Infektion als Koinhibitor an der Modulation der zerebralen Pathologie mitwirkt. Es bleibt zu untersuchen, ob BTLA auch als Regulator der Infiltration von T-Zellen in andere periphere Organe (Leber, Niere) eine Rolle spielt.

6 Literatur

- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Al Yaman, F. M., D. Mokela, B. Genton, K. A. Rockett, M. P. Alpers, and I. A. Clark. 1996. Association between serum levels of reactive nitrogen intermediates and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90:270-273.
- Alegre, M. L., P. J. Noel, B. J. Eisfelder, E. Chuang, M. R. Clark, S. L. Reiner, and C. B. Thompson. 1996. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol* 157:4762-4770.
- Alegre, M. L., K. A. Frauwirth, and C. B. Thompson. 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature reviews* 1:220-228.
- Alegre, M. L., and F. Fallarino. 2006. Mechanisms of CTLA-4-Ig in tolerance induction. *Current pharmaceutical design* 12:149-160.
- Amani, V., A. M. Vigario, E. Belnoue, M. Marussig, L. Fonseca, D. Mazier, and L. Renia. 2000. Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *European journal of immunology* 30:1646-1655.
- Amante, F. H., and M. F. Good. 1997. Prolonged Th1-like response generated by a *Plasmodium yoelii*-specific T cell clone allows complete clearance of infection in reconstituted mice. *Parasite immunology* 19:111-126.
- Ansari, M. J., A. D. Salama, T. Chitnis, R. N. Smith, H. Yagita, H. Akiba, T. Yamazaki, M. Azuma, H. Iwai, S. J. Khoury, H. Auchincloss, Jr., and M. H. Sayegh. 2003. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *The Journal of experimental medicine* 198:63-69.
- Anstey, N. M., J. B. Weinberg, M. Y. Hassanali, E. D. Mwaikambo, D. Manyenga, M. A. Misukonis, D. R. Arnelle, D. Hollis, M. I. McDonald, and D. L. Granger. 1996. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *The Journal of experimental medicine* 184:557-567.
- Bagot, S., F. Nogueira, A. Collette, V. do Rosario, F. Lemonier, P. A. Cazenave, and S. Pied. 2004. Comparative study of brain CD8⁺ T cells induced by sporozoites and those induced by blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA involved in the development of cerebral malaria. *Infection and immunity* 72:2817-2826.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18:767-811.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687.
- Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and cell biology* 76:34-40.
- Bauer, P. R., H. C. Van Der Heyde, G. Sun, R. D. Specian, and D. N. Granger. 2002. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression in an experimental model of cerebral malaria. *Microcirculation* 9:463-470.
- Bayry, J., S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri. 2007. Monoclonal antibody and intravenous immunoglobulin therapy for rheumatic diseases: rationale and mechanisms of action. *Nature clinical practice* 3:262-272.
- Belnoue, E., M. Kayibanda, A. M. Vigario, J. C. Deschemin, N. van Rooijen, M. Viguier, G. Snounou, and L. Renia. 2002. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol* 169:6369-6375.
- Belnoue, E., M. Kayibanda, J. C. Deschemin, M. Viguier, M. Mack, W. A. Kuziel, and L. Renia. 2003. CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood* 101:4253-4259.

- Beyersdorf, N., T. Hanke, T. Kerkau, and T. Hunig.** 2006. CD28 superagonists put a break on autoimmunity by preferentially activating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Autoimmunity reviews* 5:40-45.
- Boubou, M. I., A. Collette, D. Voegtli, D. Mazier, P. A. Cazenave, and S. Pied.** 1999. T cell response in malaria pathogenesis: selective increase in T cells carrying the TCR V(beta)8 during experimental cerebral malaria. *International immunology* 11:1553-1562.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
- Braun, N., Y. Marfo, C. Von Gartner, G. D. Burchard, P. F. Zipfel, N. E. Browne, B. Fleischer, and B. M. Broker.** 2003. CTLA-4 positive T cells in contrast to prolactin plasma levels discriminate between severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. *Trop Med Int Health* 8:1018-1024.
- Burgner, D., W. Xu, K. Rockett, M. Gravenor, I. G. Charles, A. V. Hill, and D. Kwiatkowski.** 1998. Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. *Lancet* 352:1193-1194.
- Burgner, D., S. Usen, K. Rockett, M. Jallow, H. Ackerman, A. Cervino, M. Pinder, and D. P. Kwiatkowski.** 2003. Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria. *Human genetics* 112:379-386.
- Carreno, B. M., and M. Collins.** 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual review of immunology* 20:29-53.
- Carter, L. L., and B. M. Carreno.** 2003. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 and programmed death-1 function as negative regulators of lymphocyte activation. *Immunologic research* 28:49-59.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia.** 1997. Inflammatory stimuli induce the accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787.
- Chaiyaroj, S. C., A. S. Rutta, K. Muenthaisong, P. Watkins, M. Na Ubol, and S. Looareesuwan.** 2004. Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. *Acta tropica* 89:319-327.
- Chambers, C. A., M. S. Kuhns, J. G. Egen, and J. P. Allison.** 2001. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annual review of immunology* 19:565-594.
- Chang, Y. H., S. L. Hsieh, Y. Chao, Y. C. Chou, and W. W. Lin.** 2005. Proinflammatory effects of LIGHT through HVEM and LTbetaR interactions in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Journal of biomedical science* 12:363-375.
- Chapoval, A. I., J. Ni, J. S. Lau, R. A. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, G. L. Sica, G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen.** 2001. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nature immunology* 2:269-274.
- Chapoval, A. I., G. Zhu, and L. Chen.** 2002. Immunoglobulin fusion proteins as a tool for evaluation of T-cell costimulatory molecules. *Molecular biotechnology* 21:259-264.
- Chemnitz, J. M., R. V. Parry, K. E. Nichols, C. H. June, and J. L. Riley.** 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173:945-954.
- Chen, C., and H. Okayama.** 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and cellular biology* 7:2745-2752.
- Chen, L.** 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature reviews* 4:336-347.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl.** 2003. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198:1875-1886.
- Chidgey, A. P., and R. L. Boyd.** 2001. Thymic stromal cells and positive selection. *Apmis* 109:481-492.
- Chikuma, S., J. B. Imboden, and J. A. Bluestone.** 2003. Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine* 197:129-135.

- Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162:156-159.
- Clark, I. A.** 1987. Monokines and lymphokines in malarial pathology. *Ann Trop Med Parasitol* 81:577-85.
- Clark, I. A., N. H. Hunt, G. A. Butcher, and W. B. Cowden.** 1987. Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) in vivo by recombinant interferon-gamma or tumor necrosis factor, and its enhancement by butylated hydroxyanisole. *J Immunol* 139:3493-6.
- Clark, I. A., K. M. Gray, E. J. Rockett, W. B. Cowden, K. A. Rockett, A. Ferrante, and B. B. Aggarwal.** 1992. Increased lymphotoxin in human malarial serum, and the ability of this cytokine to increase plasma interleukin-6 and cause hypoglycaemia in mice: implications for malarial pathology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86:602-607.
- Clark, I. A., K. A. Rockett, and W. B. Cowden.** 1992. Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *Lancet* 340:894-896.
- Clark, I. A., F. M. al-Yaman, W. B. Cowden, and K. A. Rockett.** 1996. Does malarial tolerance, through nitric oxide, explain the low incidence of autoimmune disease in tropical Africa? *Lancet* 348:1492-1494.
- Clark, I. A., M. M. Awburn, R. O. Whitten, C. G. Harper, N. G. Liomba, M. E. Molyneux, and T. E. Taylor.** 2003. Tissue distribution of migration inhibitory factor and inducible nitric oxide synthase in falciparum malaria and sepsis in African children. *Malaria journal* 2:6.
- Collins, A. V., D. W. Brodie, R. J. Gilbert, A. Iaboni, R. Manso-Sancho, B. Walse, D. I. Stuart, P. A. van der Merwe, and S. J. Davis.** 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17:201-210.
- Collins-Burow, B., and E. S. Santos.** 2007. Rituximab and its role as maintenance therapy in non-Hodgkin lymphoma. *Expert review of anticancer therapy* 7:257-273.
- Combes, V., A. R. Rosenkranz, M. Redard, G. Pizzolato, H. Lepidi, D. Vestweber, T. N. Mayadas, and G. E. Grau.** 2004. Pathogenic role of P-selectin in experimental cerebral malaria: importance of the endothelial compartment. *The American journal of pathology* 164:781-786.
- Compaan, D. M., L. C. Gonzalez, I. Tom, K. M. Loyet, D. Eaton, and S. G. Hymowitz.** 2005. Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex. *The Journal of biological chemistry* 280:39553-39561.
- Cooke, B. M., N. Mohandas, and R. L. Coppel.** 2001. The malaria-infected red blood cell: structural and functional changes. *Advances in parasitology* 50:1-86.
- Cot, S., P. Ringwald, B. Mulder, P. Mialhes, J. Yap-Yap, A. K. Nussler, and W. M. Eling.** 1994. Nitric oxide in cerebral malaria. *The Journal of infectious diseases* 169:1417-1418.
- Coyle, A. J., S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Nguyen, T. Burwell, H. Schneider, J. A. Gonzalo, M. Gosselin, L. R. Owen, C. E. Rudd, and J. C. Gutierrez-Ramos.** 2000. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13:95-105.
- Coyle, A. J., and J. C. Gutierrez-Ramos.** 2001. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nature immunology* 2:203-209.
- Crispe, I. N., T. Dao, K. Klugewitz, W. Z. Mehal, and D. P. Metz.** 2000. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunological reviews* 174:47-62.
- Curfs, J. H., T. P. Schetters, C. C. Hermesen, C. R. Jerusalem, A. A. van Zon, and W. M. Eling.** 1989. Immunological aspects of cerebral lesions in murine malaria. *Clinical and experimental immunology* 75:136-140.
- D'Ombra, M. C., D. S. Hansen, K. M. Simpson, and L. Schofield.** 2007. gammadelta-T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN-gamma response to *Plasmodium falciparum* malaria. *European journal of immunology* 37:1864-1873.
- Daikh, D. I., B. K. Finck, P. S. Linsley, D. Hollenbaugh, and D. Wofsy.** 1997. Long-term inhibition of murine lupus by brief simultaneous blockade of the B7/CD28 and CD40/gp39 costimulation pathways. *J Immunol* 159:3104-3108.

- Damonneville, M., J. Wietzerbin, V. Pancre, M. Joseph, A. Delanoye, A. Capron, and C. Auriault. 1988. Recombinant tumor necrosis factors mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *J Immunol* 140:3962-3965.
- De Souza, J. B., K. H. Williamson, T. Otani, and J. H. Playfair. 1997. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infection and immunity* 65:1593-1598.
- DeBenedette, M. A., A. Shahinian, T. W. Mak, and T. H. Watts. 1997. Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* 158:551-559.
- Deppong, C., T. I. Juehne, M. Hurchla, L. D. Friend, D. D. Shah, C. M. Rose, T. L. Bricker, L. P. Shornick, E. C. Crouch, T. L. Murphy, M. J. Holtzman, K. M. Murphy, and J. M. Green. 2006. Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation. *J Immunol* 176:3909-3913.
- Ding, Q., L. Lu, B. Wang, Y. Zhou, Y. Jiang, X. Zhou, L. Xin, Z. Jiao, and K. Y. Chou. 2006. B7H1-Ig fusion protein activates the CD4⁺ IFN-gamma receptor⁺ type 1 T regulatory subset through IFN-gamma-secreting Th1 cells. *J Immunol* 177:3606-3614.
- Dondorp, A. M., T. Planche, E. E. de Bel, B. J. Angus, K. T. Chotivanich, K. Silamut, J. A. Romijn, R. Ruangveerayuth, F. J. Hoek, P. A. Kager, J. Vreeken, and N. J. White. 1998. Nitric oxides in plasma, urine, and cerebrospinal fluid in patients with severe falciparum malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 59:497-502.
- Dong, C., U. A. Temann, and R. A. Flavell. 2001. Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J Immunol* 166:3659-3662.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine* 5:1365-1369.
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8:793-800.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, D. B. Flies, J. M. van Deursen, and L. Chen. 2004. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* 20:327-336.
- Duhen, T., C. Pasero, F. Mallet, B. Barbarat, D. Olive, and R. T. Costello. 2004. LIGHT costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion; a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation. *European journal of immunology* 34:3534-3541.
- Eagar, T. N., D. M. Turley, J. Padilla, N. J. Karandikar, L. Tan, J. A. Bluestone, and S. D. Miller. 2004. CTLA-4 regulates expansion and differentiation of Th1 cells following induction of peripheral T cell tolerance. *J Immunol* 172:7442-7450.
- Egen, J. G., M. S. Kuhns, and J. P. Allison. 2002. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nature immunology* 3:611-618.
- Eiam-Ong, S. 2003. Malarial nephropathy. *Seminars in nephrology* 23:21-33.
- Elflein, K., M. Rodriguez-Palmero, T. Kerkau, and T. Hunig. 2003. Rapid recovery from T lymphopenia by CD28 superagonist therapy. *Blood* 102:1764-1770.
- Engwerda, C. R., T. L. Mynott, S. Sawhney, J. B. De Souza, Q. D. Bickle, and P. M. Kaye. 2002. Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *The Journal of experimental medicine* 195:1371-1377.
- Evans, V. J., J. C. Bryant, W. T. McQuilkin, M. C. Fioramonti, K. K. Sanford, B. B. Westfall, and W. R. Earle. 1956. Studies of nutrient media for tissue cells in vitro. II. An improved protein-free chemically defined medium for long-term cultivation of strain L-929 cells. *Cancer research* 16:87-94.
- Falanga, P. B., and E. C. Butcher. 1991. Late treatment with anti-LFA-1 (CD11a) antibody prevents cerebral malaria in a mouse model. *European journal of immunology* 21:2259-2263.
- Favre, N., C. Da Laperousaz, B. Ryffel, N. A. Weiss, B. A. Imhof, W. Rudin, R. Lucas, and P. F. Piguet. 1999. Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1:961-968.

- Finley, R. W., L. J. Mackey, and P. H. Lambert.** 1982. Virulent P. berghei malaria: prolonged survival and decreased cerebral pathology in cell-dependent nude mice. *J Immunol* 129:2213-2218.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky.** 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4:330-336.
- Franklin, B. S., S. O. Rodrigues, L. R. Antonelli, R. V. Oliveira, A. M. Goncalves, P. A. Sales-Junior, E. P. Valente, J. I. Alvarez-Leite, C. Ropert, D. T. Golenbock, and R. T. Gazzinelli.** 2007. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 9:881-890.
- Fraser, G., C. A. Smith, K. Imrie, and R. Meyer.** 2007. Alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Oncol* 14:96-109.
- Frauwirth, K. A., and C. B. Thompson.** 2002. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *The Journal of clinical investigation* 109:295-299.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo.** 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* 192:1027-1034.
- Gavrieli, M., N. Watanabe, S. K. Loftin, T. L. Murphy, and K. M. Murphy.** 2003. Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochemical and biophysical research communications* 312:1236-1243.
- Gavrieli, M., J. Sedy, C. A. Nelson, and K. M. Murphy.** 2006. BTLA and HVEM cross talk regulates inhibition and costimulation. *Advances in immunology* 92:157-185.
- Gluzman, Y.** 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182.
- Gonzalez, L. C., K. M. Loyet, J. Calemene-Fenau, V. Chauhan, B. Wranik, W. Ouyang, and D. L. Eaton.** 2005. A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:1116-1121.
- Good, M. F., and D. L. Doolan.** 1999. Immune effector mechanisms in malaria. *Current opinion in immunology* 11:412-419.
- Gowda, D.** 2002. Structure and activity of glycosylphosphatidylinositol anchors of Plasmodium falciparum. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4:983-990.
- Graefe, S. E., T. Jacobs, U. Wachter, B. M. Broker, and B. Fleischer.** 2004. CTLA-4 regulates the murine immune response to Trypanosoma cruzi infection. *Parasite immunology* 26:19-28.
- Gramaglia, I., P. Sobolewski, D. Meays, R. Contreras, J. P. Nolan, J. A. Frangos, M. Intaglietta, and H. C. van der Heyde.** 2006. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nature medicine* 12:1417-1422.
- Grau, G. E., P. F. Piguet, H. D. Engers, J. A. Louis, P. Vassalli, and P. H. Lambert.** 1986. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Immunol* 137:2348-2354.
- Grau, G. E., L. F. Fajardo, P. F. Piguet, B. Allet, P. H. Lambert, and P. Vassalli.** 1987. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science (New York, N.Y)* 237:1210-1212.
- Grau, G. E., H. Heremans, P. F. Piguet, P. Pointaire, P. H. Lambert, A. Billiau, and P. Vassalli.** 1989. Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:5572-5574.
- Grau, G. E., T. E. Taylor, M. E. Molyneux, J. J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel, and P. H. Lambert.** 1989. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *The New England journal of medicine* 320:1586-1591.

- Grau, G. E., G. Bieler, P. Pointaire, S. De Kossodo, F. Tacchini-Cotier, P. Vassalli, P. F. Piguet, and P. H. Lambert. 1990. Significance of cytokine production and adhesion molecules in malarial immunopathology. *Immunology letters* 25:189-194.
- Grau, G. E., K. Frei, P. F. Piguet, A. Fontana, H. Heremans, A. Billiau, P. Vassalli, and P. H. Lambert. 1990. Interleukin 6 production in experimental cerebral malaria: modulation by anticytokine antibodies and possible role in hypergammaglobulinemia. *The Journal of experimental medicine* 172:1505-1508.
- Grau, G. E., P. Pointaire, P. F. Piguet, C. Vesin, H. Rosen, I. Stamenkovic, F. Takei, and P. Vassalli. 1991. Late administration of monoclonal antibody to leukocyte function-antigen 1 abrogates incipient murine cerebral malaria. *European journal of immunology* 21:2265-2267.
- Grau, G. E., C. D. Mackenzie, R. A. Carr, M. Redard, G. Pizzolato, C. Allasia, C. Cataldo, T. E. Taylor, and M. E. Molyneux. 2003. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *The Journal of infectious diseases* 187:461-466.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annual review of immunology* 23:515-548.
- Gregor, P. D., J. D. Wolchok, C. R. Ferrone, H. Buchinskyy, J. A. Guevara-Patino, M. A. Perales, F. Mortazavi, D. Bacich, W. Heston, J. B. Latouche, M. Sadelain, J. P. Allison, H. I. Scher, and A. N. Houghton. 2004. CTLA-4 blockade in combination with xenogeneic DNA vaccines enhances T-cell responses, tumor immunity and autoimmunity to self antigens in animal and cellular model systems. *Vaccine* 22:1700-1708.
- Grimbacher, B., A. Hutloff, M. Schlesier, E. Glocker, K. Warnatz, R. Drager, H. Eibel, B. Fischer, A. A. Schaffer, H. W. Mages, R. A. Kroczeck, and H. H. Peter. 2003. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature immunology* 4:261-268.
- Grohmann, U., F. Fallarino, and P. Puccetti. 2003. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends in immunology* 24:242-248.
- Guillonnet, C., M. Hill, F. X. Hubert, E. Chiffolleau, C. Herve, X. L. Li, M. Heslan, C. Usal, L. Tesson, S. Menoret, A. Saoudi, B. Le Mauff, R. Josien, M. C. Cuturi, and I. Anegon. 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of clinical investigation* 117:1096-1106.
- Guillot, C., P. Mathieu, H. Coathalem, B. Le Mauff, M. G. Castro, L. Tesson, C. Usal, T. Laumonier, S. Brouard, J. P. Souillou, P. R. Lowenstein, M. C. Cuturi, and I. Anegon. 2000. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. *J Immunol* 164:5258-5268.
- Guillot, C., S. Menoret, C. Guillonnet, C. Braudeau, M. G. Castro, P. Lowenstein, and I. Anegon. 2003. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 101:3325-3333.
- Han, P., O. D. Goularte, K. Rufner, B. Wilkinson, and J. Kaye. 2004. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J Immunol* 172:5931-5939.
- Harrop, J. A., P. C. McDonnell, M. Brigham-Burke, S. D. Lyn, J. Minton, K. B. Tan, K. Dede, J. Spanpanato, C. Silverman, P. Hensley, R. DiPrinzio, J. G. Emery, K. Deen, C. Eichman, M. Chabot-Fletcher, A. Truneh, and P. R. Young. 1998. Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *The Journal of biological chemistry* 273:27548-27556.
- Hearn, J., N. Rayment, D. N. Landon, D. R. Katz, and J. B. de Souza. 2000. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infection and immunity* 68:5364-5376.
- Hermesen, C. C., E. Mommers, T. van de Wiel, R. W. Sauerwein, and W. M. Eling. 1998. Convulsions due to increased permeability of the blood-brain barrier in experimental cerebral malaria can be prevented by splenectomy or anti-T cell treatment. *The Journal of infectious diseases* 178:1225-1227.
- Hirano, F., K. Kaneko, H. Tamura, H. Dong, S. Wang, M. Ichikawa, C. Rietz, D. B. Flies, J. S. Lau, G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 2005. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer research* 65:1089-1096.

- Hisaeda, H., Y. Maekawa, D. Iwakawa, H. Okada, K. Himeno, K. Kishihara, S. Tsukumo, and K. Yasutomo.** 2004. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nature medicine* 10:29-30.
- Hisaeda, H., S. Hamano, C. Mitoma-Obata, K. Tetsutani, T. Imai, H. Waldmann, K. Himeno, and K. Yasutomo.** 2005. Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced [corrected] TNFR family-related protein (GITR) during *Plasmodium yoelii* infection. *European journal of immunology* 35:3516-3524.
- Hobbs, M. R., V. Udhayakumar, M. C. Levesque, J. Booth, J. M. Roberts, A. N. Tkachuk, A. Pole, H. Coon, S. Kariuki, B. L. Nahlen, E. D. Mwaikambo, A. L. Lal, D. L. Granger, N. M. Anstey, and J. B. Weinberg.** 2002. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 360:1468-1475.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone.** 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17-27.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi.** 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* (New York, N.Y.) 299:1057-1061.
- Hori, S., and S. Sakaguchi.** 2004. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6:745-751.
- Huber, S., C. Schramm, H. A. Lehr, A. Mann, S. Schmitt, C. Becker, M. Protschka, P. R. Galle, M. F. Neurath, and M. Blessing.** 2004. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol* 173:6526-6531.
- Hurchla, M. A., J. R. Sedy, M. Gavrieli, C. G. Drake, T. L. Murphy, and K. M. Murphy.** 2005. B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly induced in anergic CD4⁺ T cells. *J Immunol* 174:3377-3385.
- Hurchla, M. A., J. R. Sedy, and K. M. Murphy.** 2007. Unexpected role of B and T lymphocyte attenuator in sustaining cell survival during chronic allostimulation. *J Immunol* 178:6073-6082.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R. A. Kroczeck.** 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263-266.
- Hutloff, A., K. Buchner, K. Reiter, H. J. Baelde, M. Odendahl, A. Jacobi, T. Dorner, and R. A. Kroczeck.** 2004. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 50:3211-3220.
- Imhof, B. A., and D. Dunon.** 1995. Leukocyte migration and adhesion. *Advances in immunology* 58:345-416.
- Ishida, M., Y. Iwai, Y. Tanaka, T. Okazaki, G. J. Freeman, N. Minato, and T. Honjo.** 2002. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunology letters* 84:57-62.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo.** 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal* 11:3887-3895.
- Iuvone, T., F. D'Acquisto, R. Carnuccio, and M. Di Rosa.** 1996. Nitric oxide inhibits LPS-induced tumor necrosis factor synthesis in vitro and in vivo. *Life sciences* 59:PL207-211.
- Jacobs, T., S. E. Graefe, S. Niknafs, I. Gaworski, and B. Fleischer.** 2002. Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. *J Immunol* 169:2323-2329.
- Jacobs, T., T. Plate, I. Gaworski, and B. Fleischer.** 2004. CTLA-4-dependent mechanisms prevent T cell induced-liver pathology during the erythrocyte stage of *Plasmodium berghei* malaria. *European journal of immunology* 34:972-980.
- Jakubowski, A., B. N. Ehrenfels, R. B. Pepinsky, and L. C. Burkly.** 1995. Vascular cell adhesion molecule-Ig fusion protein selectively targets activated alpha 4-integrin receptors in vivo. Inhibition of autoimmune diabetes in an adoptive transfer model in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 155:938-946.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M.** 2001. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5th Edition, Current Biology Publications, London; Garland Publishing, New York.

- Jennings, V. M., A. A. Lal, and R. L. Hunter. 1998. Evidence for multiple pathologic and protective mechanisms of murine cerebral malaria. *Infection and immunity* 66:5972-5979.
- June, C. H., J. A. Bluestone, L. M. Nadler, and C. B. Thompson. 1994. The B7 and CD28 receptor families. *Immunology today* 15:321-331.
- Kanai, T., T. Totsuka, K. Uraushihara, S. Makita, T. Nakamura, K. Koganei, T. Fukushima, H. Akiba, H. Yagita, K. Okumura, U. Machida, H. Iwai, M. Azuma, L. Chen, and M. Watanabe. 2003. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 171:4156-4163.
- Kanaya, K., Y. Tsuchida, M. Inobe, M. Murakami, T. Hirose, S. Kon, S. Kawaguchi, T. Wada, T. Yamashita, S. Ishii, and T. Uede. 2003. Combined gene therapy with adenovirus vectors containing CTLA4Ig and CD40Ig prolongs survival of composite tissue allografts in rat model. *Transplantation* 75:275-281.
- Kataoka, H., S. Takahashi, K. Takase, S. Yamasaki, T. Yokosuka, T. Koike, and T. Saito. 2005. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *International immunology* 17:421-427.
- Keler, T., E. Halk, L. Vitale, T. O'Neill, D. Blanset, S. Lee, M. Srinivasan, R. F. Graziano, T. Davis, N. Lonberg, and A. Korman. 2003. Activity and safety of CTLA-4 blockade combined with vaccines in cynomolgus macaques. *J Immunol* 171:6251-6259.
- Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature immunology* 4:337-342.
- Kilbourn, R. G., and P. Belloni. 1990. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *Journal of the National Cancer Institute* 82:772-776.
- Kirchberger, S., O. Majdic, P. Steinberger, S. Bluml, K. Pfistershammer, G. Zlabinger, L. Deszcz, E. Kuechler, W. Knapp, and J. Stockl. 2005. Human rhinoviruses inhibit the accessory function of dendritic cells by inducing sialoadhesin and B7-H1 expression. *J Immunol* 175:1145-1152.
- Kobayashi, F., T. Morii, T. Matsui, T. Fujino, Y. Watanabe, W. P. Weidanz, and M. Tsuji. 1996. Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*. *Parasitology research* 82:385-391.
- Kobayashi, F., M. Niikura, S. Waki, T. Matsui, T. Fujino, T. Tsuruhara, and S. Kamiya. 2007. *Plasmodium berghei* XAT: Contribution of gammadelta T cells to host defense against infection with blood-stage nonlethal malaria parasite. *Exp Parasitol*.
- König, R. 2002. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Current opinion in immunology* 14:75-83.
- Kossodo, S., C. Monso, P. Juillard, T. Velu, M. Goldman, and G. E. Grau. 1997. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology* 91:536-540.
- Kremer, J. M., R. Westhovens, M. Leon, E. Di Giorgio, R. Alten, S. Steinfeld, A. Russell, M. Dougados, P. Emery, I. F. Nuamah, G. R. Williams, J. C. Becker, D. T. Hagerty, and L. W. Moreland. 2003. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *The New England journal of medicine* 349:1907-1915.
- Kremsner, P. G., S. Winkler, E. Wildling, J. Prada, U. Bienzle, W. Graninger, and A. K. Nussler. 1996. High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90:44-47.
- Krieg, C., P. Han, R. Stone, O. D. Goularte, and J. Kaye. 2005. Functional analysis of B and T lymphocyte attenuator engagement on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 175:6420-6427.
- Krieg, C., O. Boyman, Y. X. Fu, and J. Kaye. 2007. B and T lymphocyte attenuator regulates CD8+ T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nature immunology* 8:162-171.
- Krishnegowda, G., A. M. Hajjar, J. Zhu, E. J. Douglass, S. Uematsu, S. Akira, A. S. Woods, and D. C. Gowda. 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *The Journal of biological chemistry* 280:8606-8616.

- Krummel, M. F., and J. P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine* 182:459-465.
- Kurian, A. W., R. N. Thompson, A. F. Gaw, S. Arai, R. Ortiz, and A. M. Garber. 2007. A cost-effectiveness analysis of adjuvant trastuzumab regimens in early HER2/neu-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 25:634-641.
- Kwiatkowski, D., A. V. Hill, I. Sambou, P. Twumasi, J. Castracane, K. R. Manogue, A. Cerami, D. R. Brewster, and B. M. Greenwood. 1990. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 336:1201-1204.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lang W., Löscher T. 2000. Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 3. Auflage, Stuttgart, New York: Thieme, 10-30.
- Langhorne, J., S. J. Quin, and L. A. Sanni. 2002. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chemical immunology* 80:204-228.
- Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A. J. Long, J. A. Brown, R. Nunes, E. A. Greenfield, K. Bourque, V. A. Boussiotis, L. L. Carter, B. M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology* 2:261-268.
- Laumonier, T., N. Potiron, F. Boeffard, C. Chagneau, S. Brouard, C. Guillot, J. P. Souillou, I. Anegon, and B. Le Mauff. 2003. CTLA4Ig adenoviral gene transfer induces long-term islet rat allograft survival, without tolerance, after systemic but not local intragraft expression. *Human gene therapy* 14:561-575.
- Lemischka, I. R., D. H. Raulet, and R. C. Mulligan. 1986. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 45:917-927.
- Lepeniev B. 2004. Klonierung und funktionelle Charakterisierung von BTLA, einem inhibitorischen Molekül auf T-Zellen. Diplomarbeit zur Diplom-Hauptprüfung im Studiengang Biochemie/Molekularbiologie der Universität Hamburg.
- Lepeniev, B., J. P. Cramer, G. D. Burchard, H. Wagner, C. J. Kirschning, and T. Jacobs. 2007. Induction of experimental cerebral malaria is independent of TLR2/4/9. *Medical microbiology and immunology*, in press.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, and M. G. Roncarolo. 2001. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *The Journal of experimental medicine* 193:1295-1302.
- Li, C., E. Seixas, and J. Langhorne. 2001. Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Medical microbiology and immunology* 189:115-126.
- Li, J., W. L. Chang, G. Sun, H. L. Chen, R. D. Specian, S. M. Berney, D. Kimpel, D. N. Granger, and H. C. van der Heyde. 2003. Intercellular adhesion molecule 1 is important for the development of severe experimental malaria but is not required for leukocyte adhesion in the brain. *J Invest Med* 51:128-140.
- Liang, S. C., Y. E. Latchman, J. E. Buhlmann, M. F. Tomczak, B. H. Horwitz, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2003. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European journal of immunology* 33:2706-2716.
- Liedert, B., S. Bassus, C. K. Schneider, U. Kalinke, and J. Lower. 2007. Safety of phase I clinical trials with monoclonal antibodies in Germany--the regulatory requirements viewed in the aftermath of the TGN1412 disaster. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 45:1-9.
- Lin, C. H., and T. Hunig. 2003. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *European journal of immunology* 33:626-638.
- Ling, V., P. W. Wu, H. F. Finnerty, K. M. Bean, V. Spaulding, L. A. Fouser, J. P. Leonard, S. E. Hunter, R. Zollner, J. L. Thomas, J. S. Miyashiro, K. A. Jacobs, and M. Collins. 2000. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol* 164:1653-1657.
- Ling, V., P. W. Wu, V. Spaulding, J. Kieleczawa, D. Luxenberg, B. M. Carreno, and M. Collins. 2003. Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss. *Genomics* 82:365-377.

- Liu, J., C. S. Schmidt, F. Zhao, A. J. Okragly, A. Glasebrook, N. Fox, E. Galbreath, Q. Zhang, H. Y. Song, S. Na, and D. D. Yang. 2003. LIGHT-deficiency impairs CD8+ T cell expansion, but not effector function. *International immunology* 15:861-870.
- Loser, K., A. Scherer, M. B. Krummen, G. Varga, T. Higuchi, T. Schwarz, A. H. Sharpe, S. Grabbe, J. A. Bluestone, and S. Beissert. 2005. An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice. *J Immunol* 174:5298-5305.
- Loyet, K. M., W. Ouyang, D. L. Eaton, and J. T. Stults. 2005. Proteomic profiling of surface proteins on Th1 and Th2 cells. *Journal of proteome research* 4:400-409.
- Lucas, R., J. N. Lou, P. Juillard, M. Moore, H. Bluethmann, and G. E. Grau. 1997. Respective role of TNF receptors in the development of experimental cerebral malaria. *Journal of neuroimmunology* 72:143-148.
- Mackintosh, C. L., J. G. Beeson, and K. Marsh. 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in parasitology* 20:597-603.
- MacPherson, G. G., M. J. Warrell, N. J. White, S. Looareesuwan, and D. A. Warrell. 1985. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *The American journal of pathology* 119:385-401.
- Mages, H. W., A. Hutloff, C. Heuck, K. Buchner, H. Himmelbauer, F. Oliveri, and R. A. Kroczeck. 2000. Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *European journal of immunology* 30:1040-1047.
- Mak, T. W., A. Shahinian, S. K. Yoshinaga, A. Wakeham, L. M. Boucher, M. Pintilie, G. Duncan, B. U. Gajewska, M. Gronski, U. Eriksson, B. Odermatt, A. Ho, D. Bouchard, J. S. Whorisky, M. Jordana, P. S. Ohashi, T. Pawson, F. Bladt, and A. Tafuri. 2003. Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nature immunology* 4:765-772.
- Mamura, M., W. Lee, T. J. Sullivan, A. Felici, A. L. Sowers, J. P. Allison, and J. J. Letterio. 2004. CD28 disruption exacerbates inflammation in Tgf-beta1-/- mice: in vivo suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells independent of autocrine TGF-beta1. *Blood* 103:4594-4601.
- Marie, J. C., J. J. Letterio, M. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 201:1061-1067.
- Martins, G. A., C. E. Tadokoro, R. B. Silva, J. S. Silva, and L. V. Rizzo. 2004. CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 172:4893-4901.
- Mauri, D. N., R. Ebner, R. I. Montgomery, K. D. Kochel, T. C. Cheung, G. L. Yu, S. Ruben, M. Murphy, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, P. G. Spear, and C. F. Ware. 1998. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 8:21-30.
- McAdam, A. J., R. J. Greenwald, M. A. Levin, T. Chernova, N. Malenkovich, V. Ling, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 409:102-105.
- McCoy, K., M. Camberis, and G. L. Gros. 1997. Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. *The Journal of experimental medicine* 186:183-187.
- Medana, I. M., and G. D. Turner. 2006. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *International journal for parasitology* 36:555-568.
- Mehra, R., and B. Burtneess. 2006. Antibody therapy for early-stage breast cancer: trastuzumab adjuvant and neoadjuvant trials. *Expert opinion on biological therapy* 6:951-962.
- Mehrishi, J. N., M. Szabo, and T. Bakacs. 2007. Some aspects of the recombinantly expressed humanised superagonist anti-CD28 mAb, TGN1412 trial catastrophe lessons to safeguard mAbs and vaccine trials. *Vaccine* 25:3517-3523.
- Mihara, M., I. Tan, Y. Chuzhin, B. Reddy, L. Budhai, A. Holzer, Y. Gu, and A. Davidson. 2000. CTLA4Ig inhibits T cell-dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation* 106:91-101.
- Miller, D. H., O. A. Khan, W. A. Sheremata, L. D. Blumhardt, G. P. Rice, M. A. Libonati, A. J. Willmer-Hulme, C. M. Dalton, K. A. Miszkiel, and P. W. O'Connor. 2003. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 348:15-23.

- Miller, L. H., M. F. Good, and G. Milon.** 1994. Malaria pathogenesis. *Science* (New York, N.Y. 264:1878-1883.
- Miller, L. H., D. I. Baruch, K. Marsh, and O. K. Doumbo.** 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415:673-679.
- Mitchell, A. J., A. M. Hansen, L. Hee, H. J. Ball, S. M. Potter, J. C. Walker, and N. H. Hunt.** 2005. Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria. *Infection and immunity* 73:5645-5653.
- Monso-Hinard, C., J. N. Lou, C. Behr, P. Juillard, and G. E. Grau.** 1997. Expression of major histocompatibility complex antigens on mouse brain microvascular endothelial cells in relation to susceptibility to cerebral malaria. *Immunology* 92:53-59.
- Montgomery, R. I., M. S. Warner, B. J. Lum, and P. G. Spear.** 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87:427-436.
- Morel, Y., J. M. Schiano de Colella, J. Harrop, K. C. Deen, S. D. Holmes, T. A. Wattam, S. S. Khandekar, A. Truneh, R. W. Sweet, J. A. Gastaut, D. Olive, and R. T. Costello.** 2000. Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J Immunol* 165:4397-4404.
- Morel, Y., A. Truneh, R. W. Sweet, D. Olive, and R. T. Costello.** 2001. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J Immunol* 167:2479-2486.
- Morrot, A., and F. Zavala.** 2004. Regulation of the CD8+ T cell responses against Plasmodium liver stages in mice. *International journal for parasitology* 34:1529-1534.
- Mota, M. M., G. Pradel, J. P. Vanderberg, J. C. Hafalla, U. Frevert, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, and A. Rodriguez.** 2001. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* (New York, N.Y. 291:141-144.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, J. R. Lee, K. G. Jhaver, T. S. Johnson, D. B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S. J. Antonia, R. Burgess, C. L. Slingsluff, Jr., and A. L. Mellor.** 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* (New York, N.Y. 297:1867-1870.
- Murphy, K. M., C. A. Nelson, and J. R. Sedy.** 2006. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nature reviews* 6:671-681.
- Murphy, M. L., S. E. Cotterell, P. M. Gorak, C. R. Engwerda, and P. M. Kaye.** 1998. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, Leishmania donovani. *J Immunol* 161:4153-4160.
- Nakamura, K., K. Honda, T. Mizutani, H. Akiho, and N. Harada.** 2006. Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. *World J Gastroenterol* 12:4628-4635.
- Neill, A. L., and N. H. Hunt.** 1992. Pathology of fatal and resolving Plasmodium berghei cerebral malaria in mice. *Parasitology* 105 (Pt 2):165-175.
- Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo.** 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151.
- Nitcheu, J., O. Bonduelle, C. Combadiere, M. Tefit, D. Seilhean, D. Mazier, and B. Combadiere.** 2003. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol* 170:2221-2228.
- Nurieva, R. I., J. Duong, H. Kishikawa, U. Dianzani, J. M. Rojo, I. Ho, R. A. Flavell, and C. Dong.** 2003. Transcriptional regulation of th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity* 18:801-811.
- Nussler, A. K., W. Eling, and P. G. Kremsner.** 1994. Patients with Plasmodium falciparum malaria and Plasmodium vivax malaria show increased nitrite and nitrate plasma levels. *The Journal of infectious diseases* 169:1418-1419.
- O'Garra, A.** 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275-283.

- Ohigashi, Y., M. Sho, Y. Yamada, Y. Tsurui, K. Hamada, N. Ikeda, T. Mizuno, R. Yoriki, H. Kashizuka, K. Yane, F. Tsushima, N. Otsuki, H. Yagita, M. Azuma, and Y. Nakajima. 2005. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 11:2947-2953.
- Ohshima, Y., Y. Tanaka, H. Tozawa, Y. Takahashi, C. Maliszewski, and G. Delespesse. 1997. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159:3838-3848.
- Okamoto, T., S. Saito, H. Yamanaka, T. Tomatsu, N. Kamatani, H. Ogiuchi, T. Uchiyama, and J. Yagi. 2003. Expression and function of the co-stimulator H4/ICOS on activated T cells of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 30:1157-1163.
- Okazaki, T., Y. Iwai, and T. Honjo. 2002. New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Current opinion in immunology* 14:779-782.
- Okazaki, T., and T. Honjo. 2006. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in immunology* 27:195-201.
- Omer, F. M., J. B. de Souza, P. H. Corran, A. A. Sultan, and E. M. Riley. 2003. Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule. *The Journal of experimental medicine* 198:1817-1827.
- Omer, F. M., J. B. de Souza, and E. M. Riley. 2003. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol* 171:5430-5436.
- Orabona, C., M. L. Belladonna, C. Vacca, R. Bianchi, F. Fallarino, C. Volpi, S. Gizzi, M. C. Fioretti, U. Grohmann, and P. Puccetti. 2005. Cutting edge: silencing suppressor of cytokine signaling 3 expression in dendritic cells turns CD28-Ig from immune adjuvant to suppressant. *J Immunol* 174:6582-6586.
- Otsuki, N., Y. Kamimura, M. Hashiguchi, and M. Azuma. 2006. Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells. *Biochemical and biophysical research communications* 344:1121-1127.
- Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10398-10403.
- Perniok, A., and A. Rubbert-Roth. 2003. [New biological therapeutic options for the treatment of RE: inhibition of costimulatory molecules and blockade of Interleukin-6-interaction]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 62:433-438.
- Perry, J. A., A. Rush, R. J. Wilson, C. S. Olver, and A. C. Avery. 2004. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. *J Immunol* 172:475-482.
- Piguet, P. F., C. D. Kan, C. Vesin, A. Rochat, Y. Donati, and C. Barazzzone. 2001. Role of CD40-CVD40L in mouse severe malaria. *The American journal of pathology* 159:733-742.
- Pino, P., Z. Taoufiq, J. Nitcheu, I. Vouldoukis, and D. Mazier. 2005. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thrombosis and haemostasis* 94:336-340.
- Pober, J. S., and R. S. Cotran. 1991. Immunologic interactions of T lymphocytes with vascular endothelium. *Advances in immunology* 50:261-302.
- Prasad, D. V., S. Richards, X. M. Mai, and C. Dong. 2003. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity* 18:863-873.
- Puck, T. T., S. J. Cieciura, and A. Robinson. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of experimental medicine* 108:945-956.
- Ransohoff, R. M. 2007. Natalizumab for multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 356:2622-2629.
- Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 192:295-302.
- Recillas-Targa, F. 2006. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol* 34:337-54.

- Reis e Sousa, C.** 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current opinion in immunology* 16:21-25.
- Renia, L., S. M. Potter, M. Mauduit, D. S. Rosa, M. Kayibanda, J. C. Deschemin, G. Snounou, and A. C. Gruner.** 2006. Pathogenic T cells in cerebral malaria. *International journal for parasitology* 36:547-554.
- Riley, E. M., S. Wahl, D. J. Perkins, and L. Schofield.** 2006. Regulating immunity to malaria. *Parasite immunology* 28:35-49.
- Roberts, D. W., and W. P. Weidanz.** 1979. T-cell immunity to malaria in the B-cell deficient mouse. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 28:1-3.
- Robinson, V. K., E. Sato, D. K. Nelson, S. L. Camhi, R. A. Robbins, and J. C. Hoyt.** 2001. Peroxynitrite inhibits inducible (type 2) nitric oxide synthase in murine lung epithelial cells in vitro. *Free radical biology & medicine* 30:986-991.
- Rockett, K. A., M. M. Awburn, B. B. Aggarwal, W. B. Cowden, and I. A. Clark.** 1992. In vivo induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infection and immunity* 60:3725-3730.
- Rockett, K. A., M. M. Awburn, E. J. Rockett, and I. A. Clark.** 1994. Tumor necrosis factor and interleukin-1 synergy in the context of malaria pathology. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 50:735-742.
- Rosen, S. D.** 2004. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annual review of immunology* 22:129-156.
- Rudin, W., N. Favre, G. Bordmann, and B. Ryffel.** 1997. Interferon-gamma is essential for the development of cerebral malaria. *European journal of immunology* 27:810-815.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (New York, N.Y.) 239:487-491.
- Sakaguchi, S.** 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* 6:345-352.
- Salama, A. D., T. Chitnis, J. Imitola, M. J. Ansari, H. Akiba, F. Tushima, M. Azuma, H. Yagita, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury.** 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 198:71-78.
- Sanni, L. A., W. Jarra, C. Li, and J. Langhorne.** 2004. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infection and immunity* 72:3054-3058.
- Sansom, D. M., and N. D. Hall.** 1993. B7/BB1, the ligand for CD28, is expressed on repeatedly activated human T cells in vitro. *European journal of immunology* 23:295-298.
- Sansom, D. M., and L. S. Walker.** 2006. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunological reviews* 212:131-148.
- Scheu, S., J. Alferink, T. Potzel, W. Barchet, U. Kalinke, and K. Pfeffer.** 2002. Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. *The Journal of experimental medicine* 195:1613-1624.
- Schlotmann, T., I. Waase, C. Julch, U. Klauenberg, B. Muller-Myhsok, M. Dietrich, B. Fleischer, and B. M. Broker.** 2000. CD4 alphabeta T lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. *The Journal of infectious diseases* 182:367-370.
- Schofield, L., and F. Hackett.** 1993. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *The Journal of experimental medicine* 177:145-153.
- Schofield, L., M. C. Hewitt, K. Evans, M. A. Siomos, and P. H. Seeberger.** 2002. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature* 418:785-789.
- Scholander, C., C. J. Treutiger, K. Hultenby, and M. Wahlgren.** 1996. Novel fibrillar structure confers adhesive property to malaria-infected erythrocytes. *Nature medicine* 2:204-208.
- Schramm, C., S. Huber, M. Protschka, P. Czochra, J. Burg, E. Schmitt, A. W. Lohse, P. R. Galle, and M. Blessing.** 2004. TGFbeta regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *International immunology* 16:1241-1249.

- Sedegah, M., F. Finkelman, and S. L. Hoffman.** 1994. Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:10700-10702.
- Sedy, J. R., M. Gavrieli, K. G. Potter, M. A. Hurchla, R. C. Lindsley, K. Hildner, S. Scheu, K. Pfeffer, C. F. Ware, T. L. Murphy, and K. M. Murphy.** 2005. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature immunology* 6:90-98.
- Selenko-Gebauer, N., O. Majdic, A. Szekeres, G. Hofler, E. Guthann, U. Korthauer, G. Zlabinger, P. Steinberger, W. F. Pickl, H. Stockinger, W. Knapp, and J. Stockl.** 2003. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J Immunol* 170:3637-3644.
- Serirrom, S., W. H. Raharjo, K. Chotivanich, S. Loareesuwan, P. Kubes, and M. Ho.** 2003. Anti-adhesive effect of nitric oxide on Plasmodium falciparum cytoadherence under flow. *The American journal of pathology* 162:1651-1660.
- Shaikh, R. B., S. Santee, S. W. Granger, K. Butrovich, T. Cheung, M. Kronenberg, H. Cheroutre, and C. F. Ware.** 2001. Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction. *J Immunol* 167:6330-6337.
- Sharpe, A. H.** 1995. Analysis of lymphocyte costimulation in vivo using transgenic and 'knockout' mice. *Current opinion in immunology* 7:389-395.
- Shi, G., H. Luo, X. Wan, T. W. Salcedo, J. Zhang, and J. Wu.** 2002. Mouse T cells receive costimulatory signals from LIGHT, a TNF family member. *Blood* 100:3279-3286.
- Shilling, R. A., J. M. Pinto, D. C. Decker, D. H. Schneider, H. S. Bandukwala, J. R. Schneider, B. Camoretti-Mercado, C. Ober, and A. I. Sperling.** 2005. Cutting edge: polymorphisms in the ICOS promoter region are associated with allergic sensitization and Th2 cytokine production. *J Immunol* 175:2061-2065.
- Shin, T., K. Yoshimura, T. Shin, E. B. Crafton, H. Tsuchiya, F. Housseau, H. Koseki, R. D. Schulick, L. Chen, and D. M. Pardoll.** 2005. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of experimental medicine* 201:1531-1541.
- Sica, G. L., I. H. Choi, G. Zhu, K. Tamada, S. D. Wang, H. Tamura, A. I. Chapoval, D. B. Flies, J. Bajorath, and L. Chen.** 2003. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* 18:849-861.
- Sinclair, N. R.** 1999. Why so many coinhibitory receptors? *Scandinavian journal of immunology* 50:10-13.
- Singh, R. P., S. Kashiwamura, P. Rao, H. Okamura, A. Mukherjee, and V. S. Chauhan.** 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.
- Smith, P., C. M. Walsh, N. E. Mangan, R. E. Fallon, J. R. Sayers, A. N. McKenzie, and P. G. Fallon.** 2004. Schistosoma mansoni worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. *J Immunol* 173:1240-1248.
- Spencer Valero, L. M., S. A. Ogun, S. L. Fleck, I. T. Ling, T. J. Scott-Finnigan, M. J. Blackman, and A. A. Holder.** 1998. Passive immunization with antibodies against three distinct epitopes on Plasmodium yoelii merozoite surface protein 1 suppresses parasitemia. *Infection and immunity* 66:3925-3930.
- Sprent, J., and H. Kishimoto.** 2002. The thymus and negative selection. *Immunological reviews* 185:126-135.
- Steinberger, P., O. Majdic, S. V. Derdak, K. Pfistershammer, S. Kirchberger, C. Klauser, G. Zlabinger, W. F. Pickl, J. Stockl, and W. Knapp.** 2004. Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains. *J Immunol* 172:2352-2359.
- Stevenson, M. M., and B. C. Urban.** 2006. Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. *Parasite immunology* 28:5-14.
- Subudhi, S. K., P. Zhou, L. M. Yerian, R. K. Chin, J. C. Lo, R. A. Anders, Y. Sun, L. Chen, Y. Wang, M. L. Alegre, and Y. X. Fu.** 2004. Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection. *The Journal of clinical investigation* 113:694-700.
- Suh, W. K., B. U. Gajewska, H. Okada, M. A. Gronski, E. M. Bertram, W. Dawicki, G. S. Duncan, J. Bukczynski et al.** 2003. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nature immunology* 4:899-906.

- Sullivan, T. J., J. J. Letterio, A. van Elsas, M. Mamura, J. van Amelsfort, S. Sharpe, B. Metzler, C. A. Chambers, and J. P. Allison. 2001. Lack of a role for transforming growth factor-beta in cytotoxic T lymphocyte antigen-4-mediated inhibition of T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2587-2592.
- Sun, M., S. Richards, D. V. Prasad, X. M. Mai, A. Rudensky, and C. Dong. 2002. Characterization of mouse and human B7-H3 genes. *J Immunol* 168:6294-6297.
- Suntharalingam, G., M. R. Perry, S. Ward, S. J. Brett, A. Castello-Cortes, M. D. Brunner, and N. Panoskaltsis. 2006. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *The New England journal of medicine* 355:1018-1028.
- Swallow, M. M., J. J. Wallin, and W. C. Sha. 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 11:423-432.
- Tachado, S. D., P. Gerold, M. J. McConville, T. Baldwin, D. Quilici, R. T. Schwarz, and L. Schofield. 1996. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol* 156:1897-1907.
- Tafari, A., A. Shahinian, F. Bladt, S. K. Yoshinaga, M. Jordana, A. Wakeham, L. M. Boucher, D. Bouchard, V. S. Chan, G. Duncan, B. Odermatt, A. Ho, A. Itie, T. Horan, J. S. Whoriskey, T. Pawson, J. M. Penninger, P. S. Ohashi, and T. W. Mak. 2001. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 409:105-109.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine* 192:303-310.
- Tamada, K., K. Shimozaki, A. I. Chapoval, Y. Zhai, J. Su, S. F. Chen, S. L. Hsieh, S. Nagata, J. Ni, and L. Chen. 2000. LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J Immunol* 164:4105-4110.
- Tamada, K., K. Shimozaki, A. I. Chapoval, G. Zhu, G. Sica, D. Flies, T. Boone, H. Hsu, Y. X. Fu, S. Nagata, J. Ni, and L. Chen. 2000. Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway. *Nature medicine* 6:283-289.
- Tang, Q., E. K. Boden, K. J. Henriksen, H. Bour-Jordan, M. Bi, and J. A. Bluestone. 2004. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *European journal of immunology* 34:2996-3005.
- Tao, R., L. Wang, R. Han, T. Wang, Q. Ye, T. Honjo, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and W. W. Hancock. 2005. Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts. *J Immunol* 175:5774-5782.
- Tartz, S., J. Kamanova, M. Simsova, P. Sebo, S. Bolte, V. Heussler, B. Fleischer, and T. Jacobs. 2006. Immunization with a circumsporozoite epitope fused to Bordetella pertussis adenylate cyclase in conjunction with cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade confers protection against Plasmodium berghei liver-stage malaria. *Infection and immunity* 74:2277-2285.
- Tesciuba, A. G., S. Subudhi, R. P. Rother, S. J. Faas, A. M. Frantz, D. Elliot, J. Weinstock, L. A. Matis, J. A. Bluestone, and A. I. Sperling. 2001. Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. *J Immunol* 167:1996-2003.
- Thornton, A. M., C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *European journal of immunology* 34:366-376.
- Thumwood, C. M., N. H. Hunt, I. A. Clark, and W. B. Cowden. 1988. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology* 96 (Pt 3):579-589.
- Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581.
- Traina, T. A., H. S. Rugo, and M. Dickler. 2007. Bevacizumab for advanced breast cancer. *Hematology/oncology clinics of North America* 21:303-319.

- Troye-Blomberg, M., S. Worku, P. Tangteerawatana, R. Jamshaid, K. Soderstrom, G. Elghazali, L. Moretta, M. Hammarstrom, and L. Mincheva-Nilsson. 1999. Human gamma delta T cells that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the *Plasmodium falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. *Scandinavian journal of immunology* 50:642-650.
- Tseng, S. Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J. E. Slansky, S. I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D. M. Pardoll, and H. Tsuchiya. 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *The Journal of experimental medicine* 193:839-846.
- Ueda, H., J. M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D. B. Rainbow, K. M. Hunter et al. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506-511.
- Urban, B. C., D. J. Ferguson, A. Pain, N. Willcox, M. Plebanski, J. M. Austyn, and D. J. Roberts. 1999. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* 400:73-77.
- Vermeiren, J., J. L. Ceuppens, M. Van Ghelue, P. Witters, D. Bullens, H. W. Mages, R. A. Kroczeck, and S. W. Van Gool. 2004. Human T cell activation by costimulatory signal-deficient allogeneic cells induces inducible costimulator-expressing anergic T cells with regulatory cell activity. *J Immunol* 172:5371-5378.
- von Boehmer, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology* 6:338-344.
- von der Weid, T., N. Honarvar, and J. Langhorne. 1996. Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *J Immunol* 156:2510-2516.
- Wahlgren, M., J. S. Abrams, V. Fernandez, M. T. Bejarano, M. Azuma, M. Torii, M. Aikawa, and R. J. Howard. 1995. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells and secretion of cytokines (IL-1-beta, IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, TGF beta, TNF alpha, G-CSF, GM-CSF). *Scandinavian journal of immunology* 42:626-636.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker, and J. A. Bluestone. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *The Journal of experimental medicine* 183:2541-2550.
- Walunas, T. L., and J. A. Bluestone. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol* 160:3855-3860.
- Walz, M., L. Overbergh, C. Mathieu, H. Kolb, and S. Martin. 2002. A murine interleukin-4-Ig fusion protein regulates the expression of Th1- and Th2-specific cytokines in the pancreas of NOD mice. Hormone and metabolic research. *Hormon- und Stoffwechselforschung* 34:561-569.
- Wang, J., J. C. Lo, A. Foster, P. Yu, H. M. Chen, Y. Wang, K. Tamada, L. Chen, and Y. X. Fu. 2001. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *The Journal of clinical investigation* 108:1771-1780.
- Wang, J., and Y. X. Fu. 2004. The role of LIGHT in T cell-mediated immunity. *Immunologic research* 30:201-214.
- Wang, J., R. A. Anders, Y. Wang, J. R. Turner, C. Abraham, K. Pfeffer, and Y. X. Fu. 2005. The critical role of LIGHT in promoting intestinal inflammation and Crohn's disease. *J Immunol* 174:8173-8182.
- Wang, X., W. Huang, M. Mihara, J. Sinha, and A. Davidson. 2002. Mechanism of action of combined short-term CTLA4Ig and anti-CD40 ligand in murine systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 168:2046-2053.
- Wang, Y., S. K. Subudhi, R. A. Anders, J. Lo, Y. Sun, S. Blink, Y. Wang, J. Wang, X. Liu, K. Mink, D. Degrandi, K. Pfeffer, and Y. X. Fu. 2005. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *The Journal of clinical investigation* 115:711-717.
- Warnatz, K., L. Bossaller, U. Salzer, A. Skrabl-Baumgartner, W. Schwinger, M. van der Burg, J. J. van Dongen, M. Orlowska-Volk, R. Knoch, A. Durandy, R. Draeger, M. Schlesier, H. H. Peter, and B. Grimbacher. 2006. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 107:3045-3052.
- Wassmer, S. C., G. J. Cianciolo, V. Combes, and G. E. Grau. 2005. Inhibition of endothelial activation: a new way to treat cerebral malaria? *PLoS medicine* 2:e245.
- Watanabe, K., K. Murakami, R. Sato, T. Okimoto, K. Maeda, M. Nasu, A. Nishizono, and T. Fujioka. 2004. CTLA-4 blockade inhibits induction of *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice. *Clinical and experimental immunology* 135:29-34.

- Watanabe, N., M. Gavrieli, J. R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S. K. Loftin, M. A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T. L. Murphy, J. H. Russell, J. P. Allison, and K. M. Murphy. 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature immunology* 4:670-679.
- Watson, S. W., T. J. Novitsky, H. L. Quinby, and F. W. Valois. 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 33:940-6.
- White, W. I., C. B. Evans, and D. W. Taylor. 1991. Antimalarial antibodies of the immunoglobulin G2a isotype modulate parasitemias in mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Infection and immunity* 59:3547-3554.
- WHO report on infectious diseases. Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations 74:279.
- Wilhelm, P., U. Ritter, S. Labbow, N. Donhauser, M. Rollinghoff, C. Bogdan, and H. Korner. 2001. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol* 166:4012-4019.
- Yagi, H., T. Nomura, K. Nakamura, S. Yamazaki, T. Kitawaki, S. Hori, M. Maeda, M. Onodera, T. Uchiyama, S. Fujii, and S. Sakaguchi. 2004. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *International immunology* 16:1643-1656.
- Yamaguchi, N., S. Hiraoka, T. Mukai, N. Takeuchi, X. Y. Zhou, S. Ono, M. Kogo, K. Dunussi-Joannopoulos, V. Ling, S. Wolf, and H. Fujiwara. 2004. Induction of tumor regression by administration of B7-Ig fusion proteins: mediation by type 2 CD8+ T cells and dependence on IL-4 production. *J Immunol* 172:1347-1354.
- Yamashita, K., T. Masunaga, N. Yanagida, M. Takehara, T. Hashimoto, T. Kobayashi, H. Echizenya, N. Hua, M. Fujita, M. Murakami, H. Furukawa, T. Uede, and S. Todo. 2003. Long-term acceptance of rat cardiac allografts on the basis of adenovirus mediated CD40Ig plus CTLA4Ig gene therapies. *Transplantation* 76:1089-1096.
- Yamazaki, T., H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma, and H. Yagita. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169:5538-5545.
- Yanez, D. M., D. D. Manning, A. J. Cooley, W. P. Weidanz, and H. C. van der Heyde. 1996. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J Immunol* 157:1620-1624.
- Yashiro, Y., X. G. Tai, K. Toyo-oka, C. S. Park, R. Abe, T. Hamaoka, M. Kobayashi, S. Neben, and H. Fujiwara. 1998. A fundamental difference in the capacity to induce proliferation of naive T cells between CD28 and other co-stimulatory molecules. *European journal of immunology* 28:926-935.
- Yoeli, M., B. Hargreaves, R. Carter, and D. Walliker. 1975. Sudden increase in virulence in a strain of *Plasmodium berghei yoelii*. *Annals of tropical medicine and parasitology* 69:173-178.
- Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, S. D. Khare, U. Sarmiento, J. Guo, T. Horan, G. Shih, M. Zhang, M. A. Coccia, T. Kohno, A. Tafuri-Bladt, D. Brankow, P. Campbell, D. Chang, L. Chiu, T. Dai, G. Duncan, G. S. Elliott, A. Hui, S. M. McCabe, S. Scully, A. Shahinian, C. L. Shaklee, G. Van, T. W. Mak, and G. Senaldi. 1999. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402:827-832.
- Yu, P., Y. Lee, W. Liu, R. K. Chin, J. Wang, Y. Wang, A. Schietinger, M. Philip, H. Schreiber, and Y. X. Fu. 2004. Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. *Nature immunology* 5:141-149.
- Zang, X., P. Loke, J. Kim, K. Murphy, R. Waitz, and J. P. Allison. 2003. B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10388-10392.
- Zhang, X., J. C. Schwartz, X. Guo, S. Bhatia, E. Cao, M. Lorenz, M. Cammer, L. Chen, Z. Y. Zhang, M. A. Edidin, S. G. Nathenson, and S. C. Almo. 2004. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity* 20:337-347.
- Zheng, S. G., J. D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa, and D. A. Horwitz. 2002. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 169:4183-4189.
- Zheng, S. G., J. H. Wang, J. D. Gray, H. Soucier, and D. A. Horwitz. 2004. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 172:5213-5221.

-
- Zheng, Y., C. N. Manzotti, M. Liu, F. Burke, K. I. Mead, and D. M. Sansom.** 2004. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol* 172:2778-2784.
- Zhu, J., G. Krishnegowda, and D. C. Gowda.** 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 280:8617-8627.
- Zhu, J., L. Zou, S. Zhu, E. Mix, F. Shi, H. Wang, I. Volkmann, B. Winblad, M. Schalling, and H. Ljunggren.** 2001. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade enhances incidence and severity of experimental autoimmune neuritis in resistant mice. *Journal of neuroimmunology* 115:111-117.

7 Anhang

Sequenz des Vektors pcDNA3.1(+)-BTLAIg:

GACGGATCGG	GAGATCTCCC	GATCCCCTAT	GGTGCACCTCT	CAGTACAATC	TGCTCTGATG	60	
CCGCATAGTT	AAGCCAGTAT	CTGCTCCCTG	CTTGTGTGTT	GGAGGTCGCT	GAGTAGTGCG	120	
CGAGCAAAAT	TTAAGCTACA	ACAAGGCAAG	GCTTGACCGA	CAATTGCATG	AAGAATCTGC	180	
TTAGGGTTAG	GCGTTTTGCG	CTGCTTCGCG	ATGTACGGGC	CAGATATACG	CGTTGACATT	240	
GATTATTGAC	TAGTTATTAA	TAGTAATCAA	TTACGGGGTC	ATTAGTTCAT	AGCCCATATA	300	
TGGAGTTCCG	CGTTACATAA	CTTACGGTAA	ATGGCCCCGCC	TGGCTGACCG	CCCAACGACC	360	
CCCGCCCAT	GACGTCAATA	ATGACGTATG	TTCCCATAGT	AACGCCAATA	GGGACTTTCC	420	
ATTGACGTCA	ATGGGTGGAG	TATTTACGGT	AAACTGCCCC	CTTGGCAGTA	CATCAAGTGT	480	
ATCATATGCC	AAGTACGCCC	CCTATTGACG	TCAATGACGG	TAAATGGCCC	GCCTGGCATT	540	
ATGCCCAGTA	CATGACCTTA	TGGGACTTTC	CTACTTGCCA	GTACATCTAC	GTATTAGTCA	600	
TCGCTATTAC	CATGGTGATG	CGGTTTTGGC	AGTACATCAA	TGGGCGTGGA	TAGCGGTTTG	660	
ACTCACGGGG	ATTTCCAAGT	CTCCACCCCA	TTGACGTCAA	TGGGAGTTTG	TTTTGGCACC	720	
AAAATCAACG	GGACTTTCCA	AAATGTCGTA	ACAACCTCCG	CCCATTGACG	CAAATGGGCG	780	
GTAGGCGTGT	ACGGTGGGAG	GTCTATATAA	GCAGAGCTCT	CTGGCTAACT	AGAGAACCCA	840	
CTGCTTACTG	GCTTATCGAA	ATTAATACGA	CTCACTATAG	GGAGACCCAA	GCTGGCTAGC	900	
GTTTAAACTT	AAGCTTGCTG	GGAATGAAGA	CAGTGCCTGC	CATGCTTGGG	ACTCCTCGGT	960	BTLA
TATTTAGGGA	ATTCTTCATC	CTCCATCTGG	GCCTCTGGAG	CATCCTTTGT	GAGAAAGCTA	1020	
CTAAGAGGAA	TGATGAAGAG	TGTCCAGTGC	AACTTACTAT	TACGAGGAAT	TCCAAACAGT	1080	
CTGCCAGGAC	AGGAGAGTTA	TTTAAAATTC	AATGTCCTGT	GAAATACTGT	GTTCTATAGAC	1140	
CTAATGTGAC	TTGGTGTAAG	CACAATGGAA	CAATCTGTGT	ACCCCTTGAG	GTTAGCCCTC	1200	
AGCTATACAC	TAGTTGGGAA	GAAAATCAAT	CAGTTCCGGT	TTTTGTTCTC	CACTTTAAAC	1260	
CAATACATCT	CAGTGATAAT	GGGTCGTATA	GCTGTTCTAC	AAACTTCAAT	TCTCAAGTTA	1320	
TTAATAGCCA	TTCAAGTAACC	ATCCATGTGA	CAGAAAGGAC	TCAAAACTCT	TCAGAACACC	1380	
CACTAATAAC	AGTATCTGAC	ATCCAGATG	CCACCAATGC	CTCAGGACCA	TCCACCATGG	1440	
AAGAGAGGCC	AGGGGATCCC	GAGGGTGAGT	ACTAAGCTTC	AGCGCTCCTG	CCTGGACGCA	1500	hIg
TCCCGGCTAT	GCAGCCCCAG	TCCAGGGCAG	CAAGGCAGGC	CCCGTCTGCC	TCTTCACCCG	1560	
GAGCCTCTGC	CCGCCCCACT	CATGCTCAGG	GAGAGGGTCT	TCTGGCTTTT	TCCAGGCTC	1620	
TGGGCAGGCA	CAGGCTAGGT	GCCCCAACC	CAGGCCCTGC	ACACAAAGGG	GCAGGTGCTG	1680	
GGCTCAGACC	TGCCAAGAGC	CATATCCGGG	AGGACCCTGC	CCCTGACCTA	AGCCCACCCC	1740	
AAAGGCCAAA	CTCTCCACTC	CCTCAGCTCG	GACACCTTCT	CTCCTCCCAG	ATTCCAGTAA	1800	
CTCCCAATCT	TCTCTCTGCA	GAGCCCAAAT	CTTGTGACAA	AACTCACACA	TGCCACCCGT	1860	
GCCCAGGTAA	GCCAGCCAG	GCCTCGCCCT	CCAGCTCAAG	GCGGGACAGG	TGCCCTAGAG	1920	
TAGCCTGCAT	CCAGGGACAG	GCCCCAGCCG	GGTGCTGACA	CGTCCACCTC	CATCTCTTCC	1980	
TCAGCACCTG	AACTCCTGGG	GGGACCGTCA	GTCTTCCTCT	TCCCCCAAAA	ACCCAAGGAC	2040	
ACCCTCATGA	TCTCCCGGAC	CCCTGAGGTG	ACATCGGTGG	TGGTGGACGT	GAGCCACGAA	2100	
GACCCTGAGG	TCAAGTTCAA	CTGGTACGTG	GACGGCGTGG	AGGTGCATAA	TGCCAAGACA	2160	
AAGCCGCGGG	AGGAGCAGTA	CAACAGCACG	TACCGGGTGG	TCAGCGTCCT	CACCGTCCTG	2220	
CACCAGGACT	GGCTGAATGG	CAAGGAGTAC	AAGTGCAAGG	TCTCCAACAA	AGCCCTCCCA	2280	
GCCCCATCG	AGAAAACCAT	CTCCAAAGCC	AAAGGTGGGA	CCCGTGGGGT	GCGAGGGCCA	2340	
CATGGACAGA	GGCCGGCTCG	GCCCACCCTC	TGCCCTGAGA	GTGACCGCTG	TACCAACCTC	2400	
TGTCCTACAG	GGCAGCCCCG	AGAACCACAG	GTGTACACCC	TGCCCCATC	CCGGGATGAG	2460	
CTGACCAAGA	ACCAGGTCAG	CCTGACCTGC	CTGGTCAAAG	GCTTCTATCC	CAGCGACATC	2520	
GCCGTGGAGT	GGGAGAGCAA	TGGGCAGCCG	GAGAACAAC	ACAAGACCAC	GCCTCCCGTG	2580	
CTGGACTCCG	ACGGCTCCTT	CTTCCTCTAC	AGCAAGCTCA	CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG	2640	
CAGCAGGGGA	ACGTCTTCTC	ATGCTCCGTG	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA	CCACTACACG	2700	
CAGAAGAGCC	TCTCCCTGTC	TCCGGGTAAA	TGAGTGCGAC	GGCCGCTCGA	GTCTAGAGGG	2760	
CCCGTTTAAA	CCCGCTGATC	AGCCTCGACT	GTGCCTTCTA	GTTGCCAGCC	ATCTGTTGTT	2820	
TGCCCCCTCC	CCGTGCCTTC	CTTGACCCTG	GAAGGTGCCA	CTCCCACTGT	CCTTTCTTAA	2880	
TAAAATGAGG	AAATTGCATC	GCATTGTCTG	AGTAGGTGTC	ATTCTATTCT	GGGGGGTGGG	2940	
GTGGGGCAGG	ACAGCAAGGG	GGAGGATTGG	GAAGACAATA	GCAGGCATGC	TGGGGATGCG	3000	
GTGGGCTCTA	TGGCTTCTGA	GGCGGAAAGA	ACCAGCTGGG	GCTCTAGGGG	GTATCCCCAC	3060	
GCGCCCTGTA	GCGGCGCATT	AAGCGCGGCG	GGTGTGGTGG	TTACGCGCAG	CGTGACCGCT	3120	
ACACTTGCCA	GCGCCCTAGC	GCCCCTCCT	TTCGCTTTCT	TCCCTTCCTT	TCTCGCCACG	3180	

TTCCGCCGGCT	TTCCCCGTCA	AGCTCTAAAT	CGGGGGCTCC	CTTTAGGGTT	CCGATTTAGT	3240
GCTTTACGGC	ACCTCGACCC	CAAAAAACTT	GATTAGGGTG	ATGGTTCACG	TAGTGGGCCA	3300
TCGCCCTGAT	AGACGGTTTT	TCGCCCTTTG	ACGTTGGAGT	CCACGTTCTT	TAATAGTGGA	3360
CTCTTGTTCC	AAACTGGAAC	AACACTCAAC	CCTATCTCGG	TCTATTCTTT	TGATTTATAA	3420
GGGATTTTGC	CGATTTTCGGC	CTATTGGTTA	AAAAATGAGC	TGATTTAACA	AAAATTTAAC	3480
GCGAATTAAT	TCTGTGGAAT	GTGTGTCACT	TAGGGTGTGG	AAAGTCCCCA	GGCTCCCCAG	3540
CAGGCAGAAG	TATGCAAAGC	ATGCATCTCA	ATTAGTCAGC	AACCAGGTGT	GGAAAGTCCC	3600
CAGGCTCCCC	AGCAGGCAGA	AGTATGCAAA	GCATGCATCT	CAATTAGTCA	GCAACCATAG	3660
TCCCCGCCCT	AACTCCGCCC	ATCCCCGCCC	TAACTCCGCC	CAGTTCCGCC	CATTCTCCGC	3720
CCCATGGCTG	ACTAATTTTT	TTTATTTATG	CAGAGGCCGA	GGCCGCCTCT	GCCTCTGAGC	3780
TATTCAGAA	GTAGTGAGGA	GGCTTTTTTG	GAGGCCTAGG	CTTTTGCAAA	AAGCTCCCGG	3840
GAGCTTGAT	ATCCATTTTC	GGATCTGATC	AAGAGACAGG	ATGAGGATCG	TTTCGCATGA	3900
TTGAACAAGA	TGGATTGCAC	GCAGGTTCTC	CGGCCGCTTG	GGTGGAGAGG	CTATTCCGGCT	3960
ATGACTGGGC	ACAACAGACA	ATCGGCTGCT	CTGATGCCGC	CGTGTTCGGG	CTGTCAGCGC	4020
AGGGGCGCCC	GGTTCTTTTT	GTCAAGACCG	ACCTGTCCGG	TGCCCTGAAT	GAAGTGCAGG	4080
ACGAGGCAGC	GCGGCTATCG	TGGCTGGCCA	CGACGGGCGT	TCCTTGCGCA	GCTGTGCTCG	4140
ACGTTGTCAC	TGAAGCGGGA	AGGGACTGGC	TGCTATTGGG	CGAAGTGCCG	GGGCAGGATC	4200
TCCTGTCATC	TCACCTTGCT	CCTGCCGAGA	AAGTATCCAT	CATGGCTGAT	GCAATGCGGC	4260
GGCTGCATAC	GCTTGATCCG	GCTACCTGCC	CATTGACCA	CCAAGCGAAA	CATCGCATCG	4320
AGCGAGCACG	TACTCGGATG	GAAGCCGGTC	TTGTGATCA	GGATGATCTG	GACGAAGAGC	4380
ATCAGGGGCT	CGCGCCAGCC	GAAGTGTTCG	CCAGGCTCAA	GGCGCGCATG	CCCACGCGCG	4440
AGGATCTCGT	CGTGACCCAT	GGCGATGCCT	GCTTGCCGAA	TATCATGGTG	GAAAAATGGCC	4500
GCTTTTCTGG	ATTCATCGAC	TGTGGCCGGC	TGGGTGTGGC	GGACCGCTAT	CAGGACATAG	4560
CGTTGGCTAC	CCGTGATATT	GCTGAAGAGC	TTGGCGGCGA	ATGGGCTGAC	CGCTTCCTCG	4620
TGCTTTACGG	TATCGCCGCT	CCCGATTTCG	AGCGCATCGC	CTTCTATCGC	CTTCTTGACG	4680
AGTTCTTCTG	AGCGGGACTC	TGGGGTTTCG	AATGACCGAC	CAAGCGACGC	CCAACCTGCC	4740
ATCACGAGAT	TTCGATTCCA	CCGCCGCCTT	CTATGAAAGG	TTGGGCTTCG	GAATCGTTTT	4800
CCGGGACGCC	GGCTGGATGA	TCCTCCAGCG	CGGGGATCTC	ATGCTGGAGT	TCTTCGCCCA	4860
CCCCAACTTG	TTTATTGCAG	CTTATAATGG	TTACAAATAA	AGCAATAGCA	TCACAAATTT	4920
CACCAATAAA	GCATTTTTTT	CACCTGCATTC	TAGTTGTGGT	TTGTCCAAAC	TCATCAATGT	4980
ATCTTATCAT	GTCTGTATAC	CGTCGACCTC	TAGCTAGAGC	TTGGCGTAAT	CATGGTCATA	5040
GCTGTTTCT	GTGTGAAATT	GTTATCCGCT	CACAATTCCA	CACAACATAC	GAGCCGGAAG	5100
CATAAAGTGT	AAAGCCTGGG	GTGCCTAATG	AGTGAGCTAA	CTCACATTAA	TTGCGTTGCG	5160
CTCACTGCCC	GCTTTCCAGT	CGGGAAACCT	GTCGTGCCAG	CTGCATTAAT	GAATCGGCCA	5220
ACGCGCGGGG	AGAGGCGGTT	TGCGTATTGG	GCGCTCTTCC	GCTTCCTCGC	TCACTGACTC	5280
GCTGCGCTCG	GTCGTTTCGGC	TGCGGCGAGC	GGTATCAGCT	CACTCAAAGG	CGGTAATACG	5340
GTTATCCACA	GAATCAGGGG	ATAACGCAGG	AAAGAACATG	TGAGCAAAAAG	GCCAGCAAAA	5400
GGCCAGGAAC	CGTAAAAAGG	CCGCGTTGCT	GGCGTTTTTC	CATAGGCTCC	GGCCCCCTGA	5460
CGAGCATCAC	AAAAATCGAC	GCTCAAGTCA	GAGGTGGCGA	AACCCGACAG	GACTATAAAG	5520
ATACCAGGCG	TTTCCCCCTG	GAAGCTCCCT	CGTGCGCTCT	CCTGTTCCGA	CCCTGCCGCT	5580
TACCGGATAC	CTGTCCGCTT	TTCTCCCTTC	GGGAAGCGTG	GCGCTTTCTC	ATAGCTCACG	5640
CTGTAGGTAT	CTCAGTTCGG	TGTAGGTCGT	TCGCTCCAAG	CTGGGCTGTG	TGCACGAACC	5700
CCCCGTTTCA	CCCGACCGCT	GCGCCTTATC	CGGTAACAT	CGTCTTGAGT	CCAACCCGGT	5760
AAGACACGAC	TTATCGCCAC	TGGCAGCAGC	CACTGGTAAC	AGGATTAGCA	GAGCGAGGTA	5820
TGTAGGCGGT	GCTACAGAGT	TCTTGAAGTG	GTGGCCTAAC	TACGGCTACA	CTAGAAGAAC	5880
ATTATTTGGT	ATCTACGCTC	TGCTGAAGCC	AGTTACCTTC	GGAAAAAGAG	TTGGTAGCTC	5940
TTGATCCGGC	AAACAAACCA	CCGCTGGTAG	CGGTTTTTTT	GTTTGCAAGC	AGCAGATTAC	6000
GCGCAGAAAA	AAAGGATCTC	AAGAAGATCC	TTTGATCTTT	TCTACGGGGT	CTGACGCTCA	6060
GTGGAACGAA	AACTCACGTT	AAGGGATTTT	GGTCATGAGA	TTATCAAAAA	GGATCTTCAC	6120
CTAGATCCTT	TTAAATTAAA	AATGAAGTTT	TAAATCAATC	TAAAGTATAT	ATGAGTAAAC	6180
TTGGTCTGAC	AGTTACCAAT	GCTTAATCAG	TGAGGCACCT	ATCTCAGCGA	TCTGTCTATT	6240
TCGTTTCATC	ATAGTTGCCT	GACTCCCCGT	CGTGTAGATA	ACTACGATAC	GGGAGGGCTT	6300
ACCATCTGGC	CCCAGTGCTG	CAATGATACC	GCGAGACCCA	CGCTCACCGG	CTCCAGATTT	6360
ATCAGCAATA	AACCAGCCAG	CCGGAAGGGC	CGAGCGCAGA	AGTGGTCCTG	CAACTTTATC	6420
CGCCTCCATC	CAGTCTATTA	ATTGTTGCCG	GGAAGCTAGA	GTAAGTAGTT	CGCCAGTTAA	6480
TAGTTTGCGC	AACGTTGTTG	CCATTGCTAC	AGGCATCGTG	GTGTCACGCT	CGTCGTTTGG	6540
TATGGCTTCA	TTAGCTCCG	GTTCCCAACG	ATCAAGGCGA	GTTACATGAT	CCCCCATGTT	6600
GTGCAAAAAA	GCGGTTAGCT	CCTTCGGTCC	TCCGATCGTT	GTCAGAAGTA	AGTTGGCCGC	6660
AGTGTTATCA	CTCATGGTTA	TGGCAGCACT	GCATAATTCT	CTTACTGTCA	TGCCATCCGT	6720
AAGATGCTTT	TCTGTGACTG	GTGAGTACTC	AACCAAGTCA	TTCTGAGAAT	AGTGTATGCG	6780
GCGACCGAGT	TGCTCTTGCC	CGGCGTCAAT	ACGGGATAAT	ACCGCGCCAC	ATAGCAGAAC	6840

TTTAAAAGTG	CTCATCATTG	GAAAACGTTC	TTCGGGGCGA	AAACTCTCAA	GGATCTTACC	6900
GCTGTTGAGA	TCCAGTTCGA	TGTAACCCAC	TCGTGCACCC	AACTGATCTT	CAGCATCTTT	6960
TACTTTCACC	AGCGTTTCTG	GGTGAGCAAA	AACAGGAAGG	CAAAATGCCG	CAAAAAAGGG	7020
AATAAGGGCG	ACACGGAAAT	GTTGAATACT	CATACTCTTC	CTTTTTCAAT	ATTATTGAAG	7080
CATTTATCAG	GGTTATTGTC	TCATGAGCGG	ATACATATTT	GAATGTATTT	AGAAAAATAA	7140
ACAAATAGGG	GTTCCGCGCA	CATTTCCCCG	AAAAGTGCCA	CCTGACGTC		7189

Publikationsliste

B. Lepenies, I. Gaworski, S. Tartz, J. Langhorne, B. Fleischer, T. Jacobs: CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal *Plasmodium yoelii* infections. *Microbes Infect.* 2007; 9(6): 687-94.

B. Lepenies, K. Pfeffer, M.A. Hurchla, T.L. Murphy, K.M. Murphy, J. Oetzel, B. Fleischer, T. Jacobs: Ligation of B and T lymphocyte attenuator prevents the genesis of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* 2007; 179(6): 4093-100.

B. Lepenies, J.P. Cramer, G.D. Burchard, H. Wagner, C.J. Kirschning, T. Jacobs: Induction of experimental cerebral malaria is independent of TLR2/4/9. *Med. Microbiol. Immunol.* 2008; 197(1): 39-44.