

**Rolle der regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{Reg}}$ ) im  
Verlauf der experimentellen Infektion mit  
*Plasmodium berghei* (Vinke und Lips, 1948) in der  
Maus (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

**María del Rosario Espinoza Mora**

aus San José, Costa Rica

beim Departement für Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

Hamburg 2010

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. B. FLEISCHER  
Weitere Gutachterin der Dissertation:  
Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS  
Tag der Disputation: 23. April 2010

Hamburg, den 08. April 2010



*A. Temming*  
Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Departments Biologie

## **Widmung**

Meinen Eltern, meinem Bruder,  
meinen Schwiegereltern und meinem Mann

Und meinem akademischen Vater Luis Briceño

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Fleischer möchte ich danken für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Bernhard-Nocht-Institut durchzuführen, ebenso für seine stets freundliche und kompetente Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus danke ich für ihre Bereitschaft diese Arbeit zu Lesen und zu Bewerten.

Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Thomas Jacobs für die Zeit und Mühe die er in die Betreuung meines Projektes investiert hat.

Herrn Prof. Dr. Tim Sparwasser für die Bereitstellung der Mäuse, Herrn Prof. Dr. Volker Heussler für das Bereitstellen der Sporoziten und Herrn Dr. Peter Sebo für die Herstellung der Adenylatzyklasekonstrukte gebührt ein großer Dank.

Prof. Dr. Christian Meyer danke ich für seine stets kritische Beurteilung und seine kompetenten Empfehlungen. Ebenso danke ich Frau Dr. Eva Tolosa, die mir immer mit freundlichem Rat und wertvollen Korrekturen und Vorschlägen zur Seite stand.

Bei Frau Dr. Susanne Tartz auf deren zuvor geleisteten Arbeit diese Arbeit aufbaut, möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Frau Christiane Steeg und Iris Gaworski danke ich für ihre unermüdliche Hilfe im Laboralltag und für das dauerhafte Bemühen eine freundliche und produktive Atmosphäre im Labor zu schaffen.

Auch dem gesamten Personal des Tierhauses danke ich sehr herzlich für ihre Arbeit, welche oft nicht wahrgenommen wird, jedoch die Basis dieser Forschung darstellt.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch an alle meine ehemaligen Kolleginnen und Kollegen richten, insbesondere an Dr. Bernd Lepenies, für sein hervorragendes Beispiel wissenschaftlicher Arbeit, Dr. Angeles Jurado, welche mich wunderbar in das Laborleben eingeführt hat, Rita Ebbeler, nicht nur als ehemalige Kollegin, sondern als besondere Freundin und Anja Heinz, für die schöne Zeit in und außerhalb des Labors.

Bei Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Frau PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich möchte ich mich für die schöne Zeit im Aufbaustudium Molekularbiologie, ihr stets offenes Ohr und für die wertvollen Hinweise bei der Erstellung meiner Arbeit bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, ohne die ich nie die Möglichkeit gehabt hätte diese Arbeit zu erstellen, allen voran Prof. Dr. Luis Fernando Briceño, Prof. Dr. Misael Chinchilla Carmona und Prof. Dr. Marco Vinicio Alvarado.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsliste</b>	<b>X</b>
<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1. Beteiligung von Toleranzinduktion von T-Zell Subpopulationen an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz</b>	<b>1</b>
<b>2. Regulatorische T-Zellen</b>	<b>2</b>
2.1. Arten regulatorischer T- Zellen	2
2.2. Andere T-Zellpopulationen mit suppressiven Eigenschaften	4
2.3. Marker der T <sub>Reg</sub>	4
2.4. Eigenschaften und Wirkung von Foxp3	4
2.5. Suppressive Mechanismen der T <sub>Reg</sub>	6
2.6. Funktionen von T <sub>Reg</sub> in vorangegangenen Studien	7
2.7. Die DEREK Maus als Modell für das <i>in vivo</i> Studium der T <sub>Reg</sub>	9
<b>3. Malaria</b>	<b>10</b>
3.1. Epidemiologie	10
3.2. Lebenszyklus des Malaria Erregers	12
3.3. Erreger der murinen Malaria	15
3.4. Erworbene Immunität gegen Malaria	15
3.5. Pathogenese der <i>Plasmodium falciparum</i> Infektion	17
3.6. Vakzinierung gegen Malaria	19
3.7. ACT-CSP	20
<b>4. Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>II. Materialien und Methoden</b>	<b>24</b>
<b>1. Materialien</b>	<b>24</b>
1.1. Laborgeräte	24
1.2. Plastikwaren	25
1.3. Chemikalien	25
1.4. Reagenzien	25
1.4.1. Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten	25
1.4.2. Reagenzien für biochemische Arbeiten	26
1.4.3. Reagenzien für zellbiologische Arbeiten	26
1.5. Enzyme	26
1.6. Antikörper	26
1.7. Diphtherie Toxin	27
1.8. Medien für eukaryotische Zellen	27
1.9. Puffer	27

1.9.1.	Puffer und Stammlösungen	27
1.9.2.	Puffer und Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten	28
1.9.3.	Puffer und Stammlösungen für biochemische Arbeiten	28
1.9.4.	Puffer und Stammlösungen für zellbiologische Arbeiten	29
1.10.	Peptide	29
1.11.	Mäuse	30
1.12.	Parasiten	30
<b>2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
2.1.	Molekularbiologische Methoden	31
2.1.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.1.2.	Agarosegelelektrophorese	32
2.2.	Zellbiologische Methoden	33
2.2.1.	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur	33
2.2.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	33
2.2.3.	Zellzählung	33
2.2.4.	Präparation muriner Milzzellen	33
2.2.5.	Präparation muriner Leberzellen	34
2.2.6.	Präparation von Zellen aus dem peripheren Blut	34
2.2.7.	Stimulation von murinen Milzzellen	34
2.2.8.	Enzyme-linked immunoasorbent assay (ELISA)	35
2.2.9.	Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT)	36
2.2.10.	Messung der Zellproliferation	37
2.2.11.	Durchflusszytometrische Analysen	38
2.2.12.	Standardwaschschritt für FACS	39
2.2.13.	Pentamer-Färbung	39
2.2.14.	Foxp3 Färbung	39
2.2.15.	Intrazelluläre Zytokinfärbung	40
2.2.16.	Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie	41
2.2.17.	Sortierung eGFP <sup>+</sup> T <sub>Reg</sub>	41
2.2.18.	Sortierung CD8 <sup>+</sup> eGFP <sup>+</sup> T <sub>Reg</sub>	41
2.3.	Tierversuche	42
2.4.	Immunisierung mit ACT-CSP	42
2.5.	Depletion von T <sub>Reg</sub> <i>in vivo</i> mit Diphtherie Toxin (DT)	42
2.6.	Infektion mit <i>P. berghei</i>	42
2.7.	Infektion mit <i>P. yoelii</i> (Py17NL Stamm)	43
2.8.	Blutentnahme und Gewinnung von Serum	43
2.9.	Test zur quantitativen Bestimmung von Transaminasen	43
2.10.	Mouse Inflammation Kit (CBA)	44
2.11.	Statistik	44
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
<b>1.</b>	<b>Kinetik und Funktion der T<sub>Reg</sub> während und nach der Depletion mit DT</b>	<b>45</b>
1.1.	Kinetik der Depletion der T <sub>Reg</sub> in DEREK Mäusen	45
1.2.	Effekte der nach der Depletion neu generierten T <sub>Reg</sub>	47
<b>2.</b>	<b>Depletion der T<sub>Reg</sub> während der Leberphase der Malaria</b>	<b>50</b>
2.1.	Effekte der Depletion der T <sub>Reg</sub> während der „Prime“- Immunisierung	50

2.2.	Effekte der Depletion der T <sub>Reg</sub> auf CSP-spezifische Memory-Antworten	57
2.3.	Effekte der Depletion der T <sub>Reg</sub> in der Immunantwort gegen bestrahlte Sporozoiten von <i>P. berghei</i>	59
2.4.	Effekte der Depletion der T <sub>Reg</sub> während der „Boost“-Immunisierung	60
2.5.	Die Funktion von CTLA4 bei der T-Zellregulation während Immunisierung	61
2.6.	Effekte der Depletion der T <sub>Reg</sub> auf den Verlauf der Infektion nach der Challenge mit <i>P. berghei</i> Sporozoiten	64
<b>3.</b>	<b>Depletion der T<sub>Reg</sub> während der erythrozytären Phase der Malaria</b>	<b>66</b>
3.1.	Verlauf der T <sub>Reg</sub> während einer <i>Plasmodium yoelii</i> Infektion	66
3.2.	Effekte der CD8 <sup>+</sup> T <sub>Reg</sub> bei der T-Zellregulation im Verlauf der Blutphase der Malaria	68
3.3.	Einfluss der Depletion der T <sub>Reg</sub> auf klinische Parameter im Verlauf der Blutphase der Malaria	69
3.4.	Die Depletion der T <sub>Reg</sub> im Verlauf einer Infektion mit <i>P. yoelii</i> 17XNL führt zu einer gesteigerten Zytokinproduktion	71
3.5.	Regulatorische T-Zellen sind nicht für die IL-10-Produktion im Verlauf der <i>P. yoelii</i> 17XNL Infektion verantwortlich	72
3.6.	Verstärkte T-Zellaktivierung nach der Depletion der T <sub>Reg</sub>	74
3.7.	Effekte einer verlängerten Depletion der T <sub>Reg</sub> auf die Parasitämie	75
3.8.	Depletion der T <sub>Reg</sub> vor der Infektion	76
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
1.	Das Dereg Mausmodell	77
2.	Depletion der T <sub>Reg</sub> als Therapie für Erkrankungen	79
3.	ACT-CSP als Impfmodell	80
4.	Die Depletion der T <sub>Reg</sub> während der Immunisierung mit ACT-CSP verbesserte die spezifische T-Zellantwort	83
5.	CTLA4-Blockade während der Immunisierung mit ACT-CSP hat nicht den gleichen Effekt wie eine Depletion der T <sub>Reg</sub>	87
6.	Effekte der Depletion der T <sub>Reg</sub> bei der Immunantwort gegen bestrahlte Sporozoiten	88
7.	<i>P. yoelii</i> als Modell für die Immunregulation im Verlauf der Blutphase der Malaria	89
8.	Die Depletion der T <sub>Reg</sub> verbesserte die Immunantwort während der Blutphase einer <i>P. yoelii</i> Infektion, aber verstärkte deren Pathologie	90
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>VI.</b>	<b>Literatur</b>	<b>94</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Seite 11**      Abbildung 1  
Malariatote pro 1000 Einwohner pro Jahr (WHO, World Malaria Report 2008)
- Seite 14**      Abbildung 2  
Zyklus der Malariaparasiten (Modifiziert nach Public Health Image Library, CDC, 2006)
- Seite 22**      Abbildung 3  
ACT-CSP
- Seite 46**      Abbildung 4  
Kinetik der  $T_{\text{Reg}}$  während und nach der Depletion mit DT
- Seite 48**      Abbildung 5  
Nach der Depletion neugenerierte  $T_{\text{Reg}}$  ( $ngT_{\text{Reg}}$ ) sind funktionell
- Seite 49**      Abbildung 6  
Supprimierung der Proliferation der  $T_{\text{Eff}}$  und ihrer IL-2 Produktion durch  $ngT_{\text{Reg}}$
- Seite 51**      Abbildung 7  
Depletion der  $T_{\text{Reg}}$  während der „Prime“ Immunisierung mit ACT-CSP
- Seite 52**      Abbildung 8  
Durchflusszytometrische Analyse CSP-spezifischer T-Zellen
- Seite 54**      Abbildung 9  
Gesteigerte Aktivierung der  $CD8^+$  T-Zellen nach der Depletion der  $T_{\text{Reg}}$
- Seite 55**      Abbildung 10  
Durchflusszytometrische Analyse wies eine CSP-spezifische  $CD8^+$   $T_{\text{Reg}}$  Population auf
- Seite 56**      Abbildung 11  
Einfluss der Depletion der  $T_{\text{Reg}}$  auf die Zytokinproduktion von CSP-spezifischen T-Zellen
- Seite 57**      Abbildung 12  
Persistenz der Immunantwort trotz Normalisierung der Anzahl der  $T_{\text{Reg}}$  nach der Depletion

- Seite 58**      Abbildung 13  
Depletion der  $T_{Reg}$  hat die Memory-T-Zellantwort nach Immunisierung mit ACT-CSP nicht verbessert
- Seite 59**      Abbildung 14  
Depletion der  $T_{Reg}$  während der Immunisierung mit bestrahlten Sporozoiten von *P. berghei*
- Seite 60**      Abbildung 15  
Effekte der Depletion der  $T_{Reg}$  während der „Boost“-Immunisierung mit ACT-CSP
- Seite 61**      Abbildung 16  
Effekte der Depletion der  $T_{Reg}$  während der „Prime“- und der „Boost“-Immunisierung mit ACT-CSP
- Seite 63**      Abbildung 17  
CTLA4-Blockade im Vergleich zu Depletion der  $T_{Reg}$  während der Immunisierung mit ACT-CSP
- Seite 65**      Abbildung 18  
Parasitämien nach Infektion mit *P. berghei* Sporozoiten
- Seite 66**      Abbildung 19  
Verlauf der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL Stamm in C57Bl/6 Mäusen
- Seite 67**      Abbildung 20  
Kinetik der  $T_{Reg}$  im Verlauf einer Infektion mit *P. yoelii* 17XNL Stamm
- Seite 68**      Abbildung 21  
Die Infektion mit *P. yoelii* induziert Generation  $CD8^+ T_{Reg}$
- Seite 69**      Abbildung 22  
 $CD8^+ T_{Reg}$  zeigen suppressive Funktionen *ex vivo*
- Seite 70**      Abbildung 23  
Effekt der Depletion der  $T_{Reg}$  im Verlauf der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL
- Seite 71**      Abbildung 24  
Einfluss der Depletion der  $T_{Reg}$  auf den klinischen Verlauf der *P. yoelii*-Infektion

- Seite 72**      Abbildung 25  
Gesteigerte Zytokinproduktion nach der Depletion der T<sub>Reg</sub> im Verlauf einer Infektion mit *P. yoelii*
- Seite 73**      Abbildung 26  
CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzieren IL-10 während einer *P. yoelii*-Infektion
- Seite 74**      Abbildung 27  
Gesteigerte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Depletion der T<sub>Reg</sub>
- Seite 75**      Abbildung 28  
Verlauf der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL Stamm bei verlängerter Depletion der T<sub>Reg</sub>
- Seite 76**      Abbildung 29  
Effekt der Depletion der T<sub>Reg</sub> vor der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL

## Abkürzungsliste

<b>4F10</b>	Hybridom 4F10 (anti-CTLA4-Antikörper)
<b>%</b>	Prozent, von Hundert
<b>°C</b>	Grad Celcius, SI-Einheit für Temperatur
<b><math>\alpha</math>M<math>\beta</math>2</b>	Integrin
<b><math>\gamma</math><math>\delta</math>-T-Zelle</b>	T-Zellsubtyp (TCR $\gamma$ $\delta$ )
<b>A, C, G, T</b>	Adenin, Cytosin, Guanin, Tyrosin
<b>A<sub>2A</sub>R</b>	Adenosin Rezeptor 2A
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACT</b>	<i>B. pertussis adenylatcyclase</i>
<b>ADCC</b>	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
<b>AICD</b>	Aktivierungs-induzierter Zelltod ( <i>activation induced cell death</i> )
<b>ALT</b>	Alaninaminotransferase (GPT)
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>ANKA</b>	<i>Plasmodium berghei</i> Stamm
<b>APC</b>	Allophycocyanin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>APZ</b>	Antigenpräsentierende Zelle
<b>AST</b>	Aspartataminotrasferase (GOT)
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>B.</b>	<i>Bordetella</i>
<b>B7-Molekülen</b>	CD80 und CD86
<b>BAC</b>	<i>bacterial artificial chromosome</i>
<b>Balb/c</b>	Labormauslinie
<b>„Boost“</b>	Sekundärimmunisierung
<b>bp, kb</b>	Basenpaare, Kilobasenpaare
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>BTLA</b>	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
<b>bZIP</b>	<i>Basic Leucine Zipper Domain</i>
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>cAMP</b>	Zyklisches Adenosinmonophosphat ( <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
<b>C57Bl/6</b>	C57 Black 6, Labormauslinie
<b>CBA</b>	<i>cytokine bead array</i> (durchflusszytometrisches Verfahren der der Zytokinmessung)
<b>CD</b>	Nomenklatur für Oberflächenantigene ( <i>cluster of differentiation</i> )
<b>CD25</b>	$\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors
<b>CD62L</b>	L-selectin
<b>CD152</b>	CTLA4
<b>CD223</b>	LAG3 ( <i>lymphocyte-activation gene 3</i> )
<b>cm, mm, <math>\mu</math>m, nm</b>	Zenti-, Milli-, Mikro, Nanometer

<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>cpm</b>	Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
<b>CR4</b>	<i>complement receptor 4</i>
<b>CSP</b>	<i>circumsporozoite protein</i>
<b>CTL</b>	zytotoxischer T-Lymphozyt (cytotoxic T lymphocyte)
<b>CTLA4</b>	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CD152)
<b>d (A, C, G, T)TP</b>	Desoxyadenosin-, Desoxycytosin-, Desoxyguanosin-, Desoxythymidin-Triphosphat
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DC</b>	dendritische Zelle
<b>DEREG</b>	<i>depletion of regulatory T cells</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTP</b>	Desoxyribonucleotid-Triphosphat
<b>DR5</b>	<i>death receptor 5</i>
<b>DT</b>	Diphtherie Toxin ( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> )
<b>DTR</b>	<i>diphtheria toxin receptor</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EF-2</b>	<i>elongation factor-2</i>
<b>eGFP</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<b>ELAM-1</b>	<i>endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
<b>ELISPOT</b>	<i>Enzyme-linked immunospot assay</i>
<b>et al.</b>	<i>et alli</i>
<b>F1</b>	Folgegeneration 1
<b>FACS</b>	Fluoreszenzaktivierter Zell-Sortierer ( <i>fluorescence activated cell scanning</i> )
<b>Fas</b>	Fas-Rezeptor
<b>FasL</b>	<i>Fas-ligand</i> (Ligand des Fas-Rezeptors)
<b>Fc</b>	fraction crystallizable
<b>FCS</b>	fötale Kälberserum (fetal calf serum)
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
<b>Foxp3</b>	<i>forkhead/winged helix transcription factor 3; forkhead box protein p3</i>
<b>FSC</b>	Vorwärtsstreulicht (forward scatter) im Durchflusszytometer
<b>g</b>	Erdbeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
<b>g, mg, µg, ng, fg</b>	Gramm, Milli-, Mikro-, Nano-, Femtogramm
<b>GITR</b>	<i>glucocorticoid-induced TNFl like receptor</i>
<b>GM</b>	Monosialotetrahexosylgangliosid
<b>GOT</b>	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (AST)
<b>GPI</b>	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
<b>GPT</b>	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (ALT)
<b>GVHD</b>	<i>graft versus host disease</i>

<b>h, min, s</b>	Stunde, Minute, Sekunde
<b>HbF</b>	fötales Hemoglobin
<b>HCV</b>	Hepatitis C Virus
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz Virus
<b>HLA</b>	<i>human leucocyte antigen</i>
<b>HRP</b>	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>ICAM-1</b>	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
<b>ICOS</b>	<i>inducible costimulator</i>
<b>IDO</b>	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<i>interferon gamma</i>
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IgG</b>	Immunglobulin G; häufigster Isotyp im Blut; Verwendung für Kontrollfärbungen zur Ermittlung der unspezifischer Bindung von monoklonalen Antikörpern
<b>IgG<math>\kappa</math></b>	Immunglobulin G Typ kappa <i>light-chain</i> Antikörper
<b>IL</b>	Interleukin
<b>iNOS</b>	induzierbare NO-Synthase
<b>IPEX</b>	<i>immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome</i>
<b>IR</b>	Infrarot
<b>kBq</b>	Kilobecquerel
<b>kD</b>	Kilodalton
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KO</b>	knock out
<b>LAG3</b>	<i>lymphocyte-activation gene 3</i> (CD223)
<b>LFA-1</b>	funktionelles Leukozytenantigen (Adhäsionsmolekül von T-Zellen)
<b>LSA-1</b>	<i>liver stage antigen-1</i> (TRAP)
<b>M, mM, <math>\mu</math>M</b>	Molarität, Milli- und Mikromolarität
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>MHC-I</b>	MHC-Klasse-I-Komplex
<b>MHC-II</b>	MHC-Klasse-II-Komplex
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>MSP1</b>	<i>major surface protein 1</i>
<b>MSP2</b>	<i>major surface protein 2</i>
<b>n</b>	Anzahl
<b>NAD</b>	Nikotinamidadenindinukleotid
<b>NFAT</b>	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
<b>NK-Zelle</b>	natürliche Killerzelle
<b>NKT-Zelle</b>	Zelle mit Eigenschaften von natürlichen Killerzellen und T-Zellen

<b>NL</b>	nichtletal
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NRP1</b>	<i>neuropilin 1</i>
<b>iT<sub>Reg</sub></b>	induzierte regulatorische T-Zelle
<b>ngT<sub>Reg</sub></b>	neu generierte regulatorische T-Zelle
<b>nT<sub>Reg</sub></b>	natürliche regulatorische T-Zelle
<b>OT</b>	Ovalbumin-transgen
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>p</b>	p-Wert
<b>P.</b>	<i>Plasmodium</i>
<b>p25</b>	<i>protein 25</i>
<b>p28</b>	<i>protein 28</i>
<b>p.i.</b>	<i>post infection</i> : nach der Infektion
<b>PAMP</b>	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster ( <i>pathogen associated molecular pattern</i> )
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PE</b>	Phycoerythrin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
<b>PerCP</b>	Peridin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PfEMP1</b>	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
<b>pH</b>	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>
<b>PMA</b>	<i>Phorbolmyristateacetate</i>
<b>„Prime“</b>	Primärimmunisierung
<b>PRR</b>	Rezeptor für PAMP ( <i>pattern recognition receptor</i> )
<b><i>P. yoelii</i> 17XNL</b>	nichtletaler <i>Plasmodium yoelii</i> -Stamm
<b>RB</b>	
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
<b>RT</b>	reverse Transkription
<b>RTS,S/ASO2A</b>	experimentelle Impfstoff gegen Malaria in präerythrozytärem Stadium
<b>RTX</b>	<i>repeats in toxin</i> (Proteinfamilie)
<b>SALSA</b>	<i>sporozoite- and liver-stage antigen</i>
<b>SCID</b>	<i>Severe combined immune deficiency</i>
<b>sfu</b>	<i>spot forming unit</i>
<b>SI</b>	Internationales Einheitensystem ( <i>Système international d'unités</i> )
<b>SIINFEKL</b>	synthetisches Peptid aus OVA mit der Sequenz Ser-Iso-Iso-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu
<b>SSC</b>	Seitwärtsstreulicht ( <i>side scatter</i> ) im Durchflusszytometer
<b>SSP<sub>2</sub></b>	<i>sporozoite surface protein 2</i>
<b>STRAP</b>	<i>sporozoite threonine-and asparagine-rich protein</i>

<b>SYIPSAEKI</b>	synthetisches Peptid aus CSP mit der Sequenz Ser-Try-Iso-Pro-Ser-Ala-Glu-Lys-Iso
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA Puffer
<b>Taq</b>	<i>Thermus acuaticus</i>
<b>TBE-Puffer</b>	Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
<b>TCM</b>	Zentrale-Memory-T-Zelle
<b>TCR</b>	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
<b>TCR<math>\alpha\beta</math></b>	T-Zell-Rezeptor bestehend aus $\alpha$ und $\beta$ Kette (häufiger TCR-Typ)
<b>TCR<math>\gamma\delta</math></b>	T-Zell-Rezeptor bestehend aus $\gamma$ und $\delta$ Kette (seltener TCR-Typ)
<b>T<sub>Eff</sub></b>	T-Effektorzelle
<b>TEM</b>	Effektor-Memory-T-Zelle
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<i>transforming growth factor beta</i>
<b>Th</b>	T-Helfer-Zelle
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
<b>Tr1</b>	regulatorische T-Zelle Typ 1
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
<b>TRAP</b>	<i>thrombospondin-related adhesive protein</i> (LSA-1)
<b>T<sub>Reg</sub></b>	Regulatorische T-Zelle
<b>Tris</b>	Hydroxymethylaminomethan
<b>TRPC5</b>	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5</i>
<b>TSDR</b>	<i>Treg specific demethylation region</i>
<b>U</b>	Unit: Einheit der Enzymaktivität
<b>UR</b>	<i>upper right quadrant</i> (Rechter oberer Quadrant in einem Dotplot)
<b>UV</b>	ultraviolettes Licht
<b>VIS</b>	sichtbare Anteil des Licht
<b>VCAM-1</b>	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
<b>WHO</b>	Welt-Gesundheitsorganisation
<b>WT</b>	Wildtyp
<b><math>\mu</math>Ci</b>	Mikrocurie ( $3,7 \times 10^7$ Zerfälle pro s; $1\mu\text{Ci} = 37 \text{ kBq}$ )

## Abkürzungen der Aminosäuren

Alanin	<b>A</b>	<b>Ala</b>
Arginin	<b>R</b>	<b>Arg</b>
Asparagin	<b>N</b>	<b>Asn</b>
Asparaginsäure	<b>D</b>	<b>Asp</b>
Cystein	<b>C</b>	<b>Cys</b>
Glutamin	<b>Q</b>	<b>Gln</b>
Glutaminsäure	<b>E</b>	<b>Glu</b>
Glycin	<b>G</b>	<b>Gly</b>
Isoleucin	<b>I</b>	<b>Iso</b>
Histidin	<b>H</b>	<b>His</b>
Leucin	<b>L</b>	<b>Leu</b>
Lysin	<b>K</b>	<b>Lys</b>
Methionin	<b>M</b>	<b>Met</b>
Phenylalanin	<b>F</b>	<b>Phe</b>
Prolin	<b>P</b>	<b>Pro</b>
Serin	<b>S</b>	<b>Ser</b>
Threonin	<b>T</b>	<b>Thr</b>
Tryptophan	<b>W</b>	<b>Try</b>
Tyrosin	<b>Y</b>	<b>Tyr</b>
Valin	<b>V</b>	<b>Val</b>

## SI-Präfixe

Y	Yotta	$10^{24}$
Z	Zetta	$10^{21}$
E	Exa	$10^{18}$
P	Peta	$10^{15}$
T	Tera	$10^{12}$
G	Giga	$10^9$
M	Mega	$10^6$
k	Kilo	$10^3$
h	Hekto	$10^2$
da	Deka	$10^1$
d	Dezi	$10^{-1}$
c	Zenti	$10^{-2}$
m	Milli	$10^{-3}$
$\mu$	Mikro	$10^{-6}$
n	Nano	$10^{-9}$
p	Piko	$10^{-12}$
f	Femto	$10^{-15}$
a	Atto	$10^{-18}$
z	Zepto	$10^{-21}$
y	Yokto	$10^{-24}$

# I. Einleitung

## 1. Beteiligung von Toleranzinduktion von T-Zell Subpopulationen an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor Schädigung. Die Grundlagen dieser Funktion sind die Unterscheidung zwischen Fremd und Eigen und die Unterscheidung zwischen funktionellen und entarteten bzw. seneszenten Zellen, welche aufgrund interner Alterungs- und Mutationsprozesse entstehen (Vollmar und Dingermann, 2005).

Die Eliminierung der externen Angriffe, wie beispielsweise durch Bakterien, Viren und Parasiten ebenso wie der, aufgrund beispielsweise durch interne Alterungs- oder Mutationsprozesse entstandenen, veränderten Zellen ist die wichtigste Funktion des Immunsystems.

Das Prinzip selektiver Fremd- und Eigen-Erkennung durch das Immunsystem beruht vorwiegend auf der zentralen Deletion potenziell autoimmunreaktiver T-Zell-Klone im Thymus in der frühen postnatalen Entwicklung. Es ist jedoch bekannt, dass dieser Prozess nicht ausreichend ist, um jegliche Sensitivität des Immunsystems gegenüber Selbstantigenen zu unterbinden (Andersen *et al.*, 2003). Mehrere Studien haben die Präsenz autoimmunreaktiver T-Zell-Klone im peripheren Blut gesunder Individuen nachgewiesen (Filion *et al.*, 1996; Andreassen *et al.*, 2002; Hellings *et al.*, 2001). Die Präsenz potenziell autoimmunreaktiver T-Zell-Klone scheint daher *per se* nicht pathologisch zu sein. *In vitro* Daten und klinische Daten sprechen dafür, dass in gesunden Individuen periphere autoimmunreaktive T-Zell-Klone unter der permanenten Überwachung durch periphere Toleranzinduktionsmechanismen stehen (Martin, *et al.*, 1990; Pelfrey *et al.*, 1996).

Das Konzept einer lymphozytenvermittelten Immunsuppression basiert auf der Erkenntnis, dass immunologische Toleranz in naiven Tieren durch den Transfer von antigenstimulierten T-Lymphozyten induziert werden kann (Gershon *et al.*, 1970; Kilshaw *et al.*, 1975). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Existenz immunregulatorischer T-Zellen postuliert (Katz, *et al.* 1972). Später konnte gezeigt werden, dass Mäuse, welchen am dritten Lebenstag der Thymus entfernt wurde, an einem schweren Polyautoimmunsyndrom erkrankten (Kojima *et al.*, 1981). Bei einer späteren Thymektomie wurde jedoch kein Polyautoimmunsyndrom

beobachtet. In einer weiteren Arbeit konnte diese Beobachtung dem Fehlen regulatorischer T-Zellen in den thymektomierten Mäusen zugeordnet werden, da sich durch die Gabe von regulatorischen T-Zellen die Entstehung eines Polyautoimmunsyndroms bei früh thymektomierten Mäusen verhindern ließ (Asano *et al.*, 1996).

Die meisten bisher beschriebenen lymphozytären Suppressorpopulationen weisen eine fehlende Antigenspezifität bei der Ausübung ihrer Suppressorfunktion auf (Thornton und Shevach, 2000). Es ist aber davon auszugehen, dass antigenspezifische regulatorische T-Zellen an der Induktion peripherer Toleranz beteiligt sind. Kürzlich wurde gezeigt, dass regulatorische T-Zellen ( $T_{Reg}$ ) zumindest während der Schwangerschaft antigenspezifisch wirken können (Zenclussen *et al.*, 2010). Die Suche nach Antigen-spezifischen Regulatorzellen ist von großer Bedeutung für das Verständnis und die Entwicklung neuer Therapieansätze für Autoimmunerkrankungen, Fremdorgan- und Stammzelltransplantation, Infektionen und Tumoren (Li *et al.*, 2009).

## 2. Regulatorische T-Zellen

### 2.1. Arten regulatorischer T-Zellen

In den neunziger Jahren wurde erstmals die Funktion von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen durch Sakaguchi *et al.* in der Maus beschrieben (Sakaguchi *et al.*, 1995). Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur ein geringes Proliferationspotenzial haben, unabhängig davon ob sie spezifisch oder unspezifisch stimuliert werden. Diese Zellen können in, im Thymus gereifte, „natürliche  $T_{Reg}$ “ ( $nT_{Reg}$ ), welche 5-10% der  $CD4^+$  T-Zellen in lymphoiden Organen ausmachen, und in peripher „induzierte  $T_{Reg}$ “ ( $iT_{Reg}$ ) eingeteilt werden (Becker *et al.*, 2006). Auch im Menschen wurde gezeigt, dass  $T_{Reg}$  suppressorische Funktion haben (Dieckmann *et al.*, 2001; Duggan *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2001). Beide  $T_{Reg}$ -Populationen exprimieren den Transkriptionsfaktor „forkhead box“ Protein p3 (Foxp3), das zur Induktion des regulatorischen Phänotyps in  $T_{Reg}$  führt (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003).

Die im Thymus gereiften  $nT_{Reg}$  können die Proliferation anderer  $CD4^+$  T-Zellen durch Suppression über Zytokine oder kontaktabhängige Mechanismen stark hemmen (Sakaguchi, 2000).  $nT_{Reg}$  sind auch für die Induktion der peripheren Toleranz notwendig (Schwartz, 2005; Sakaguchi, 2005).

$iT_{Reg}$  werden aus  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen gebildet. TGF $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ ) und

Retinsäure spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion der  $iT_{Reg}$ . In murinen und humanen naiven T-Zellen konnte *in vitro* festgestellt werden, dass die Zugabe von TGF $\beta$  Foxp3 in diese Zellen induziert (Chen *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2007).

Neben TGF $\beta$  spielen auch andere Zytokine bei der peripheren Induktion der Toleranz eine wichtige Rolle. Adaptiven Typ 1 regulatorische T-Zellen ( $CD4^+$  Foxp3 $^-$  Tr1-Zellen) werden peripher aus naiven T-Zellen in der Anwesenheit von hohen Mengen an IL-10 und einem Antigenstimulus induziert. Sie produzieren IL-10 und TGF $\beta$  in großer Menge, nur wenig IL-2, IL-5 und IFN $\gamma$ , aber kein IL-4 (Groux *et al.*, 1997; Roncarolo *et al.*, 2006; Shevach, 2006). IL-10 gilt als eines der wichtigsten Zytokine regulatorischer T-Zellen und ist für verschiedene Inhibitionsmechanismen verantwortlich (Akdis und Blaser, 2001; Miura *et al.*, 2002).

Die regulatorischen T-Zellen Typ 1 (Tr1) sind an der Toleranzinduktion in Schleimhäuten beteiligt. Im Tierversuch wurde gezeigt, dass die Applikation von Tr1-Zellen in immundefizienten Mäusen eine durch  $CD4^+$   $CD45RB^{high}$  T-Zellen verursachte Kolitis verhindern kann (Barnes und Powrie, 2009).  $CD4^+CD45RB^{high}$  T-Zellen sind wichtig für die Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*, IBD), da dies aktivierte Zellen sind, die mehr proinflammatorische Zytokine (z. B. TNF $\alpha$ ) als die  $CD4^+CD45RB^{low}$  T-Zellen produzieren (Morrissey und Charrier, 1994; Claesson *et al.*, 1999; Ten Hove *et al.*, 2004).

Der Transfer von  $CD4^+$   $CD45RB^{high}$  T-Zellen aus Wildtyp Mäusen in immunodefiziente RAG- (*recombination activating gene-2 -/-*) -Mäuse oder SCID-Mäuse (*severe combined immunodeficiency*; schwerer kombinierter Immundefekt) verursachte eine spontane und schwere chronische Kolitis (Leach *et al.*, 1996; Bouma und Strober, 2003). In diesem Modell führte die Applikation von Tr1 Zellen zur Inhibition der Proliferation von  $CD4^+$  T-Effektorzellen (Akdis und Blaser, 2001; Uhlig *et al.*, 2006).

Für die Regulation der Immunantwort spielen auch antigenspezifische  $CD4^+$  Foxp3 $^+$  Th3-Zellen eine Rolle. Sie produzieren hauptsächlich TGF $\beta$  und IL-10, welche Th1- und Th2-Zellen inhibieren können (Carrier *et al.*, 2007). Th3-Zellen können im Rahmen der oralen Toleranz durch Applikation von Antigen via oral *in vivo* induziert werden (Weiner, 2001). Th3-Zellen können aus konventionellen T-Zellen nach der Stimulierung mit TGF $\beta$ , IL-4 und IL-10 in Abwesenheit von IL-12 in Zellkultur generiert werden (Becker *et al.*, 2006).

Ein weiterer Subtyp der suppressiven Zellen sind  $CD8^+$   $CD28^+$  Foxp3 $^+$  T-Zellen. Sie haben nur schwache zytotoxische und proliferative Eigenschaften und produzieren, ebenso wie Tr1-

Zellen, IL-10 und werden durch CD40-Ligand-stimulierte plasmazytoide Zellen (dendritic cell type 2 (DC2)) aktiviert (Gilliet und Liu, 2002). Ihre Induktion ist von TGF $\beta$  und IL-10 abhängig (Zozulya und Wiendl, 2008).

## 2.2. Andere T-Zellpopulationen mit suppressiven Eigenschaften

Des Weiteren existieren T-Zellen, welche auch ohne Foxp3 zu exprimieren, Zielzellen supprimieren können (Tran *et al.*, 2007).

Es wurden in verschiedenen Studien hochspezifische Zellen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben. Eine dieser beschriebenen Zellen sind IL-10 sezernierende HLA-G<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche an der Toleranz des Fötus beteiligt sind (Paul, 2008).

Auch CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen sind ein Subtyp der suppressiven Zellen, ihnen fehlen die für die Aktivierung benötigten Korezeptoren CD4 und CD8. Außergewöhnlich an den diesen T-Zellen ist, dass sie bestimmte Zellen lysieren können und dadurch autoreaktive Klone beseitigen können (Vincent *et al.*, 1996; Schilbach *et al.*, 2000).

## 2.3. Marker der T<sub>Reg</sub>

Ein Oberflächenmarker, der spezifisch für T<sub>Reg</sub> ist, wurde bisher noch nicht identifiziert. In den ersten Jahren nach der Entdeckung der T<sub>Reg</sub> wurde als Marker primär das CD25 Molekül ( $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors) verwendet (Sakaguchi, 2000). Dies ist jedoch nur bedingt geeignet, da es als Teil des IL-2-Rezeptors nicht nur auf den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> exprimiert wird, sondern auch auf der Oberfläche nichtregulatorischer T-Zellen nach einer Aktivierung induziert wird. Andere Marker der T<sub>Reg</sub> sind CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), GITR (*glucocorticoid induced tumor necrosis factor like receptor*), CD223 oder LAG3 (*lymphocyte activation gene 3*) und NRP1 (*neuropilin 1*). Allerdings sind auch diese Marker nicht für T<sub>Reg</sub> spezifisch. Der momentan am meisten verwendete Marker für murine T<sub>Reg</sub> ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead/winged helix transcription factor; forkhead box protein p3*) (Zozulya und Wiendl, 2008).

## 2.4. Eigenschaften und Wirkung von Foxp3

Foxp3 besteht aus 431 Aminosäuren und gehört zur Familie der „forkhead“ (FKH) Transkriptionsfaktoren. Bei Foxp3 handelt es sich um einen intrazellulären Marker, aufgrund

dessen sind nur quantifizierende, jedoch keine funktionellen Studien möglich (Lahl *et al.*, 2007). Das Gen des FoxP3-Transkriptionsfaktors ist auf dem X-Chromosom an der Stelle Xp11.23 lokalisiert (Ziegler, 2006; Brunkow *et al.*, 2001). Foxp3 besitzt eine „forkhead“-DNA-Bindungsdomäne, eine Repressordomäne, eine bZIP (*Basic Leucine Zipper Domain*)-Domäne und eine Zinkfingerdomäne (Ziegler, 2006). Für eine stabile Expression von Foxp3 ist eine komplette Demethylierung in der TSDR-Region (*Treg specific demethylation region*) des Foxp3 Genes notwendig (Floess *et al.*, 2007; Baron *et al.*, 2007).

Foxp3 transloziert in den Nukleus der T-Zellen und bindet die DNA. Hier hat es, teilweise in Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells*), repressive Funktion bei der Genregulation und der Gentranskription (Schubert *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006). Die Zielgene, welche durch Foxp3 beeinflusst werden, haben alle wichtige Funktionen bei der T-Zellaktivierung, wie beispielsweise IL-2, IFN $\gamma$ , NRP1 und ICOS (*inducible costimulator*). Andererseits kann Foxp3 auch als Aktivator agieren, z. B. für die Gene von CD25, CD103 und CTLA4 (Marson *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007).

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass Foxp3 zur Induktion des regulatorischen Phänotyps in T<sub>Reg</sub> führt (Gavin *et al.*, 2007). Ein Mangel an Foxp3 verursacht in den männlichen Tieren einen schweren, nach 3-4 Wochen letalen, lymphproliferativen Phänotyp, der unter dem Namen „*scurfy*“ (*scaly or shredded dry skin*) bekannt ist (Morgan *et al.*, 2005). In diesen Tieren kann eine Überproliferation an CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen und ein Mangel an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen beobachtet werden. Durch einen adaptiven Transfer CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtyp Tieren konnte der Phänotyp partiell verhindert werden (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003).

Im Menschen wird durch eine Mutation im Foxp3-Gen das IPEX-Syndrom (*immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome*), eine schwere Autoimmunkrankheit, ausgelöst, für das die „*scurfy*“-Mäuse als Modell verwendet werden (Wildin *et al.*, 2001). Bisher konnten 20 Mutationen im Foxp3 Gen identifiziert werden, welche für das IPEX-Syndrom verantwortlich gemacht werden. Anders als im „*scurfy*“-Mausmodell kommt es in Patienten nicht zwingend zu einer verringerten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> Population, jedoch grundsätzlich zu einem funktionellen Defizit in der suppressiven Fähigkeit und der Foxp3 Expression in T<sub>Reg</sub> (Bennett *et al.*, 2001; Bacchetta *et al.*, 2006).

Dies deutet auf eine vergleichbare Funktion von Foxp3 im humanen Organismus hin, jedoch wird dies eingeschränkt durch die Beobachtung, dass eine Induktion von Foxp3 durch TGF $\beta$  in humanen T-Zellen nicht zwingend einen regulatorischen Phänotyp hervorruft (Rao *et al.*, 2005). Auch wenn Foxp3 für die Entstehung und Funktion humaner T<sub>Reg</sub> notwendig zu sein scheint, ist Foxp3 ebenso in einer signifikanten Population aktivierter T-Zellen transient exprimiert, ohne dass diese eine regulatorische Aktivität aufweisen (Morgan *et al.*, 2005; Gavin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Folglich reicht die Expression von Foxp3 alleine nicht für die Generierung suppressiver T<sub>Reg</sub> aus und stellt damit auch keinen geeigneten Marker für humane T<sub>Reg</sub> dar (Vignali *et al.*, 2008).

## 2.5. Suppressiv Mechanismen der T<sub>Reg</sub>

Über die Mechanismen, welche der suppressiven Wirkung der T<sub>Reg</sub> zugrunde liegen, ist bis heute nur wenig bekannt. T<sub>Reg</sub> können über verschiedene Mechanismen T<sub>Eff</sub> inhibieren und üben auch inhibitorische Funktionen über DC aus. Zum jetzigen Zeitpunkt ist nur bekannt, dass für die Einleitung der inhibierenden Funktion der T<sub>Reg</sub> ein direkter Kontakt zwischen Zellen notwendig ist (Nakamura *et al.*, 2001) und inhibitorische Zytokine, wie beispielsweise IL-10 und TGF $\beta$ , beteiligt sind. Hierbei widersprechen sich die Ergebnisse von *in vivo* und *in vitro* Studien. Die Ergebnisse aus *in vivo* Studien, in denen IL-10 und TGF $\beta$  blockierende Antikörper eine Verminderung der Suppression bewirkt haben, legen nahe, dass diese inhibitorischen Zytokine für den Suppressionsmechanismus von entscheidender Rolle sind (Mason und Powrie, 1998; Shevach *et al.*, 2001). *In vitro* Studien mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-10 und TGF $\beta$  führten jedoch zu einem konträren Ergebnis. In diesen Studien wurde die, durch den direkten Zellkontakt ausgelöste Supprimierung, durch die genannten Antikörper nicht beeinträchtigt (O'Garra und Vieira, 2004).

Besonders wichtig für die inhibitorische Funktion der T<sub>Reg</sub> über DC ist LAG3, ein CD4-Homolog, der das *major histocompatibility complex* (MHC)-II-Molekül mit hoher Affinität bindet und die Reifung von DC verhindert (Zozulya und Wiendl, 2008). Ein anderer Mechanismus ist die Freisetzung von Adenosin, das mittels seiner Bindung an den Adenosin Rezeptor 2A (A<sub>2A</sub>R) die Produktion von IL-6 in DC verhindern und einen tolerogenischen Phänotyp in diese Zellen induzieren kann (Sitkovsky, 2009).

T<sub>Reg</sub> können die Produktion von IL-2 und die Proliferation der konventionellen T-Zellen durch Übertragen von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) inhibieren, welches „gap junctions“ passieren kann (Yaqub und Taskén, 2008).

Des Weiteren zeigen T<sub>Reg</sub> zytolytische und proapoptotische Aktivitäten über T<sub>Eff</sub>, z. B. mittels IL-2-Deprivation durch CD25, Sekretion der Granzyme A bzw. B und Perforin und dem TRAIL-DR5-Weg (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-death receptor 5*) (Vignali *et al.*, 2008).

Galectin 1, das an der Oberfläche von T<sub>Reg</sub> überexprimiert wird, induziert durch unbekannte Mechanismen die Suppression von T<sub>Eff</sub> mittels „cross-linking“ von Monosialotetrahexosylgangliosid 1 (GM1) und der Aktivierung von TRPC5 (*transient receptor potential channel subfamily C member 5*) (Rabinovich und Toscano, 2009).

Ferner gibt es widersprüchliche Daten bezüglich der Rolle von CTLA4 bei der regulatorischen Funktion von T<sub>Reg</sub>. CTLA4 ist ein koinhibitorisches Molekül das zur Familie von CD28 gehört. Es bindet an CD86 und verhindert die Aktivierung der T<sub>Eff</sub> (Karandikar *et al.*, 1996; Hurwitz *et al.*, 2002). CTLA4 wird konstitutiv von T<sub>Reg</sub> exprimiert. Hierdurch können T<sub>Reg</sub> in DC die Expression von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), dem ersten Enzym des Kynurenin Weges, stimulieren (Mailankot *et al.*, 2009) IDO ist eine Oxidoreduktase, die die Degradierung von Tryptophan in N-Formyl-Kynurine verursacht. Die Verarmung von Tryptophan und die Akkumulierung von Kynureninen induziert eine Blockade der T-Zellaktivierung, führt zur Apoptose der T-Zellen und unterstützt die Differenzierung der naiven T-Zellen in T<sub>Reg</sub> (Liu *et al.*, 2009).

## 2.6. Funktionen von T<sub>Reg</sub> in vorangegangenen Studien

Bereits in den achtziger Jahren konnte gezeigt werden, dass die Entfernung des Thymus in Mäusen in ihren ersten Lebensstagen zu einem schwerem Polyautoimmunsyndrom führt, bei der Entfernung zu einem späteren Zeitpunkt bleibt dies jedoch aus (Kojima *et al.*, 1981). Später konnte dieses durch die frühe Thymektomie verursachte Symptom dem Fehlen von T<sub>Reg</sub> zugeordnet werden, da Mäuse, welchen T<sub>Reg</sub> nach der Thymektomie appliziert wurden, kein Polyautoimmunsyndrom entwickelten. Durch die Applikation der T<sub>Reg</sub> konnte die Proliferation von autoreaktiven Zellen verhindert werden (Asano *et al.*, 1996).

In Patienten mit Multipler Sklerose, einer humanen Autoimmunkrankheit, konnte ebenso das Mitwirken der T<sub>Reg</sub> in der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung der Krankheit belegt

werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass  $T_{Reg}$  von Patienten die an Multipler Sklerose erkrankt sind, eine erheblich schwächere inhibitorische Funktion besitzen, als die  $T_{Reg}$  gesunder Probanden (Viglietta *et al.*, 2004).

Eine weitere wichtige Funktion der  $T_{Reg}$ , ist die Verhinderung der Immunantwort gegen Tumoren. In murinen Modellen wurde gezeigt, dass in Versuchstieren, welchen zuvor verschiedene Tumorzellen injiziert wurden, eine Depletion der  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen durch anti-CD25-Antikörper die komplette Rückbildung der Tumoren bewirkte. Dagegen lag in Kontrolltieren, welchen Tumorzellen ohne Depletion der  $CD4^+CD25^+$  Zellen injiziert wurden, anschließend eine normale Tumorentwicklung vor (Onizuka *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999). Hierauf aufbauend konnte später *in vitro* gezeigt werden, dass die Funktion und Proliferation autologer und tumorspezifischer T-Zellen durch  $T_{Reg}$  inhibiert wird (Ormandy *et al.*, 2005; Unitt *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004).

In murinen Modellen zur Transplantationstoleranz wurde gezeigt, dass es zu einem erhöhtem Vorkommen von  $T_{Reg}$  im Transplantat kommt und hierdurch, aufgrund der immunoregulatorischen Funktionen der  $T_{Reg}$ , eine Transplantattoleranz vermittelt wird (Wood und Sakaguchi, 2003; Waldmann *et al.*, 2004).

Ebenso konnte eine fundamentale Rolle der  $T_{Reg}$  bei der Kontrolle der Immunantworten auf akute und chronische infektiöse Erkrankungen durch mehrere Gruppen nachgewiesen werden (Mittrücker und Kaufmann, 2004; Belkaid und Rouse, 2005; Alatrakchi und Koziel, 2009).

Auch bei parasitären Infektionen wurde die inhibitorische Kapazität der  $T_{Reg}$  nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass in Infektionen mit *Leishmania major*  $T_{Reg}$  am Ort der Infektion in hoher Zahl auftreten und damit die T-Zellantwort supprimieren (Belkaid *et al.*, 2000, 2002; Peters und Sachs, 2006).

In einem murinen Modell der Malaria, der Infektion mit *Plasmodium yoelii*, konnte gezeigt werden, dass die antikörpervermittelte Depletion der  $CD4^+CD25^+$   $T_{Reg}$  zu einem Schutzmechanismus führt, der in Verbindung mit einem Anstieg pathogenspezifischer T-Zellen in Verbindung gebracht wird. Die Depletion der  $CD4^+CD25^+$   $T_{Reg}$  ließ die Versuchstiere überleben, während nicht depletierte Kontrolltiere sterben (Hisaeda *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007). Des Weiteren führten Depletionsassays und die gemeinsame Kultivierung verschiedener T-Zell-Subpopulationen in diesem Modell zur Annahme, dass die Expansion von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Effektorzellen ( $T_{Eff}$ ) im Verlauf einer Infektion sowohl antigenspezifisch

als auch nichtantigenspezifisch inhibiert werden (Aandahl *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2005; Kinter *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu führte die Depletion der T<sub>Reg</sub> in einem Modell für zerebrale Malaria nicht zur Verstärkung der Pathologie (Steeg *et al.*, 2009).

## 2.7. Die Dereg Maus als Modell für das *in vivo* Studium der T<sub>Reg</sub>

Da eine Behandlung mit Antikörpern gegen CD25<sup>+</sup> T-Zellen nicht nur T<sub>Reg</sub> depletiert, sondern auch aktivierte T-Zellen, wurde von Lahl *et al.* ein Modell etabliert, welches die spezifische Depletion von T<sub>Reg</sub> erlaubt (Lahl *et al.*, 2007).

Hierzu wurde mittels der „*bacterial artificial chromosome*“ (BAC) Technik, welche ein künstliches Chromosom aus dem Singlecopy F-Plasmid des Bakterium *Escherichia coli* verwendet, ein neuartiges Mausmodell konstruiert. Dieses exprimiert den *primate high affinity diphtheria toxin* Rezeptor (DTR) zusammen mit einem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) unter der Kontrolle des Foxp3 Promoters (Heintz, 2001; Sparwasser, 2004; Sparwasser und Eberl, 2007). Die BAC Technik erlaubt die Klonierung großer Genomabschnitte (größer 300 kbp) und führt zu einer hohen Stabilität des Klons (mehr als 100 Generationen) (O'Connor *et al.*, 1989; Shizuya *et al.*, 1992). Außerdem wird eine hochspezifische Expression des Zielgens und des Reporterproteins erreicht, welche hochgradig mit der Foxp3-Expression in der neuen *depletion of regulatory T cells* (DEREG) Maus korreliert. Die Expression des eGFP-Reporterproteins ermöglicht eine einfache Sortierung und Detektion der Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse („*fluorescence activated cell sorting*“ (FACS)) und damit auch die Untersuchung ihrer Funktionalität (Lahl *et al.*, 2007).

Die Injektion von Diphtherietoxin (DT) an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen führte in adulten Dereg Mäusen zu einer 90-98% Depletierung der T<sub>Reg</sub>. Die Tatsache, dass keine andere T-Zellpopulation beeinflusst wurde, lässt darauf schließen, dass die DT Behandlung der Dereg Mäuse zu einer selektiven Depletion von Foxp3<sup>+</sup> Zellen führt.

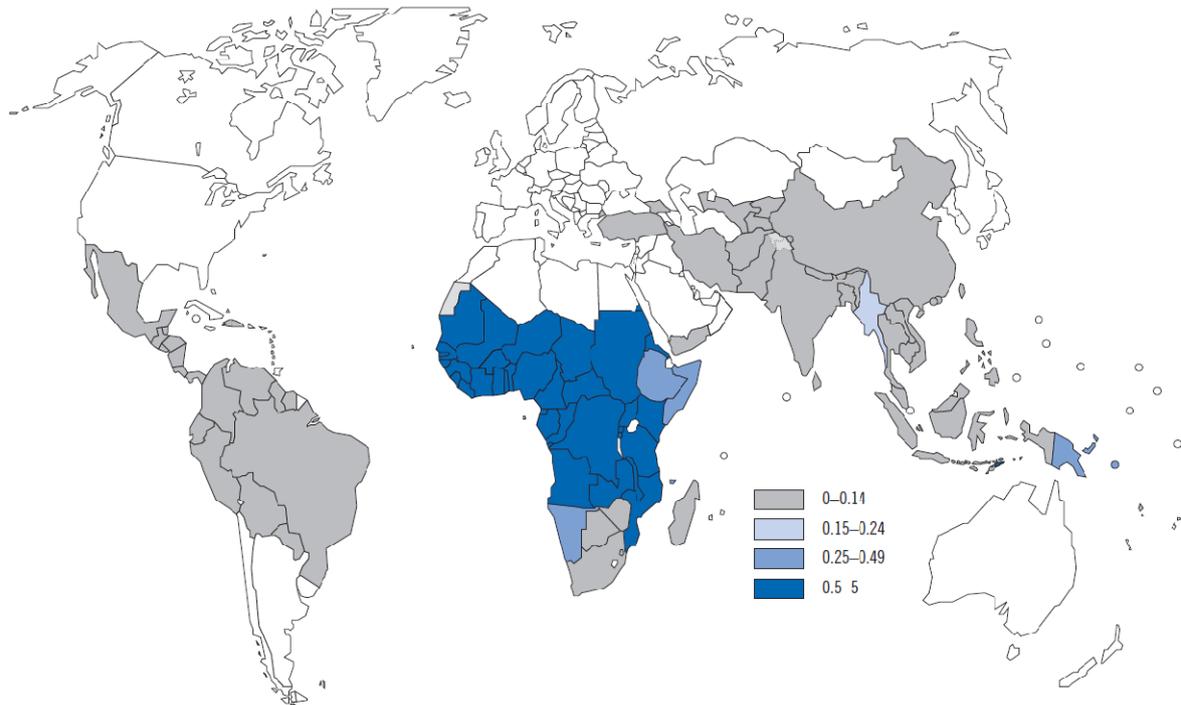
Ebenso führte die Depletion der T<sub>Reg</sub> in Dereg Mäusen zu einer Hochregulierung kostimmulierender Moleküle auf Dendritischen Zellen, einer erhöhten Anzahl von T<sub>Eff</sub> und dem effizienten Priming einer CTL (*cytotoxic T lymphocyte*) Antwort (Lahl; 2008).

Die Depletion der  $T_{Reg}$  in neonatalen DEREK Mäusen führt zur Entstehung eines „*scurfy*“ ähnlichen Phänotyps, der eine vergleichbare Kinetik und Krankheitsausprägung aufweist, wie sie in  $Foxp3^+$  KO „*scurfy*“ Mäusen gefunden wurde (Lahl *et al.*, 2007).

### **3. Malaria**

#### **3.1. Epidemiologie**

Malaria ist die weltweit am meisten verbreitete parasitäre Erkrankung. Etwa 3,3 Milliarden Menschen leben in Gebieten mit Infektionsrisiko, davon ungefähr 1,2 Milliarden in Gebieten mit hohem Infektionsrisiko, also Gebieten mit mehr als einem gemeldeten Fall pro tausend Einwohner. 49% der Menschen, in Gebieten mit hohem Malariarisiko, leben in Afrika, 37% in südostasiatischen Ländern (WHO, World Malaria Report 2008). Die Zahl der gemeldeten jährlichen Infektionen hat sich zwar in den letzten Jahren von etwa 500 Millionen (WHO, World Malaria Report 2006) auf ungefähr 250 Millionen (WHO, World Malaria Report 2008) halbiert, dennoch bleibt die Malaria mit 881000 Toten im Jahr 2006 weiterhin ein ernstes Problem (Abb. 1). Auch wenn Malaria in beinahe allen subtropischen und tropischen Gebieten der Erde endemisch ist, sind Fälle tödlich verlaufender Infektionen mit 91% aller Malariatoten, hiervon 85% Kinder unter fünf Jahren, hauptsächlich in Afrika angesiedelt. Die Verteilung der Malariatoten lässt sich mit der Präsenz des Parasiten *Plasmodium falciparum*, welches für den Großteil der Opfer verantwortlich ist, im Zusammenspiel mit Kofaktoren wie Unterernährung, mangelnder ärztlicher Versorgung und anderen Erkrankungen, erklären (WHO, World Malaria Report 2008).



**Abbildung 1.** Malariatote pro 1000 Einwohner pro Jahr (WHO, World Malaria Report 2008)

Ursache einer Malariaerkrankung ist die Infektion mit Plasmodien, also einzelligen Parasiten, die speziesspezifisch sind. Die Übertragung dieser Parasiten erfolgt, im Falle humaner Malariastämme, von Mensch zu Mensch über den Stich einer weiblichen Stechmücke der Gattung *Anopheles*. Einerseits ist damit die Verbreitung der Malaria abhängig von der Präsenz geeigneter Überträger, andererseits lässt der Blick auf die momentan malariaendemischen Gebiete auch darauf schließen, dass klimatische Gegebenheiten hierbei eine wichtige Rolle spielen. Dies wird auch durch historische Berichte belegen, welche eine Verbreitung der Malaria in Teilen Europas in Perioden mit höherer Jahresdurchschnittstemperatur belegen. Momentan ist Malaria in Deutschland als Reisekrankheit klassifiziert, mit weniger als 1000 gemeldeten Fällen und 17-28 Toten pro Jahr. Bei allen gemeldeten Fällen lag kurz vor dem Auftreten der malariaspezifischen Symptome ein Aufenthalt in einem Epidemiegebiet vor (Martens, 2007). Trotzdem ist die Situation in Deutschland, insbesondere mit Blick auf die historischen Berichte, weiterhin kritisch zu beobachten, da ebenso wie in den meisten europäischen Ländern auch hier die Vektoren für eine Malariaübertragung, die *Anopheles* Mücke in verschiedenen Unterarten heimisch ist. Als potenzielle Überträger in Deutschland gelten *Anopheles atroparvus*, *A. maculipennis*, *A. messeae* und selten auch *A. algeriensis* (Jetten, 1994). Eine Übertragung von einem Patienten mit Reisemalaria auf andere Menschen ist theoretisch somit möglich.

Das Risiko einer länger anhaltenden Endemie oder Epidemie wird jedoch als sehr gering bewertet (Martens, 2007), da der Parasit, wenn er sich in der Mücke befindet, eine sehr geringe Kälteresistenz aufweist. Temperaturen unter 15°C verhindern die Entwicklung des Parasiten in der Mücke (Meyer, 2007). Eine Klimaerwärmung könnte allerdings zu einer Veränderung der Situation führen. Eine Klimaerwärmung um 1,1°C würde in Europa, ausgenommen der alpinen Regionen, das Infektionsrisiko mehr als verdoppeln (Martens, 2007).

### **3.2. Lebenszyklus des Malaria Erregers**

Verursacht wird eine Malariaerkrankung durch die Infektion mit Protozoen der Gattung *Plasmodium*, welche zu den *Haemosporoidae* gehören, und den *Apikomplexae* (Sporozoa) zugeordnet werden (Mass-Coma, 2002).

Fünf humane Malariaerreger sind bekannt, *P. falciparum*, Erreger der Malaria tropica, *P. vivax* und *P. ovale*, Erreger der Malaria tertiana, *P. malariae*, Erreger der Malaria quartana, und *P. knowlesi*, eigentlich ein Erreger in Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*), der aber eine häufige Ursache von humaner Malaria in Südostasien ist (Pain *et al.*, 2008).

Der am weitesten verbreitete und, aufgrund seiner Pathogenität, gefährlichste Erreger ist *P. falciparum*, welcher die Malaria tropica auslöst. Infektionen mit Malaria tropica verlaufen unbehandelt häufig tödlich, da sie zu Komplikationen wie Hyperparasitämie, Anämie, zerebraler Malaria und Multiorganversagen führen. Ähnliche Folgen, jedoch in abgeschwächter Form, können durch eine Infektion mit *P. knowlesi* hervorgerufen werden (Barrell und Berriman, 2008).

Bei allen Plasmodien dient der Säuger aber nur als Zwischenwirt und es besteht eine direkte Wirtsspezifität, das heißt, humane Malariaerreger haben unter natürlichen Bedingungen nur den Menschen als Reservoir. Unter Laborbedingungen ließ sich beispielsweise *Plasmodium falciparum* auch in einigen Affenarten, wie den Östlichen Graukehltaffen (*Aotus trivirgatus*), vermehren (Obaldia *et al.*, 2009). Endwirt sind grundsätzlich Stechmücken der Gattung *Anopheles*. Jedoch sind nur 60 der etwa 400 *Anopheles* Arten unter natürlichen Bedingungen als Vektor geeignet und 30 Arten von größerer Bedeutung für die Malariaübertragung (Butcher, 1996).

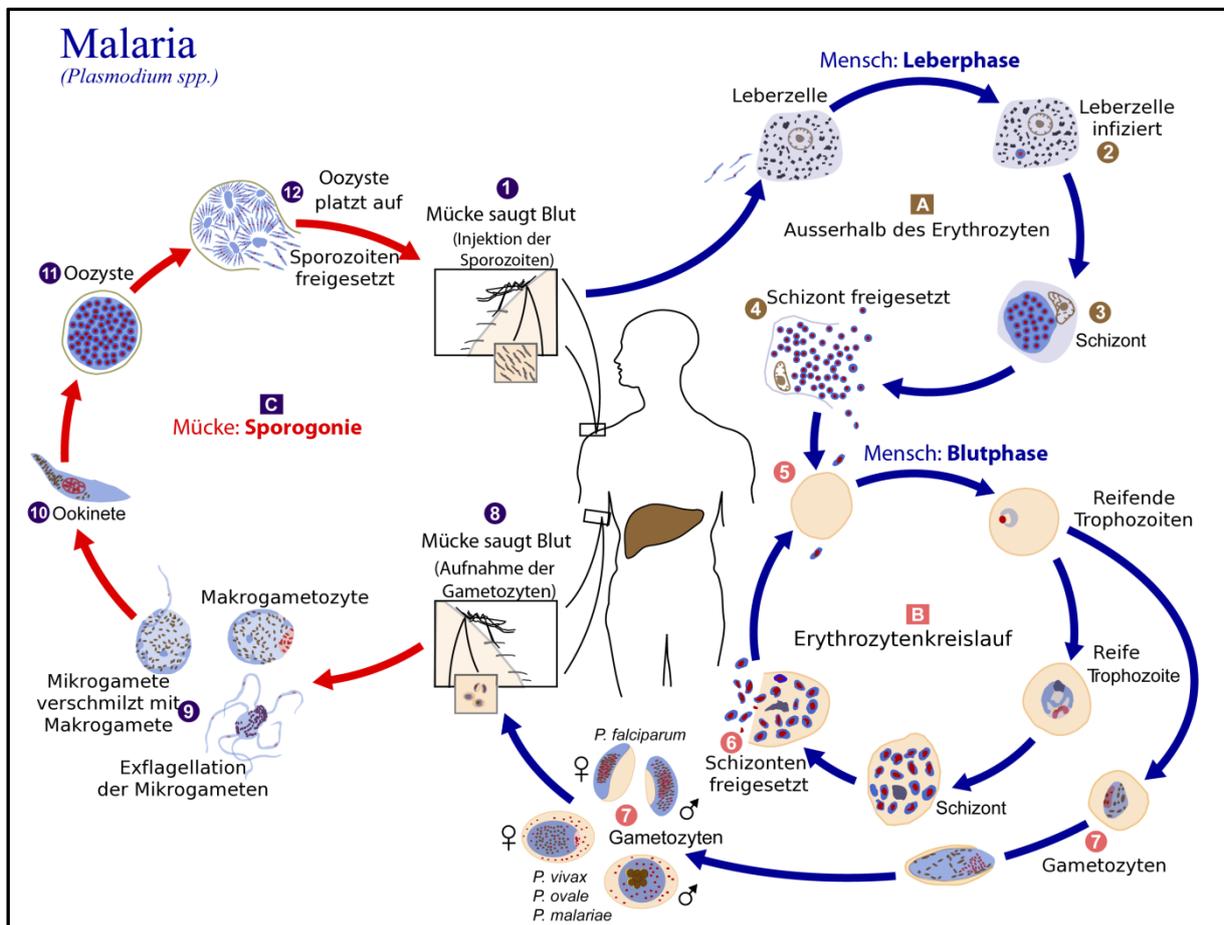
Der Lebenszyklus von Plasmodien kann, wie der der meisten Sporozoen, in mehrere Phasen unterteilt werden, welche streng wirtsspezifisch sind (Abb. 2).

Die beiden asexuellen Phasen, Leberphase und Blutphase, finden im Zwischenwirt statt. Die Leberphase besteht aus der präerythrozytäre Schizogonie, die Blutphase aus erythrozytärer Schizogonie und Gamogonie. Die sexuelle Phase, die Sporogonie, ist ausschließlich in der Mücke möglich. Die erste Phase, die Leberphase, beginnt nach dem Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles* Mücke. Dabei werden mit dem Speichel der Mücken, der als Gerinnungshemmer dient, zwischen 10 und 100 Sporozoiten in die Blutbahn des Zwischenwirtes abgegeben (Aly *et al.*, 2009). Innerhalb kurzer Zeit werden diese mit dem Blutstrom in die Leber transportiert, wo sie schon 30 Minuten nach der Übertragung in Leberparenchymzellen eindringen (Meyer, 2007). Dort wachsen sie, innerhalb von 6 bis 16 Tagen, in einer parasitophoren Vakuole des Hepatozyten, zu Schizonten heran (präerythrozytäre Schizogonie). In den Schizonten bilden sich Merozoiten, bei *P. vivax* bis 10000, bei *P. falciparum* sogar bis zu 40000 Merozoiten (Cohen und Lambert, 1982). Nach 5 bis 12 Tagen rupturieren die Hepatozyten und die Merozoiten werden in die Blutbahn freigesetzt. In die Blutbahn gelangt, dringen die Merozoiten in die zirkulierenden Erythrozyten ein und starten hier wiederholte Schizogonien (erythrozytäre Schizogonie) (Meyer, 2007).

Aus jedem Zyklus der Schizogonie gehen 8-16 Merozoiten hervor, welche selbst wiederum Erythrozyten infizieren. Daneben entstehen manchmal auch männliche Mikrogametozyten sowie weibliche Makrogametozyten (Gamogonie). Die Zyklen der Schizogonie laufen synchronisiert ab und dauern abhängig der Plasmodienart zwischen 48 und 72 Stunden (Aktories *et al.*, 2005).

Wenn eine weibliche *Anopheles* Mücke einen infizierten Wirt sticht, nimmt sie die Gametozyten mit dem Blut auf. Hier beginnt nun die sexuelle Phase des Lebenszyklus. Ausgelöst durch die physiologischen Verhältnisse im Mitteldarm der Mücke bilden die Mikrogametozyten innerhalb von etwa 10 Minuten je acht Flagellen (Mikrogameten) aus, welche jeweils einen Kern enthalten (Lucius und Loos-Frank, 2008). Nach einem Abschnürungsprozess befruchten diese Mikrogameten eine der weiblichen Makrogameten, die sich aus den Makrogametozyten gebildet haben. Die daraus entstehende Zygote (Ookinet) wandert nun durch das Epithel des Darms und lagert sich zwischen den Epithelzellen und der Basalmembran an. Hier bildet sich aus dem Ookinet ein Oozyst, in dem nun die Sporogonie stattfindet, im Zuge derer durch Reduktionsteilung bis zu 1000 Sporozoiten entstehen (Jetten, 1994). Die Sporozoiten emigrieren nun durch die Leibeshöhle

in die Speicheldrüse der Mücke. Von dort können aus sie beim nächsten Stich wieder auf einen Menschen übertragen werden. Die Geschwindigkeit der Entwicklung der Plasmodien in der Mücke wird von der Außentemperatur beeinflusst und findet bei Temperaturen unter 15°C nicht mehr statt (Meyer, 2007).



**Abbildung 2. Zyklus der Malariaparasiten** (Modifiziert nach CDC, Public Health Image Library, 2006)

Der Lebenszyklus der Plasmodien kann in mehrere Phasen eingeteilt werden, welche streng wirtsspezifisch sind: Leberphase (A), Blutphase (B), Phase in der Mücke (Sporogonie) (C); (1) Bei einer Blutmahlzeit überimpft die mit Malaria infizierte weibliche *Anopheles* Mücke Sporozoiten in den menschlichen Wirt. **Leberphase (A):** (2) Die Sporozoiten werden im Blutstrom in die Leber transportiert, wo sie in Leberparenchymzellen eindringen. (3) In den Hepatozyten reifen sie zu Leberschizonten (präerythrozytäre Schizogonie). (4) Die Schizonten bilden Merozoiten, welche nach dem Aufbrechen der Hepatozyten in die Blutbahn freigesetzt werden. **Blutphase (B):** (5) Die Merozoiten infizieren rote Blutkörperchen. (6) In den Erythrozyten reifen die Merozoiten zu Schizonten, welche aufbrechen und die Merozoiten freisetzen, diese können erneut Erythrozyten befallen. (7) Einige Parasiten teilen sich in sexuelle erythrozytäre Zwischenformen auf (Gametozyten). (8) Die Gametozyten, männliche (Mikrogametozyten) und weibliche (Makrogametozyten), werden durch eine weibliche *Anopheles*-Mücke bei einer Blutmahlzeit aufgenommen. **Sporogonie (C):** (9) Im Mitteldarm der Mücke, dringen die Mikro- und Makrogameten ein und bilden Zygoten. (10) Die Zygoten werden dann frei beweglich und nehmen eine längliche Form an (Ookineten). (11) Diese dringen in die Darmwand ein, wo sich die Ookineten in Oozysten umwandeln. (12) Die Oozysten wachsen, brechen auf und geben Sporozoiten frei. Diese emigrieren in die Speicheldrüsen der Mücke, hier beginnt der Zyklus erneut.

### 3.3. Erreger der murinen Malaria

Für Studienzwecke werden häufig murine Infektionsmodelle verwendet. Als murine Modelle für die humane Malaria werden vier Erregerarten aufgrund ihrer strukturellen und physiologischen Analogien zum human Malariaerreger genutzt, *P. berghei*, ein Malariaerreger der Galeriewaldratte *Grammomys surdaster*, die in Höhenregionen Zentralafrikas vorkommt, *P. vinckei*, *P. chabaudi* und *P. yoelii*, welche in der Natur in verschiedenen Spezies der afrikanischen Waldratten auftreten (Janse und Waters, 2006).

Insbesondere *P. berghei* ist von sehr großem Interesse, da es nicht nur eine der humanen *P. falciparum* Infektion ähnliche Erkrankung verursacht (Florens, 2002; Gardner *et al.*, 2002), sondern auch in Lebenszyklus, Übertragung der Parasiten und den Antigenvariationen starke Ähnlichkeiten aufweist (Carter und Diggs, 1977; Carvalho, 2004). Die Struktur und die Funktionen vieler Hauptantigene der Malaria, z. B. TRAP (*thrombospondin related anonymous protein*), CSP (*circumsporozoite protein*), SALSA (*sporozoite- and liver-stage antigen*), SSP<sub>2</sub> (*sporozoite surface protein 2*), STARP (*sporozoite threonine- and asparagine-rich protein*) der Sporozoiten und p25 und p28 der Ookineten sind bei murinen und humanen Erregern hochkonserviert (Paul, 2008; Yoshida *et al.*, 2003).

Die Verwendung dieser Modellorganismen hat die Entwicklung verschiedener Impfstoffe und neuer Therapieansätze erlaubt (Anders, 2000).

### 3.4. Erworbene Immunität gegen Malaria

CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der adaptiven Immunität gegen Malariaerreger. Sie sind verantwortlich für die Erkennung von auf MHC-Klasse-I präsentierten zelleigenen oder viralen Peptiden. Während der Leberphase der Malariainfektion erkennen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen Epitope der Plasmodien auf MHC-I Molekülen, welche auf der Oberfläche der von Sporozoiten befallenen Hepatozyten exprimiert werden (Hill, 2006).

In Mäusen, die mit Sporozoiten immunisiert wurden, führte eine Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Antikörper zu einem Verlust des Schutzes gegen eine Reinfektion. Die Schutzwirkung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen beruht auf der direkten Zerstörung sporozoitenhaltiger Hepatozyten (Good und Doolan, 1999; Overstreet *et al.*, 2008). Auch ist die Produktion von IFN $\gamma$  durch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen und andere Zellen ein wichtiger Faktor bei der Bekämpfung der

Parasiten, da dies zu einer Aktivierung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid und anderer, für die Parasiten toxischen, Substanzen in Makrophagen und Hepatozyten führt. Im Fall der Blutphase ist die Rolle der zytotoxischen T-Zellen in der intraerythrozytären Phase der Erkrankung nicht geklärt, da keine MHC-I Moleküle auf den Erythrozyten exprimiert werden (Miller *et al.*, 2002).

Die Infektion mit nichtletalem *Plasmodium chabaudi* führte im Mausmodell zu dem Ergebnis, dass sowohl Th1-, als auch Th2-Zellen notwendig sind, um die Infektion komplett zu beenden (Langhorne, 1989; Langhorne und Simon, 1989; Stevenson *et al.*, 1993). Von entscheidender Bedeutung für den Ausgang der Infektion ist das Verhältnis von Th1- und Th2-Zellen und deren Regulation im zeitlichen Verlauf (Shear *et al.*, 1989; Su und Stevenson, 2002).

In einem Modell der letalen Malariainfektion, der Infektion von Mäusen mit *Plasmodium yoelii*, zeigte die Produktion großer Mengen an IFN $\gamma$  und IL-10, dass auch hier sowohl Th1-, als auch Th2-Zellen aktiviert werden (Kobayashi *et al.*, 1996).

B-Zellen und Antikörper spielen auch eine gewisse Rolle in der Bekämpfung der Malariainfektionen (von der Weid *et al.*, 1996), auch wenn die Entstehung einer Immunität erst nach mehrfacher Malariainfektion zustande kommt und zeitlich nur kurz anhält (Giha *et al.*, 1999). Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass die Antikörper sehr spezifisch sind und sich daher immer nur gegen ein bestimmtes Stadium des Entwicklungszyklus der Parasiten und deren Oberflächenantigene richten. Eine direkte Mitwirkung der Antikörper in der Bekämpfung der Parasiten erfolgt über Inhibierung der Erythrozyteninvasion, Agglutinierung, komplementabhängige Lyse, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder durch eine Opsonisierung und darauffolgender Wechselwirkung mit Komplementrezeptoren auf Makrophagen (Bouharoun *et al.*, 1995).

Auch im Menschen kommt es durch mehrfache Infektion zu einer partiellen Immunität, welche ebenso wie in der Maus, nur im Falle einer dauerhaften Erregerexposition fortbesteht. Diese sogenannte Semiimmunität führt zu einem mildem bis asymptomatischen Verlauf der Infektion (Chizzolini *et al.*, 1990; Lang und Löscher, 2000). Kindern semiimmuner Mütter wird dieser Schutz durch mütterliche Antikörper, für die ersten sechs Lebensmonate übertragen. Schwere neonatale Malariaerkrankungen von Kindern semiimmuner Mütter durch *Plasmodium falciparum* Infektionen sind deswegen selten (Riley *et al.*, 1991).

In Infektionen mit *P. chabaudi* und *P. yoelii* wurde gezeigt, dass TGF $\beta$  zu einem milderem Krankheitsverlauf beiträgt und zur Entfernung der Parasiten führen kann. Die positive

Wirkung von TGF $\beta$  hängt jedoch stark vom Zeitpunkt der TGF $\beta$  Induktion ab (Omer und Riley, 1998). TGF $\beta$  hat eine duale Wirkung. Es kann in geringeren Konzentrationen immunaktivatorisch sein oder in hohen Konzentrationen als Immunsuppressor wirken (Omer *et al.*, 2000). Wird den Mäusen im frühen Stadium der Infektion, in dem normalerweise nur geringe Mengen an TGF $\beta$  produziert werden, eine hohe Dosis TGF $\beta$  injiziert, endet die Infektion, aufgrund der Suppression der frühen IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Produktion, tödlich (Li *et al.*, 2003; Omer *et al.*, 2003).

Plasmodien haben effiziente Strategien gegen protektive Immunantworten während der Blutphase der Infektion entwickelt. Die intrazelluläre Lokalisation in Erythrozyten schützt die Entwicklungsstadien des Parasiten vor Antikörpern. Erythrozyten können kein Antigen in MHC-I Molekülen präsentieren. Ein anderer Schutzmechanismus, welcher nur in *P. falciparum* vorliegt, ist die Vermeidung von Milzpassagen durch Zytoadhärenz. Eine weitere Strategie der Malariaparasiten liegt in der Fehlsteuerung des Immunsystems. Es findet während der Infektion eine polyklonale Aktivierung von Lymphozyten statt und große Mengen von Antigenen werden durch die Plasmodien gebildet. Da die Epitope der Entwicklungsstadien der Plasmodien nur eine schwache Immunogenität aufweisen, führt die Sekretion der polyklonalen Antikörper dazu, dass sich die Immunantwort hauptsächlich gegen diese richtet (Lucius und Loos-Frank, 2008).

### **3.5. Pathogenese der *Plasmodium falciparum* Infektion**

Unabhängig von der Spezies des Zwischenwirts sind die Symptome einer Malariaerkrankung grundsätzlich mit der erythrozythären Phase der Infektion assoziiert.

Ein wichtiger physiopathologischer Mechanismus in der Malaria ist die Zytoadhärenz.

Diese wird durch die Expression variabler Zelladhäsionsproteine, wie dem klonspezifischen Oberflächenantigen PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane antigen 1*), welches von *var* Genen codiert wird (Pasternak und Dzikowski, 2009), ausgelöst. Durch den Parasitenbefall bilden sich „knobs“ in der Erythrozytenmembran aus, in welchen sich beispielsweise PfEMP1 befindet, hierdurch wird die Bindung der befallenen Erythrozyten an die Endothelien von Kapillaren gefördert (Marty, 2002). Die wichtigsten bisher beschriebenen Interaktionspartner von PfEMP1 auf den Endothelzellen sind ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), ELAM-1 (*endothelial cell leukocyte adhesion molecule 1*), Thrombospondin und Chondroitinsulfat

(Chakravorty und Craig, 2005). PfEMP1 Oberflächenantigene interagieren auch mit CD36 Proteinen auf der Oberfläche von Endothelzellen und mit dendritischen Zellen (DC), deren Stimulierung dann zu einer IL-10 Ausschüttung führt, was zu einer Supprimierung der Immunantwort hervorruft (Urban *et al.*, 2001).

Einzelne veränderte Erythrozyten können auch untereinander interagieren, was zu einer Verklumpung oder, im Falle einer Interaktion mit nicht befallenen Erythrozyten, zu einer Rosettenbildung führt. In beiden Fällen kann dies zu einem Verstopfen von Kapillargefäßen führen, was zu Unterbrechungen der Mikrozirkulation des Blutes, und daraus folgend, zu Ischämie, Ödembildung und Blutungen führt. Besonders häufig kann dies in Gehirn, Herz, Lunge, Nieren, Darm und Plazenta beobachtet werden (Miller *et al.*, 2002). Häufig kommt es, aufgrund einer Ischämie in der Plazenta, deswegen in, an Malaria tropica erkrankten Müttern, zu Fehl- oder Totgeburten (Miller und Smith, 1998).

Ein anderer pathologischer Mechanismus bei der Infektion mit *Plasmodium falciparum* ist die Ausschüttung von Malariatoxinen und Antigenen (Clark *et al.*, 2004). Parasitierte Erythrozyten setzen diese frei und dadurch wird eine verstärkte Synthese proinflammatorischer Zytokine, wie *tumor necrosis factor* (TNF)  $\alpha$ , Lymphotoxin, IFN $\gamma$ , IL-1 und IL-6 verursacht. Dies führt zu Bewusstseinsstörungen und Fieber und kann eine abnormale Erythropoese sowie eine erhöhte Zytoadhärenz zur Folge haben (Riley *et al.*, 1991; Lang und Löscher, 2000). Die erhöhte Freisetzung von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimuliert eine verstärkte Synthese induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthasen (iNOS) (Bruch-Gerharz *et al.*, 2003). Diese verursachen lokal erhöhte Stickstoffmonoxidkonzentrationen, welche zu einer gesteigerten Phagozytose, Immunsuppression, Inflammation und einer lokalen Gefäßerweiterung führen. Diese Störungen sind an der Entstehung zerebraler Malaria direkt beteiligt (Clark *et al.*, 1990; Rockett *et al.*, 1994).

Ebenso ist das Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) von großer Bedeutung in der Pathogenese von *P. falciparum*. Es regt mittels einer NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) Aktivierung die Produktion von TNF $\alpha$ , IL-1, iNOS, ICAM-1 und VCAM-1 in Makrophagen an (Schofield und Hackett, 1993; Tachado *et al.*, 1997). Antikörper gegen GPI werden mit der Induktion klinischer Immunität in Verbindung gebracht. Es wird vermutet, dass hierdurch die Th1-Antwort, die durch ihre starke IFN $\gamma$ -Produktion proinflammatorisch wirkt, in eine antiinflammatorische Reaktion umgewandelt wird (Naik *et al.*, 2000).

### 3.6. Vakzinierung gegen Malaria

Der optimale Wirkzeitpunkt einer Vakzinierung gegen Malaria im Zwischenwirt sollte vor dem Beginn der erythrozytären Phase, also dem Ausbruch der Krankheit, liegen. Da die Sporozoiten nach der Übertragung durch eine infizierte Mücke maximal dreißig Minuten bis zum Erreichen der Leber benötigen, wird ein antikörpervermittelter Schutz in dieser Phase als wenig aussichtsreich angesehen. Deswegen beschäftigt sich die Forschung primär mit Impfstoffen, die während der Leberphase der Malaria wirken. In Freiwilligen konnte durch die Impfung mit attenuierten Sporozoiten eine relative Langzeitimmunität erreicht werden (Nussenzweig *et al.*, 1967, 1970; Clyde *et al.*, 1973). Diese beruht hauptsächlich auf der Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche die Parasiten mittels IFN $\gamma$ - und NO-vermittelter Mechanismen vernichten. Ein durch zytotoxische Aktivität vermittelter Schutz findet bei dieser Form der Impfung nicht statt (Schofield *et al.*, 1987, Doolan *et al.*, 1996) und der Effekt ist nicht von Perforin oder Fas/Fas-Ligandinteraktion abhängig (Renggli *et al.*, 1997).

Im murinen Modell konnte durch die Applikation eines auf genetisch attenuierten Sporozoiten von *Plasmodium berghei* beruhenden Impfstoffs, welcher durch die Depletion eines Gens die Entwicklung der Leberschizonten inhibiert, eine ausgezeichnete Schutzwirkung erreicht werden (Mueller *et al.*, 2007).

Im Rahmen der Impfstoffforschung wurden zahlreiche Proteine des *P. falciparum* kloniert und charakterisiert, von denen sehr viele hochvariabel sind (Richards und Beeson, 2009).

Das *major surface protein 2* (MSP2) des *Plasmodium falciparum* wird von Leberschizonten auf der Oberfläche infizierter Hepatozyten in MHC-I Molekülen exprimiert. Diese befallenen Hepatozyten können dadurch von MSP2 spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt und eliminiert werden (Richie und Saul, 2002).

Auch das *major surface protein 1* (MSP1), ein GPI verankertes Oberflächenprotein in Merozoiten wird als Zielantigen für Impfungen genutzt. Die antikörpervermittelte Blockade von MSP1 inhibiert das Anheften und Eindringen der Merozoiten in Erythrozyten und führt somit zu einer verringerten Infektiosität und wirkt übertragungshemmend (Richards und Beeson, 2009; Richie und Saul, 2002).

Das in den letzten Jahren am intensivsten untersuchteste Protein ist CSP, ein 35 kD großes und sehr immunogenes Glykoprotein, das homogen auf der Oberfläche der Sporozoiten verteilt ist. Nach der C-terminalen Ankersequenz weist es eine Region, welche zwischen den verschiedenen *Plasmodium falciparum* Stämmen stark variiert, auf und anschließend folgt

eine hochkonservierte Domäne, die als Rezeptor des Parasiten für die Liganden der Leberzelloberfläche dient (Cohen *et al.*, 2009). Der zentrale Bereich des Proteins besteht aus 41 Abfolgen des Tetrapeptids NANP, welches starke Antikörperantworten induziert (Graves und Gelband, 2006). In Primatenmodellen konnte eine Immunisierung mit rekombinanten CSP-Antigenen jedoch keinen Schutz vor einer Infektion induzieren (Lucius und Loos-Frank, 2008).

Hierauf aufbauend wurden im experimentellen Impfstoff „RTS,S/ASO2A“ CSP-Epitope in Hepatitis B Partikel eingebracht, welcher in Probanden eine hohe protektive Wirkung zeigte. In einem Feldversuch mit Kindern im Alter zwischen ein und vier Jahren in Mozambique führte eine Vakzinierung zu einer um 45% verringerten Infektionshäufigkeit während der ersten 6 Monate nach der Impfung und die Häufigkeit schwerer Malaria wurde um 49% vermindert (Alonso *et al.*, 2005, Guinovart *et al.*, 2009; Bejon *et al.*, 2008). Nach einem vielversprechenden Abschluss der Unbedenklichkeits- und Wirksamkeitserprobung ist der Start der Phase III Erprobung für April 2009 in Lambaréné, Gabun, geplant und bei positiver Bewertung könnte das Medikament für eine vielfältige Verwendung 2012 zugelassen werden (Nayar, 2009).

### 3.7. ACT-CSP

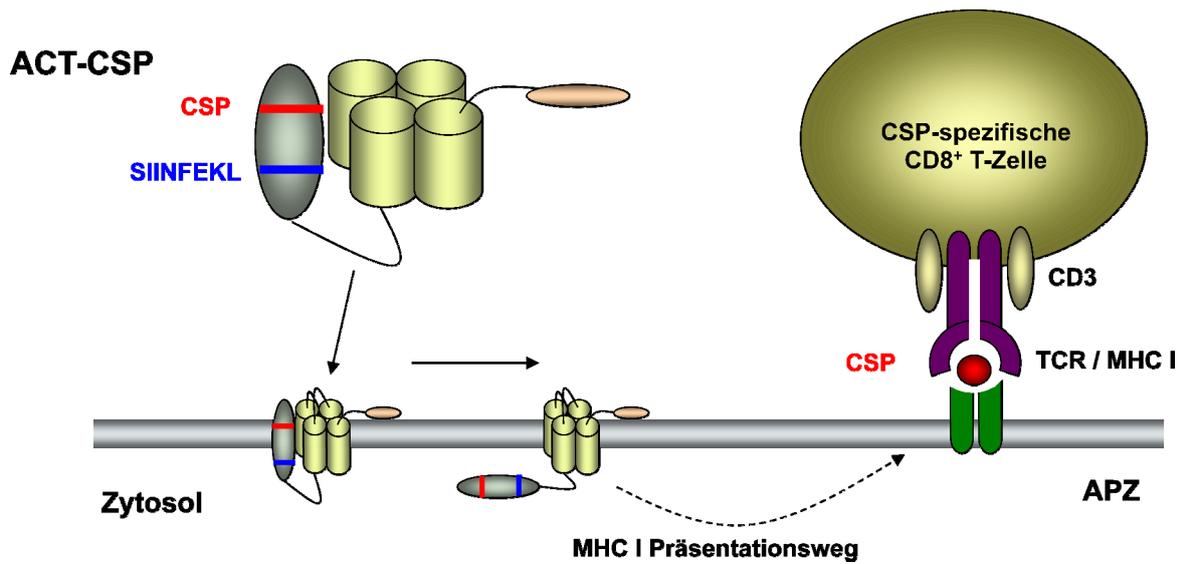
Ein experimentelles Vakzin, das im Mausmodell vielversprechende Ergebnisse lieferte und ebenfalls auf CSP aufbaut, ist Adenylatzyklase (ACT)-CSP. ACT-CSP, ein rekombinantes Fusionsmolekül aus ACT von *Bordetella pertussis* und CSP aus *Plasmodium berghei* (Tartz *et al.*, 2007, 2008).

Die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist essenziell für die Immunabwehr gegen Plasmodien. Um CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren, ist es notwendig, dass Antigene in das zytosolische Kompartiment von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) transloziert werden. Bakterielle Toxine wie beispielsweise *B. pertussis* ACT sind gut als Antigenträger für die Induktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen geeignet. Dieses Toxin wird im Verlauf einer *B. pertussis* Infektion freigesetzt und bindet an die Membran eukaryotischer Zellen. Die katalytische Domäne wird in das Zytosol der Wirtszelle transloziert (Confer *et al.*, 1982). ACT weist drei funktionelle Domänen auf. Am N-Terminus befindet sich eine katalytische Domäne zur calmodulinaktivierten Umwandlung von 5'AMP in cAMP, eine porenbildende Domäne, welche durch multiple Nonapeptidwiederholung gebildet wird und typisch für *repeats in toxin* (RTX) Proteine ist,

und eine kalziumbindende Domäne (Rose *et al.*, 1995). Bei Kontakt mit einer eukaryotischen Zelle schließt die porenbildende Domäne  $\alpha$ -helikale Strukturen in die Membran der Zelle ein, wodurch eine Pore gebildet wird. Durch diese wird anschließend die katalytische Domäne in das Zytosol der Zelle transloziert, was, nach einer calmodulininduzierten Aktivierung, die Katalyse von 5'AMP zu cAMP initiiert (Confer *et al.*, 1982; Ladant und Ullmann, 1999). Die Akkumulation der gebildeten cAMP im Zytosol der Wirtszellen führt zur toxischen Wirkung des Moleküls (Gray *et al.*, 1998).

ACT weist sowohl lytische, als auch zytotoxische Aktivität auf, induziert Apoptose, inhibiert die Phagozytose von Makrophagen und verhindert die Chemotaxis (Gray *et al.*, 1998). Obwohl ACT in viele verschiedene eukaryotische Zellen eindringen kann, findet auch eine spezifische hochaffine Bindung an Zellen, die das  $\alpha$ M $\beta$ 2-Integrin CD11b/CD18 (bekannt auch als CR3 („*complement receptor 3*“) oder Mac-1) auf der Oberfläche tragen, statt. Dies sind z. B. Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen und dendritische Zellen. ACT verfügt über eine spezifische Affinität für CD11b/CD18, welches präferenziell auf der Oberfläche APZ, hauptsächlich DC, exprimiert wird (Ladant und Ullmann, 1999). Daher kann ACT als Antigen-träger CD8-Epitope in den MHC I-Präsentationsweg einschleusen (Fayolle *et al.*, 1996; Osicka *et al.*, 2000; Schlecht *et al.*, 2004). In der katalytischen Domäne des von Tartz *et al.* verwendeten ACT-CSP befindet sich sowohl das Epitop CSP<sub>245-253</sub>, als auch Hühnerovalbuminepitop OVA<sub>257-264</sub> SIINFEKL (Abb. 3). Dabei dient das OVA-Epitop dem Nachweis der biologischen Aktivität des Moleküls *in vitro*. Die Sequenzen beider Epitope wurden an den Positionen 336 und 108 innerhalb der katalytischen Domäne eingefügt. Die katalytische Aktivität des Toxins wurde durch eine Insertion der Aminosäuren Glycin und Phenylalanin an den Positionen 188 und 189 innerhalb des ATP-bindenden Bereichs inhibiert (Tartz, 2006).

ACT-CSP ermöglichte die Induktion einer spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort in der Maus. Eine einzelne Dosis von ACT-CSP induziert eine systemische CSP-spezifische T-Zellantwort. CSP-spezifische IFN $\gamma$ -produzierende T-Effektorzellen waren in Milz und Leber detektierbar, während keine CSP-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden konnten, die IL-4 oder IL-10 freisetzen (Tartz *et al.*, 2007). Das heißt, die Immunisierung mit ACT-CSP verursachte eine Th1-basierte Immunantwort, gleiches wurde auch für andere rekombinante ACT-Fusionsmoleküle beschrieben (Dadaglio *et al.*, 2000; Schlecht *et al.*, 2004).



**Abbildung 3. ACT-CSP.** Das rekombinante Vakzin ACT-CSP trägt ein Insert des von *P. berghei*-CSP abgeleiteten CD8<sup>+</sup> T-Zellepitops SYIPSAEKI und des OVA-abgeleiteten SIINFEKL Epitop. Das Adenylate Zykklase Toxoid (ACT) transloziert seine aminoterminal katalytische Domäne in der Zytosol CD11b/CD18<sup>+</sup> dendritischer Zellen und bringt das CSP-Epitop in dem MHC-Klasse-I Präsentationsweg ein. Eine ACT-CSP-Anwendung kann IFN $\gamma$ -produzierende CSP-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Maus induzieren. (Tartz *et al.*, 2006).

## 4. Zielsetzung

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es den Einfluss der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (T<sub>Reg</sub>) auf die CSP-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort während der Leberphase einer *Plasmodium berghei* Infektion zu untersuchen.

Zu diesem Zweck sollten T<sub>Reg</sub> zu verschiedenen Zeitpunkten spezifisch depletiert werden. Dafür wurden neuartige BAC-transgene DEREK Mäuse, in welchen die T<sub>Reg</sub> *in vivo* mit Diphtherietoxin depletiert werden können, mit der experimentellen Impfung ACT-CSP immunisiert.

Dieses Projekt soll einen Beitrag zur Beantwortung folgender Kernfragen liefern:

1. Haben T<sub>Reg</sub> einen inhibitorischen Effekt auf die Expansion und die IFN $\gamma$ -Produktion der CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach einer Immunisierung. Welchen Einfluss haben die T<sub>Reg</sub> während des Verlaufs der Malaria? Findet dieser Einfluss im „*priming*“ der T<sub>Eff</sub>, im „*boosting*“ oder im Challenge mit Sporozoiten statt?
2. Erzeugen die Immunisierung mit ACT-CSP und die Depletion der T<sub>Reg</sub> eine spezifische CD8-Memory Antwort? Kann eine Depletion der T<sub>Reg</sub> eine verstärkte Protektion im Verlauf der Leberphase der Malaria induzieren?
3. Kann die Depletion der T<sub>Reg</sub> während der Blutphase der Malaria die Immunantwort verstärken? Führt dies zu einer Pathologie?

## II. Materialien und Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1. Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator für die Zellkultur	Heraeus Instruments, Hanau
Digitalwaage	Kern & Söhne, Alberstadt
Einkanalpipetten	Gilson, Frankreich
	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer (DNA-Gele)	BioRad, München
ELISPOT-Reader	BioSys, Karben-Frankfurt
Durchflusszytometer „FACSAria“	BD Bioscience, USA
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	BD Bioscience, USA
Durchflusszytometrie-Software CELLQuest 3.0	BD Bioscience, USA
Fotoanlage (Geldokumentation)	Mitsubishi, Japan
Inverses Mikroskop	Nikon, Japan
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette „Research Pro“	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Panasonic, Japan
Mikrozentrifuge, 5415	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer (0,1 x 0,0025 mm <sup>2</sup> )	Brandt, Wertheim
pH-Meter	Labortec, Wiesbaden
Reflotron Plus Photometer	Roche Diagnostics, Schweiz
Schüttelinkubator	Infors, Schweiz
Spannungsquelle (Gelelektrophorese)	BioRad, München
Spektralphotometer UV VIS, U-2000	Hitachi, Japan
Sterile Arbeitsbank Laminair HB2448	Heraeus Instruments, Hanau
Szintillationscocktail (Rotiszint eco plus)	Carl Roth, Karlsruhe
β-Szintillationszähler 1205 Betaplate	Wallac, Finnland

Thermocycler	Hybaid, England
Thermomixer, 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischschüttelgerät	IKA Labortechnik, Staufen
Tischzentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
UV-Transilluminator	International Biotechnologies, USA
Wasserbad	Haake, Karlsruhe
Wasserdeionierungsanlage Milli-Q-Plus	Millipore, Frankreich
Zellerntegerät Micro Cell Harvester	Scatron Instruments, Norwegen

## 1.2. Plastikwaren

Kryoröhrchen	Nunc, Dänemark
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, USA
Gewebekulturplatten, 6, 24 und 96 well	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
	Gilson, Frankreich
Plastikküvetten für Photometer	Brandt, Wertheim
Reaktionsgefäße 0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Spritzen und Kanülen	Braun, Melsungen
Sterilfiltriergefäße „Stericup“	Millipore, Bedford, USA
Zellsiebe 70 µm	Falcon/BD Bioscience, USA
Zentrifugenröhrchen 15 mL; 50 mL	Falcon/BD Bioscience, USA

## 1.3. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

## 1.4. Reagenzien

### 1.4.1. Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Agarose	Biomol, Hamburg
Desoxyribonukleosidtriphosphat	MBI Fermentas, St.Leon-Rot

DNA-Marker (100bp-Leiter, 1kb-Leiter)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

#### 1.4.2. Reagenzien für biochemische Arbeiten

Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

#### 1.4.3. Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Avidin-HRP	BD Bioscience, USA
Streptavidin-HRP	BD Bioscience, USA
Cohn II (humane IgG-Fraktion)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diaminobenzidin (DAB)	BioRad, München
Fetales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Eggenstein
IMDM-Medium	PAA, Österreich
Gentamicin	GibcoBRL, Eggenstein
L-Glutamin (200 mM)	GibcoBRL, Eggenstein
<sup>3</sup> H-Thymidin	Amersham Buckinghamshire, UK
GolgiStop	BD Bioscience, USA
Ionomycin (250 ng/mL)	BD Bioscience, USA
Phorbolmyristatacetar (PMA) (10 ng/mL)	BD Bioscience, USA
NycoPrep <sup>TM</sup> Universal	Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	GibcoBRL, Eggenstein
Trypanblau	Serva Feinbiochemika, Hamburg

### 1.5. Enzyme

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase, 1 U/μL	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
------------------------------------	----------------------------

### 1.6. Antikörper

APC, FITC, PerCP und PE Ratte-anti-Maus CD4	BD Bioscience, USA
---	--------------------

APC, FITC, PerCP und PE Ratte-anti-Maus CD8a	BD Bioscience, USA
APC, FITC und PE Ratte-anti-Maus IFN $\gamma$	BD Bioscience, USA
APC, FITC und PE Ratte-anti-Maus IL-2	BD Bioscience, USA
APC, FITC und PE Ratte-anti-Maus IL-10	BD Bioscience, USA
APC, FITC und PE Ratte-anti-Maus TNF $\alpha$	BD Bioscience, USA
PE Ratte-anti-Maus CD19	BD Bioscience, USA
PE Ratte-anti-Maus CD25	BD Bioscience, USA
PE Ratte-anti-Maus CD62L	BD Bioscience, USA
PE Ratte-anti-Maus CD86	BD Bioscience, USA
APC, FITC und PE Ratte-anti-Maus IgG1k (Isotypkontrolle)	BD Bioscience, USA
APC und PE konjugierte anti-Maus TNF $\alpha$	eBioscience, USA
APC und PE konjugierte anti-Maus IL-2	eBioscience, USA
PE und FITC konjugierte anti-Maus/Ratte Foxp3	eBioscience, USA
Hamster anti-Maus CTLA4 (4F10)	J. Bluestone, USA
“Blocking“-Antikörper (IgG1)	BD Bioscience, USA

### 1.7. Diphtherie Toxin

Diphtherietoxin zur Verdünnung 1 mg/mL in PBS	EMD Bioscience, USA
---	---------------------

### 1.8. Medien für eukaryotische Zellen

Fetales Kälberserum (FCS)	vor Gebrauch für 30 Minuten auf 56°C erhitzt (zur Inaktivierung des Komplementsystems)
RPMI 1640 mit 10% FCS	500 mL RPMI 1640 50 mL FCS 5 mL L-Glutamin (200 mM) 2,5 mL Gentamicin

### 1.9. Puffer

#### 1.9.1. Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und für zelluläre Arbeiten vor Gebrauch steril filtriert oder autoklaviert.

### 1.9.2. Puffer und Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten

Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/mL
Natriumacetat-Lösung (pH 4,6)	3M Natriumacetat
50x TAE-Puffer (pH 8,3)	0,6 M Natriumacetat 2 M Tris Base 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA
10x TBE-Puffer (pH 8,0)	0,89 M Tris Base 0,89 M Borsäure 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O
dNTP-Mix für PCR	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dGTP 2 mM dTTP

### 1.9.3. Puffer und Stammlösungen für biochemische Arbeiten

Blockpuffer (ELISPOT)	1% BSA in PBS
Coating-Puffer (ELISPOT) (pH 9,4)	0,1M NaHCO <sub>3</sub>
Diaminobenzidin-Stammlösung DAB (ELISPOT)	40 mg/mL DAB in Aqua dest.
Nickelchlorid-Stammlösung (ELISPOT)	80 mg/mL NiCl <sub>2</sub> in Aqua dest.
20x PBS (pH 7,4)	2,7 M NaCl 54 mM KCl 87 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 30 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Lösung für intrazelluläres FACS	1,6 µL Ionomycin 20 µL PMA (1:250 vorverdünnt) 20 µL Golgi-Stop 960 µL Vollmedium
PBS-Tween (ELISA)	0,1% Tween 20 in 1xPBS
Stoppuffer (ELISA)	2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Substratlösung (ELISPOT)	200 µL DAB

	50 µL NiCl
	2,5 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	10 mL Substratpuffer
Substratpuffer (ELISA) (pH 5,5)	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Substratpuffer (ELISPOT) (pH 7,0)	100 mM Tris
Waschpuffer (ELISA)	0,05% Tween 20 in PBS
Wright's stain	1 mg/mL in Methanol

#### 1.9.4. Puffer und Stammlösungen für zellbiologische Arbeiten

Cohn II-Lösung	10 mg/mL in PBS
Erythrozytenlyse-Puffer (pH 7,5)	10% 0,1 M Tris/HCl, 90% 0,158 M NH <sub>4</sub> Cl
Einfriermedium	50% FCS 40% RPMI mit 10%FCS 10% DMSO
Antikörperlösung zur Färbung von Zellen	1:100 Antikörper (APC, FITC, PE, PerCP) in FACS Puffer
IMDM/10% FCS (Vollmedium)	500 mL IMDM 50 mL FCS 5 mL L-Glutamin (200mM) 2,5 mL Gentamicin
Nycodenz-Lösung 30%	NycoPrep™ in Aqua dest.
Trypanblau-Lösung	2 mg/100 mL in PBS
FACS-Puffer	1x PBS, 5% FCS 0,01% NaN <sub>3</sub>
FACS-Fixierer	4% Paraformaldehyd in PBS

#### 1.10. Peptide

CSP245-253 SYIPSAEKI	MWG BiotechAG, Ebersberg
OVA257-264 SIINFEKL	MWG BiotechAG, Ebersberg

### 1.11. Mäuse

OT-1-Mäuse	Haplotyp H2-Kb, alle CD8 <sup>+</sup> T-Zellen tragen einen transgenen TCR für das OVA-Epitop SIINFEKL (OVA <sub>257-264</sub> ); BNI Hamburg
DEREG Mäuse	Balb/c Hintergrund Haplotyp H2-Kd und C57Bl/6 x Balb/c (F1) Hintergrund Haplotyp H2-Kb und H2-Kd; LMU München, BNI Hamburg

### 1.12. Parasiten

<i>Plasmodium berghei</i> ANKA	Sporozoiten wurden von Prof. Dr. V. Heussler, BNI Hamburg, zur Verfügung gestellt
<i>Plasmodium yoelii</i> 17XNL	Stabilat aus mit <i>P. yoelii</i> Py17XNL (nichtletaler Stamm) infizierten Balb/c Mäusen; J. Langhorne, NIMR, England

## 2. Methoden

### 2.1. Molekularbiologische Methoden

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

Sambrook J., (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

Die Genotypisierung der DEREK Mäuse wurde mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und Durchflusszytometrie durchgeführt.

#### 2.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA (Saiki *et al.*, 1988). Der Grundbaustein dieser Methode ist eine thermostabile DNA-Polymerase, aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq). Diese Polymerase zeichnet sich durch ihre enorme Thermostabilität aus, auch bei Temperaturen von über 95°C bleibt sie stabil (Lawyer *et al.*, 1993).

Eine Matrizen-DNA (Template) wird bei 95°C denaturiert, an deren Einzelstränge sich dann bei einer niedrigeren Temperatur zwei komplementäre Primer anlagern (*annealing*). Bei 72°C wird, an den Primern startend, in 5' - 3' Richtung der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment wird dadurch in jedem Zyklus vervielfältigt und seine Konzentration steigt, unter optimalen Reaktionsbedingungen, theoretisch exponentiell an.

Die PCR-Reaktionen wurden in 0,5 mL Eppendorf-Gefäßen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

durchgeführt:	Ansatz:	Template-DNA	100 ng
		10x Reaktionspuffer	2,5 µL
		MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µL
		dNTP-Mix (2 mM)	2,5 µL
		Sense Primer (10 µM)	2,0 µL
		Antisense Primer (10 µM)	2,0 µL
		Taq-Polymerase (1U/µl)	0,5 mL
		Gesamtvolumen	25,0 µL

Programm:	Zyklen			
	<u>1x</u>	<u>5 min</u>	<u>94°C</u>	<u>Denaturierung</u>
		30 s	94°C	Denaturierung
	30x	30 s	58°C	Annealing
		<u>1 min</u>	<u>72°C</u>	<u>Amplifikation</u>
1x	5 min	72°C	Amplifikation	

Bei der Auswahl der Primer muss darauf geachtet werden, dass diese keine zueinander komplementären oder repetitiven Sequenzen enthalten. Dies könnte zur Ausbildung von Primeroligomeren oder unspezifischem Primerannealing führen. Außerdem sollten die zusammen verwendeten Primer eine ähnliche Schmelztemperatur (Annealingtemperatur) besitzen. Diese wurde mit folgender Formel näherungsweise bestimmt:

$T = 2N (A+T) + 4N (G+C)$       N: Anzahl der Basen; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin

Die verwendete Taq-Polymerase besitzt keine 3' - 5' Exonukleaseaktivität, hat also keine Möglichkeit zur Fehlerkorrektur. Falsche Nukleotide werden mit einer statistischen Häufigkeit von  $2 \times 10^{-4}$  eingebaut.

### 2.1.2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer unterschiedlichen Größe. Die DNA-Moleküle wandern dabei in einem angelegten elektrischen Feld aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphorsäurediestergruppen in Richtung der Anode. Die Geschwindigkeit der linearen DNA-Moleküle im Agarosegel ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Die Konzentration des Agarosegels ist abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, höhere Gelkonzentrationen führen zu einer langsameren, aber spezifischeren Trennung. Hier wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1-2% verwendet, für analytische Gele wurde 1xTBE. Die Detektion der DNA erfolgte mithilfe des Farbstoffs Ethidiumbromid, der den Gelen in einer Endkonzentration von 0,2 µg/mL zugesetzt wurde. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Größenstandards wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker verwendet.

## 2.2. Zellbiologische Methoden

### 2.2.1. Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in CO<sub>2</sub>-Brutschränken bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Lösungen und Labormaterialien aus Kunststoff wurden vor Gebrauch für 20 Minuten bei 135°C und 2,2 bar autoklaviert, Glasgeräte wurden für drei Stunden bei 180°C sterilisiert.

### 2.2.2. 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  $5 \times 10^6$  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, welche über Nacht bei -70 °C gelagert und anschließend in 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. Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden die Zellen unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Lebendzellzahl wurde durch den Trypan Ausschlusstest bestimmt. Dieser beruht auf der Tatsache, dass lebende Zellen den Farbstoff aktiv aus dem Zellinneren ausschließen, während tote Zellen angefärbt werden. Ein Aliquot Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung gemischt und die Zellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

### 2.2.4. Präparation muriner Milzzellen

Die präparierte Milz der Maus wurde mithilfe einer Kanüle mit 5 ml Erythrozytenlysepuffer gründlich durchgespült. Die Zellsuspension wurde anschließend zweimal mit Vollmedium

gewaschen (1200 rpm, 4°C, 10 min), bevor die Zellzahl bestimmt wurde.

#### 2.2.5. Präparation muriner Leberzellen

Vor der Entnahme wurde die Leber über die Pfortader mit 5 mL PBS/10% FCS durchspült. Anschließend wurde die Leber ablatiert und in einem Mörser zerstoßen. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (Cellstrainer, Falcon/Becton Dickinson) gegeben, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten und anschließend bei 1400 rpm und 4°C 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL purem RPMI-Medium und mit 5,5 mL 30% Nycodenz® (Nycoprep) Lösung resuspendiert. Dabei handelt es sich um eine Lösung zur Herstellung von Dichtegradienten zur Aufreinigung von Zellen oder Zellorganellen. Die Suspension wurde anschließend mit 2 mL RPMI-Medium unterschichtet und zur Ausbildung des Dichtegradienten bei 2500 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Die Lymphozytenpopulation konnte anschließend mithilfe einer Pipette abgenommen werden. Die Zellen wurden einmal in RPMI-Medium mit 10% FCS gewaschen (1200 rpm, 4°C, 10 Min), bevor die Zellzahl bestimmt wurde.

#### 2.2.6. Präparation von Zellen aus dem peripheren Blut

Über die Schwanzvene wurde den Mäusen ca. 100 µL Blut entnommen. Dieses wurde in einem EDTA-beschichteten Gefäß gesammelt und mit 10 µL Heparin versetzt, um eine Agglutination zu verhindern. Das Blut wurde mit 10 mL Erythrozytenlyse-Puffer für 5 Min gemischt und anschließend bei 1200 rpm und 4°C für 10 Min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in RPMI mit 5 % FCS aufgenommen.

#### 2.2.7. Stimulation von murinen Milzzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Milzzellen von C57BL/6-OT-I-Mäusen mit SIINFEKL (OVA257-264) *in vitro* stimuliert, um die inhibitorischen Effekte der T<sub>Reg</sub> auf die Proliferation und IL-2-Produktion zu untersuchen. C57BL/6-Milzzellen wurden mit SIINFEKL in Gegenwart verschiedener Konzentrationen gereinigter T<sub>Reg</sub> stimuliert. Dazu wurden je 2x10<sup>5</sup> Milzzellen in jede Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert und in einem Endvolumen von 200 µL kultiviert. Als positiv Kontrolle wurden anti-CD3-Antikörper benutzt und als negativ Kontrolle wurde RPMI 10% FCS verwendet. Nach 48 Stunden Inkubation wurden 150 µL

Kulturüberstand für die Durchführung von Zytokin-ELISA abgenommen, außerdem wurde die Proliferation der Zellen gemessen. Die genauen Stimulationsbedingungen sind dabei an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben.

#### 2.2.8. Enzyme-linked immunoasorbent assay (ELISA)

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Zytokine und Toxine in einer Probe (Blutserum, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zunutze, die an den nachzuweisenden Antigenen binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das Substrat wird vom Enzym umgesetzt und damit kann das Reaktionsprodukt durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist eine Funktion der Antigenkonzentration, sodass ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann (Engvall und Perlman, 1971).

Eine Variante des ELISA (*sandwich-ELISA*) verwendet zwei Antikörper (Ak), die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper (*coating*-Antikörper) wird an eine feste Phase (meist spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die Vertiefungen gegeben und über Nacht inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am *coating*-Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-Antikörper zugegeben, an dessen Ende ein Enzym, meistens Streptavidin-HRP (*horseradish-peroxidase*)-Konjugat, gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen und dann ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder

Chemolumineszenz erfolgen kann. Für quantitative Nachweise wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion, emittierte Intensität) zu erhalten. Die Farbreaktion kann in einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Substrats und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe (Goldsby *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *sandwich*-ELISA dazu verwendet um die Konzentration von Zytokinen (IL-2, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), Zellüberständen und Sera zu quantifizieren. 96-Loch-ELISA-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Capture-Antikörper in *coating*-Puffer beschichtet (50  $\mu$ L/Well). Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden freie Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation der Platten mit 200  $\mu$ L Blockpuffer pro Vertiefung bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgten drei Waschschritte mit Waschpuffer, bevor 50  $\mu$ 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  $\mu$ L des biotinylierten Detektions-Antikörpers inkubiert (in 1x PBS mit 0,1 % BSA verdünnt). 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  $\mu$ 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  $\mu$ L Stopppuffer beendet. Daraufhin wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und anhand des mitgeführten Standards die jeweilige Zytokinkonzentration berechnet.

#### 2.2.9. Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT)

Der ELISPOT ist eine vom ELISA abgewandelte Methode, um einzelne Zytokin- oder Antikörper-produzierende Zellen nachzuweisen (Czersinsky *et al.*, 1983). Er wurde hier zum Nachweis IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen genutzt. Hierfür wurden 96-Loch HSA™ Platten

(Millipore) mit 5 µg/mL anti-IFN $\gamma$ -Antikörper über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit Blockpuffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS wurden 2x10<sup>5</sup> Zellen je Loch zugegeben. Die Zellen wurden nur in Medium inkubiert oder mit 3 µg/mL anti-CD3-Antikörper, 1 µg/mL CSP<sub>245-253</sub> oder 0,1 µg/mL OVA<sub>257-264</sub> für 18 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit 2 µg/mL biotinkonjugiertem anti-IFN $\gamma$ -Antikörper für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurde Avidin-HRP-Konjugat (1:400) für eine Stunde bei 37°C zugegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurde dann die Substratlösung zugegeben. Diese enthält neben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NiCl das Substrat Diaminobenzidin. Das bräunliche Produkt dieses Substrats geht nach der enzymatischen Umsetzung nicht in Lösung, sondern bleibt im reaktiven Zentrum der Peroxidase gebunden und erscheint in Form von dunklen Punkten (Spots). Nach Erreichen einer sichtbaren Färbung wird die Reaktion mit Wasser gestoppt. Die Zahl der Spots kann mithilfe des ELISPOT-Readers bestimmt werden. Das Ergebnis wird in *spot forming units* (Zahl der spots pro 10<sup>5</sup> Zellen) angegeben.

#### 2.2.10. Messung der Zellproliferation

Diese Messung beruht darauf, dass Zellen während der Teilung DNA synthetisieren. Man stellt den Zellen einen radioaktiv markierten Baustein der DNA zur Verfügung (<sup>3</sup>H-Thymidin) und misst anschließend die Radioaktivität. Je stärker Zellen proliferieren, desto mehr <sup>3</sup>H-Thymidin bauen sie ein, und desto höher ist demzufolge die Radioaktivität.

Jeweils 2x10<sup>5</sup> Milzzellen wurden in einem Volumen von 200 µL je Vertiefung einer 96 Loch-Mikrotiterplatte eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden die Milzzellen nur mit Vollmedium inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Milzzellen, die mit dem Peptid OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL) in einer Endkonzentration von 0,1 µg/mL inkubiert wurden. Nach 48 Stunden Kultur wurden je 100 µL Überstand abgenommen und 50 µL <sup>3</sup>H-Thymidin (0,5 µCi je Vertiefung) für weitere 12 Stunden zugegeben. Für die Messung der eingebauten Radioaktivität wurden die Zellen mit einem automatischem Zellerntegerät aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte entnommen und auf einen Glasfaserfilter aufgebracht. Der Glasfaserfilter wurde anschließend 5 Minuten in der Mikrowelle getrocknet, danach in eine Plastikhülle gegeben und mit 5 mL Szintillationsflüssigkeit befeuchtet. Die Aktivität wurde dann mit einem Szintillationszähler

bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde in Zerfällen pro Minute (*counts per minute*, cpm) angegeben.

#### 2.2.11. Durchflusszytometrische Analysen

Das Durchflusszytometer ist ein optoelektrisches Messsystem, das optische Signale unterschiedlicher Ausprägung (Lichtstreuung und Fluoreszenzsignale) detektiert. Im Durchflusszytometer wird die zu analysierende Zellsuspension in Einzelzellsuspension gebracht und die vereinzelt Zellen in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Photomultiplikatoren messen dabei die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärtsstreuung (FSC) korreliert mit der Größe der Zellen, die seitliche Streuung (SSC) mit der Granularität (Nebevon-Caron *et al.*, 2002). Mithilfe der Durchflusszytometrie können zudem unterschiedliche Zellpopulationen anhand ihres Repertoires an Oberflächenmarkern voneinander abgegrenzt werden. Dafür werden Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt, die gegen verschiedene Oberflächenproteine der unterschiedlichen Zellpopulationen gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Die gebräuchlichsten Fluorochrome sind Phycoerythrin (PE), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Allophycocyanin (APC) und Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP).

Die Anfärbungen der Zellen mit Fluorochrom wurden bei 4°C durchgeführt. Pro Färbung wurden  $2 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen durch Zentrifugation (1200rpm, 4 °C, 5 Minuten) pelletiert und der Überstand entsorgt. Anschließend wurde das Pellet in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert und 50 µL Cohn II oder Lösung mit „Blocking“-Antikörper (IgG1, BD Bioscience) zugegeben, um die unspezifischen Bindungsstellen zu belegen. Nach zehn Minuten Inkubation wurden jeder Probe 50 µL Antikörperlösung zur Färbung der Zellen zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Im darauffolgenden Waschvorgang wurden 2 mL FACS-Puffer zugegeben, die Proben durch Zentrifugation (1200rpm, 4 °C, 5 Minuten) pelletiert und der Überstand entsorgt. Im letzten Schritt wurde das Pellet zur Fixierung in 400 µL 1x PBS mit 1% PFA resuspendiert. Nach der Fixierung wurden die Proben bis zur Analyse bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Bei jedem Experiment wurden Färbungen mit Isotyp-Kontrollantikörper durchgeführt, um das Ausmaß einer unspezifischen Antikörperbindung beurteilen zu können.

Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des „FACSCalibur“ Durchflusszytometers und dem Programm „CELLQuest“.

Bei den Auswertungen wurden ausschließlich Zellen im Lymphozyten-Gate berücksichtigt.

#### 2.2.12. Standardwaschschritt für FACS

Fall nicht anders angegeben erfolgten die Waschschritte nach einem standardisierten Protokoll. Die Probe wurde hierbei durch Zentrifugation (1200rpm, 4 °C, 5 Minuten) pelletiert und der Überstand entsorgt. Anschließend erfolgte eine Resuspension in 2 mL FACS-Puffer und eine erneute Pelletierung durch Zentrifugation (1200rpm, 4 °C, 5 Minuten) mit Entsorgung des Überstandes.

#### 2.2.13. Pentamer-Färbung

Die Pentamer-Färbung ermöglicht es antigenspezifische Zellen direkt zu markieren, sodass sie mit der Durchflusszytometrie detektiert werden können.

Ein Pentamer besteht aus fünf gekoppelten MHC-CSP-Peptidkomplexen, die CSP-spezifische Rezeptoren auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen binden. Diese Pentamere sind mit APC markiert und können damit mittels Durchflusszytometrie detektiert werden.

Für die Detektion CSP-spezifischer T-Zellen wurden  $6-8 \times 10^5$  Zellen mit 4 µL des Pentamers inkubiert. Nach zehn Minuten wurde der monoklonale Antikörper anti-CD8 (1:100) für weitere 30 Min zugegeben. Den Zellen wurde 2 mL FACS-Puffer zugegeben, die Proben durch Zentrifugation (1200rpm, 4 °C, 5 Minuten) pelletiert und der Überstand entsorgt. Im letzten Schritt wurde das Pellet zur Fixierung in 400 µL 1x PBS mit 1% PFA resuspendiert. Nach der Fixierung wurden die Proben bis zur Analyse bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

#### 2.2.14. Foxp3 Färbung

Für die intrazelluläre Färbung von Foxp3<sup>+</sup> wurde das Foxp3-PE Staining Kit von eBioscience nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Färbung eingesetzt. Vor der intrazellulären Färbung mit einem anti-Foxp3-Antikörper, wurden die Zellen auf der Oberfläche mit anti-CD4 (1:100) und anti-CD8 (1:100) gefärbt. Den Zellen wurde 2 mL FACS-Puffer zugegeben, die Proben durch Zentrifugation (1200rpm, 4 °C, 5 Minuten) pelletiert und der Überstand entsorgt. Im nächsten Schritt wurde das Pellet über Nacht mit 1 mL Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung (*Foxp3 Staining Kit, eBioscience*) permeabilisiert. Darauf folgte ein erneuter Waschschritt, bei dem die Proben durch

Zentrifugation (1200rpm, 4 °C, 5 Minuten) pelletiert, der Überstand entsorgt, das Pellet in 2 mL FACS-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und pelletiert wurde. Im letzten Schritt wurde das Pellet der Zellen mit 2 mL Permeabilisierung-Puffer (*Foxp3 Staining Kit, eBioscience*) resuspendiert und 1,5 µL anti-Foxp3-Antikörper für 30 Min zugegeben. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 mL Permeabilisierungspuffer gewaschen und mit 250 µL PBS mit 1% PFA fixiert und im Durchflusszytometer analysiert.

#### 2.2.15. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die intrazelluläre Zytokinfärbung ist eine Methode, um Zellen, die peptidspezifisch Zytokine produzieren, durchflusszytometrisch zu erfassen. Hierzu wird die Zytokinfreisetzung durch Zugabe von Golgi-Plaques (Brefeldin A) gehemmt, die Zellmembran permeabilisiert und ein Antikörper gegen das Zytokin (in Fall dieser Arbeit, IL-2, IL-10, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ ) hinzugegeben. Der Antikörper markiert Zellen, die auf eine Peptidstimulierung mit Zytokinproduktion reagiert haben (Böttler, 2005). Für jede Probe wurden 4-5 unterschiedliche Färbungen angefertigt.

Je Probe wurden  $2 \times 10^5$  Zellen verwendet, die durch Zentrifugation (1200rpm, 4 °C, 5 Minuten) pelletiert wurden. Anschließend wurde das Pellet in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert und mit den Stimulanzen, 1 µg/mL CSP<sub>245-253</sub> oder 0,1 µg/mL OVA<sub>257-264</sub>, für 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurde 50 µL Lösung für intrazelluläres FACS pro Probe zugegeben und erneut für 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das darin enthaltene PMA stimuliert die Zytokin Produktion von T-Zellen unabhängig vom T-Zell-Rezeptor. Nach einem Waschschrift erfolgte die Oberflächenfärbung mit 50 µL „Blocking“-Antikörper zusammen mit 50 µL anti-CD4 oder anti-CD8 Antikörper in einer Verdünnung 1:100. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4°C kam ein erneuter Waschvorgang, um daraufhin die Zellen in 200 µL Cytofix/Cytoperm zu resuspendieren. Auf eine Einwirkphase von 15 Minuten bei 4°C und einem Standardwaschschrift folgte ein weiterer Waschschrift mit 2 mL Perm/Wash. Dem Pellet wurde dann zur Durchführung der intrazellulären Färbung Antikörper (IL-2, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) 1:100 in Perm/Wash verdünnt zugegeben und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit Perm/Wash und einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Als letzter Schritt wurde das Pellet zur Fixierung in 400 µL 1x PBS mit 1% PFA resuspendiert. Nach der Fixierung wurden die Proben bis zur Analyse bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Bei jedem Experiment wurden Färbungen mit Isotyp-Kontrollantikörper durchgeführt, um das Ausmaß einer unspezifischen Antikörperbindung beurteilen zu können.

Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des „FACSCalibur“ Durchflusszytometers und dem Programm „CELLQuest“.

Bei den Auswertungen wurden ausschließlich Zellen im Lymphozyten-Gate berücksichtigt.

#### 2.2.16. Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie

Um die Funktionen der  $T_{Reg}$  *in vitro* zu analysieren, wurden diese aus der Gesamtpopulation der Lymphozyten der Milz, abhängig ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzproteinexpression mittels Hochgeschwindigkeitsdurchflusszytometrie (FACSAria) sortiert.

#### 2.2.17. Sortierung $eGFP^+ T_{Reg}$

Die Milzzellen wurden mit einem 70  $\mu m$  Zellsieb gefiltert. Danach wurde ihre Konzentration unter dem Mikroskop mit einer Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellsuspension auf ein Maximum von  $1 \times 10^7$  Zellen/mL verdünnt.

Aus dieser Lösung wurden daraufhin mit dem Hochgeschwindigkeitsdurchflusszytometer (FACSAria) die  $T_{Reg}$  aufgrund ihrer eGFP-Expression aussortiert.

#### 2.2.18. Sortierung $CD8^+ eGFP^+ T_{Reg}$

Hierzu wurden die filtrierten Milzzellen in einer Konzentration von maximal  $1 \times 10^7$  Zellen/mL mit Vollmedium verdünnt und durch die Zugabe von  $500 \mu L/mL$  „Blocking“-Antikörper blockiert. Nach 10 Minuten Inkubation bei  $4^\circ C$  wurde der anti-CD8 Oberflächenantikörper in einer Konzentration von  $5 \mu L/mL$  beigegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei  $4^\circ C$  erfolgte ein Standardwaschschritt. Anschließend wurde das Pellet in 2 mL Vollmedium resuspendiert, die Zellzahl unter dem Mikroskop mit einer Neubauerzählkammer bestimmt und auf eine Maximalkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/mL weiterverdünnt.

Aus dieser Lösung wurden daraufhin mit dem Hochgeschwindigkeitsdurchflusszytometer (FACSAria) die  $CD8^+ eGFP^+ T_{Reg}$  aussortiert.

### **2.3. Tierversuche**

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von der Hamburger Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt. Für alle Versuche wurden weibliche oder männliche, 8 bis 10 Wochen alte DEREK Mäuse (BALB/C oder F1: C57Bl/6 x BALB/C Hintergrund) und Wildtyp Mäuse als Kontrolle (*littermates*) eingesetzt.

### **2.4. Immunisierung mit ACT-CSP**

Die Mäuse wurden mit 20 µg ACT-CSP in 200 µL PBS intraperitoneal (i.p.) immunisiert. Einige Mäuse erhielten nach 21 Tagen eine „Boost“-Immunisierung. In einigen Experimenten wurde der monoklonale Antikörper anti-CTLA4 (4F10) verabreicht. Dafür wurden einen Tag vor der „Prime“- oder der „Boost“-Immunisierung 500 µg Antikörper in 200 µL PBS i.p. injiziert. Sieben Tage bis drei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse entweder zur Organentnahme getötet oder mit *P. berghei* Sporozoitien infiziert (Tartz *et al.*, 2007).

### **2.5. Depletion von T<sub>Reg</sub> *in vivo* mit Diphtherie Toxin (DT)**

Um eine Depletion von T<sub>Reg</sub> zu induzieren, wurde den DEREK und Wildtyp Mäusen 1 µg DT in 200 µL sterilem PBS verdünnt i.p. injiziert. Die Applikation erfolgte an den drei auf die „Prime“- oder „Boost“-Immunisierung folgenden Tagen.

### **2.6. Infektion mit *P. berghei***

Für die Infektion immunisierter Mäuse wurden *P. berghei* Sporozoitien verwendet, die frisch aus den Speicheldrüsen von Anopheles-Mücken präpariert worden waren. Die Sporozoitien wurden 20 bis 25 Tage nach Infektion der Mücken präpariert. Die immunisierten Mäuse wurden mit je 1000 Sporozoitien in 100 µL PBS intravenös (i.v.) in die Schwanzvene infiziert. Zwischen Tag 5 und Tag 12 nach der Infektion wurden regelmäßig Blutausschläge mit aus der Schwanzvene der Mäuse entnommenem Blut hergestellt, um die Parasitämie zu bestimmen. Diese wurden mit Wright's Stain-Lösung angefärbt und die Zahl der infizierten Parasiten mikroskopisch bestimmt. Die Parasitämie wird als prozentualer Anteil der infizierten Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten angegeben. Die infizierten Mäuse wurden jeden Tag beobachtet und moribunde Mäuse wurden getötet.

## **2.7. Infektion mit *P. yoelii* 17XNL**

Eine Infektion mit *P. yoelii* 17XNL läuft in der Regel nicht tödlich ab. Die Immunantwort führt zur Kontrolle der Parasitämie und zur Beseitigung *P. yoelii* 17XNL-infizierter Erythrozyten. Eine zufällig bei der *in vivo*-Mauspassage auftretende *P. yoelii* 17XNL-Variante wurde *P. yoelii* XL genannt, da sie durch einen schnelleren Anstieg der Parasitämie und höhere Letalität, welche etwa 30% in Balb/c-Mäusen ist, gekennzeichnet ist (Lepenius, 2007). Stabilate der Varianten *P. yoelii* 17XNL wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und zur Infektion von Mäusen verwendet. Die Infektion erfolgte durch i.p. Verabreichung von Stabilat, wobei jeder Maus  $5 \times 10^6$  infizierte Erythrozyten injiziert wurden. In regelmäßigen Abständen nach der Infektion wurden zur Bestimmung der Parasitämie Blutausstriche mit Wright's Stain-Lösung gefärbt und die Zahl der infizierten Parasiten mikroskopisch bestimmt. Das Überleben der Mäuse wurde täglich beobachtet, wobei Mäuse moribunde Mäuse getötet wurden.

## **2.8. Blutentnahme und Gewinnung von Serum**

Um Serum für die Bestimmung der Zytokine und Leberenzyme im Verlauf der murinen Malaria zu erhalten, wurden die Mäuse mit Isofluran (Forene®) 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 der Leberenzyme (durchgeführt von Labor Fenner, Hamburg) oder Zytokine im ELISA eingesetzt.

## **2.9. Test zur quantitativen Bestimmung von Transaminasen**

Glutamat-Pyruvat-Transaminase/Alanin-Aminotransferase (GPT) tritt im Zytoplasma, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase/Aspartat-Aminotransferase (GOT) sowohl im Zytoplasma wie auch in den Mitochondrien, der Zellen auf. Bei Zellschädigungen werden beide Enzyme freigesetzt. Erhöhte Transaminasenspiegel können Myokardinfarkt, Hepatopathien, Muskeldystrophie und Organschädigungen anzeigen.

Die GOT- und GPT-Aktivität wird durch das Reflotron Plus Photometer ausgewertet und automatisch berechnet.

Als Auftragsvolumen wurde jeweils 30 µL Serum aus, durch Herzpunktion gewonnenem, Mausblut auf einen Teststreifen aufgetragen. Dieser wurde anschließend zur Analyse in das Reflotron Plus Photometer gegeben.

### **2.10. Mouse Inflammation Kit (CBA)**

Der Cytometric Bead Array (CBA) ist in Verbindung mit der Durchflusszytometrie ein Multiplexanalysewerkzeug um parallel verschiedene Zytokine im Serum zu detektieren. Hierzu werden eine Reihe von Partikeln mit eigenständigen Fluoreszenz-Intensitäten verwendet.

Jede Mikrokugel (Bead) stellt eine Anheftungsfläche für ein spezifisches Zytokin zur Verfügung und entspricht einem entsprechend beschichtetem Probengefäß einer ELISA-Platte. Die Anheftmischung ist in einer Suspension, die es ermöglicht, mehrere Analyten in einem kleinen Probenvolumen in kurzer Zeit zu analysieren. Der CBA Maus-Inflammation Kit kann zur quantitativen Bestimmung von IL-6, IL-10, *monocyte chemoattractant* Protein 1 (MCP-1), IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , und IL-12p70 in einer einzelnen Probe verwendet werden.

50 µL Serum aus, durch Herzpunktion gewonnenem, Mausblut werden mit 50 µL gemischten Anhaftungsmikrokugeln (*capture beads*) und 50 µL Standardlösung in ein FACS-Röhrchen gegeben. Ebenso werden 50 µL Erkennungsreagenz (*Phycoerythrin PE*) beigegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. In einem Waschschrift werden die Proben bei 200g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit 1 mL Waschpuffer resuspendiert und erneut für 5 Minuten bei 200g zentrifugiert. Nach der erneuten Abnahme des Überstandes wird das Pellet in 300 µL Waschpuffer resuspendiert und direkt vor der Analyse für 3-5 Sekunden mit einem Tischschüttler (*Vortex*) durchmischt. Anschließend werden die Proben mit dem „FACSCalibur“ Durchflusszytometer analysiert und mit der CBA Analyse Software oder mit FCAP Array™ Software ausgewertet.

### **2.11. Statistik**

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden t-Test und ANOVA verwendet. Als Signifikanzschwelle wurde ein p-Wert kleiner als 0,05 festgelegt. Zur statistischen Auswertung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven diente der Log-Rank-Test. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt.

### III. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in drei Teile aufgeteilt. Im ersten Teil wird die Kinetik der Depletion von  $T_{Reg}$  durch Diphtherietoxin (DT) in DEREK Mäusen beschrieben und die Funktion der nach der Depletion neu generierten  $T_{Reg}$  untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wird der Einfluss der Depletion der  $T_{Reg}$  auf die Immunantwort während der Immunisierung mit ACT-CSP und auf den Verlauf der *P. berghei* ANKA Infektion beschrieben. Für die Immunisierung wurde Adenylatzyklase Toxoid benutzt, das ein Insert des *P. berghei*-CSP-abgeleiteten  $CD8^+$  T-Zellepitops SYIPSAEKI und des OVA-abgeleiteten SIINFEKL  $CD8^+$  T-Zellepitops trägt (Abb. 3). CSP wird in  $H-2K^d$  präsentiert (Aminosäurereste 245 bis 253 von CSP) und SIINFEKL wird im Kontext von  $H-2K^b$  präsentiert (Aminosäurereste 257 bis 264 von OVA). Das SIINFEKL-Peptid wurde in verschiedenen Studien als Modellantigen benutzt (Tartz, 2006).

Die F1 Generation aus der Verpaarung von männlichen DEREK Mäusen mit C57BL/6 Hintergrund und weiblichen Wildtyp Balb/c Mäusen (F1 DEREK) wurde für die initialen Experimente verwendet. Die Zellen aus diesen Mäusen exprimieren die MHC-Klasse-I Moleküle  $H-2K^b$  und  $H-2K^d$ , was die simultane Charakterisierung der T-Zellantworten gegen *P. berghei*-CSP ( $H-2K^d$ ) und SIINFEKL-Peptid ( $H-2K^b$ ) erlaubt.

Der dritte Teil behandelt die Untersuchung der Rolle der  $T_{Reg}$  bei der Immunantwort im Verlauf der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL Stamm.

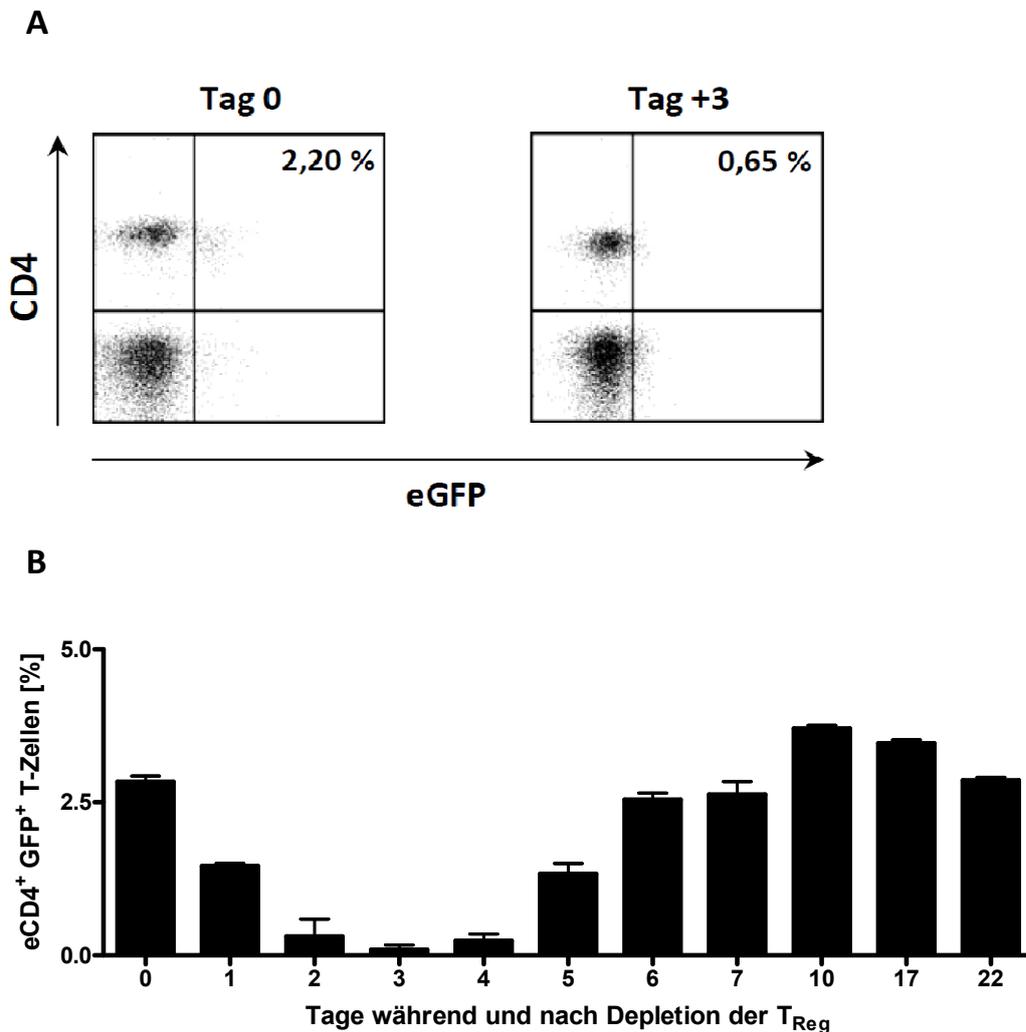
#### 1. Kinetik und Funktion der $T_{Reg}$ während und nach der Depletion mit DT

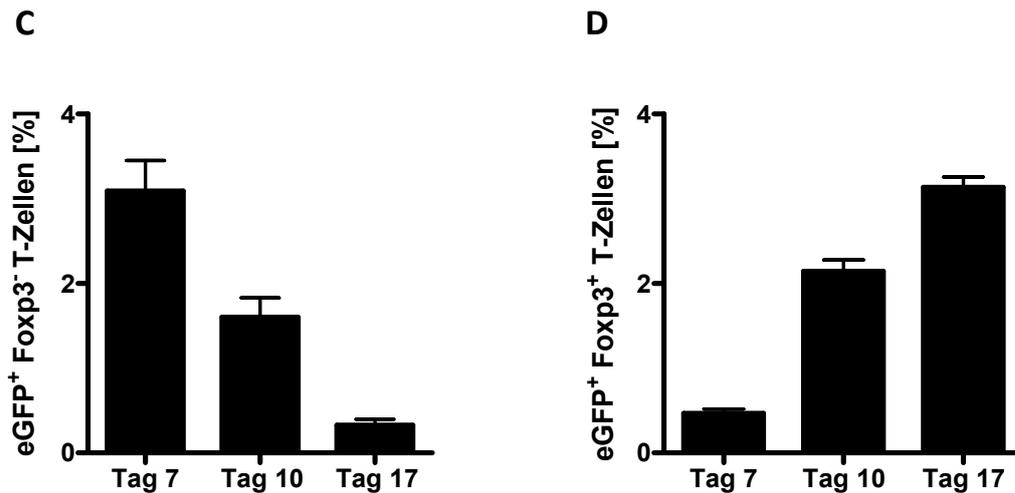
##### 1.1. Kinetik der Depletion der $T_{Reg}$ in DEREK Mäusen

$eGFP^+$   $Foxp3^+$   $T_{Reg}$  können durch die i.p. Applikation von Diphtherietoxin (DT) in DEREK Mäusen depletiert werden. Der Prozentsatz an  $CD4^+$  $Foxp3^+$   $T_{Reg}$  in den Lymphozyten in Milz und Blut sinkt einen Tag nach der Depletion von ungefähr 3% auf unter 1% (Abb. 4 A). Verschiedene Protokolle für die Depletion der  $T_{Reg}$  wurden verglichen (Daten nicht gezeigt). Am effizientesten erwies sich die Depletion an drei aufeinanderfolgenden Tagen (+1, +2 und +3). Dadurch sank die Anzahl der  $T_{Reg}$  auf unter 1%, was für eine Dauer von drei bis vier Tagen anhielt (Abb. 4 B). Die Anzahl an  $eGFP^+$  T-Zellen korrelierte mit der Anzahl an  $Foxp3^+$

T-Zellen. Die Zahl der eGFP<sup>+</sup> T-Zellen begann von Tag +4 auf Tag +5 zu steigen und erreichte zwischen Tag +6 und +7 das Ausgangsniveau. Am Tag +10 lag die Anzahl von eGFP<sup>+</sup> T-Zellen deutlich über dem Ausgangsniveau und normalisierte sich zwischen Tag +17 und Tag +22.

Es konnte durch den Vergleich der Anzahl der eGFP<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> und eGFP<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden, dass, nach der Depletion, die eGFP-Expression früher als die Foxp3-Expression wieder beginnt. Die bis Tag +7 analysierten eGFP<sup>+</sup> T-Zellen waren größtenteils Foxp3<sup>-</sup>, am Tag +10 konnte eine Abnahme der Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen und ein steigender Anteil an Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Diesem Trend folgend bestand die eGFP<sup>+</sup> T-Zellpopulation am Tag +17 fast ausschließlich aus eGFP<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 4 B, 4 C, 4 D).



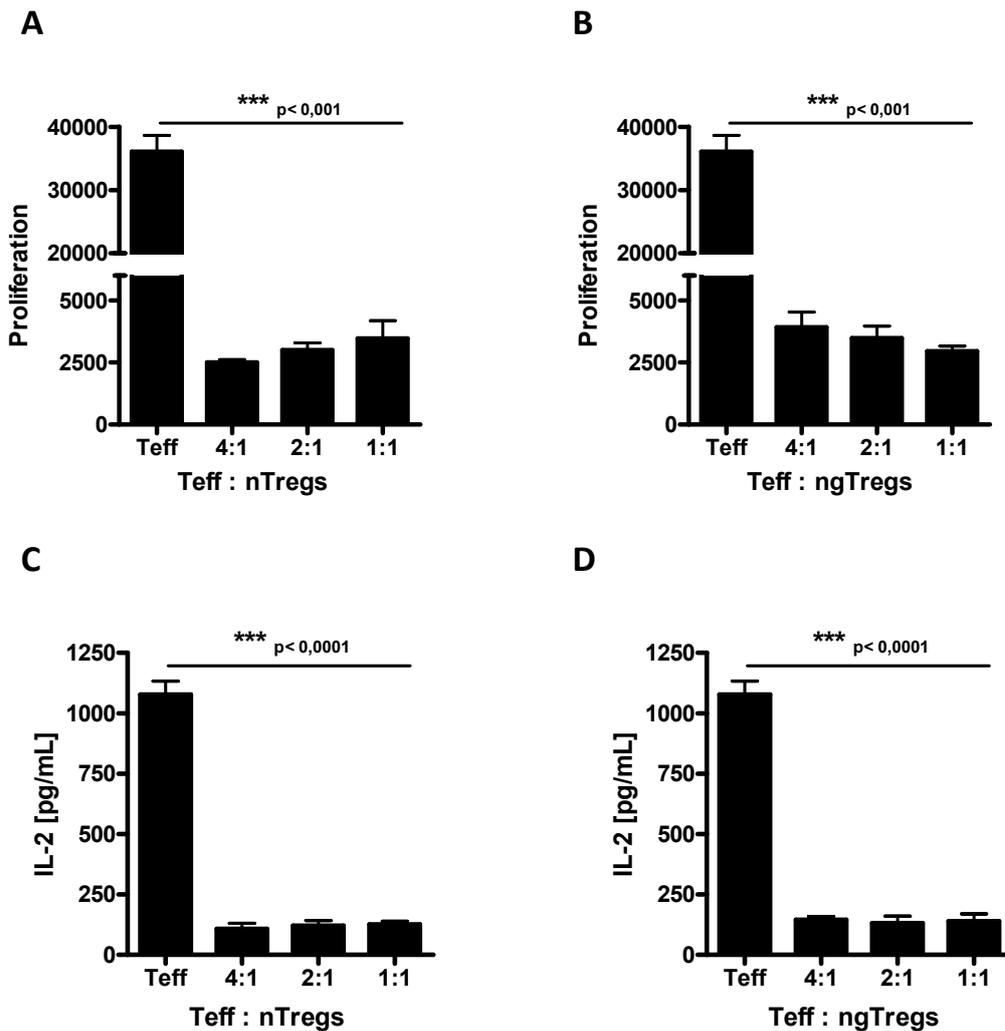


**Abbildung 4: Kinetik der T<sub>Reg</sub> während und nach der Depletion mit DT.** Durchflusszytometrische Analysen von Blut aus Balb/c DEREK Mäusen, die an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt wurden (Depletion der T<sub>Reg</sub>). Blutzellen wurden mit APC-anti-CD4-Antikörper und PE-anti-Foxp3-Antikörper markiert und die Zellen im Lymphozytengate analysiert. (A) „Dotplot“ einer Probe vor der Depletion (T<sub>Reg</sub> (im Quadrant „UR“) = 2,20% der Lymphozyten) und „Dotplot“ einer Probe am Tag +3 der Depletion (T<sub>Reg</sub> (im Quadrant „UR“) = 0,65% der Lymphozyten). (B) Kinetik der CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> während und nach der Depletion; n= 2. (C) Anzahl an eGFP<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T<sub>Reg</sub> nach der Depletion; n= 2. (D) Anzahl an eGFP<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> nach der Depletion; n= 2.

## 1.2. Effekte der nach der Depletion neu generierten T<sub>Reg</sub>

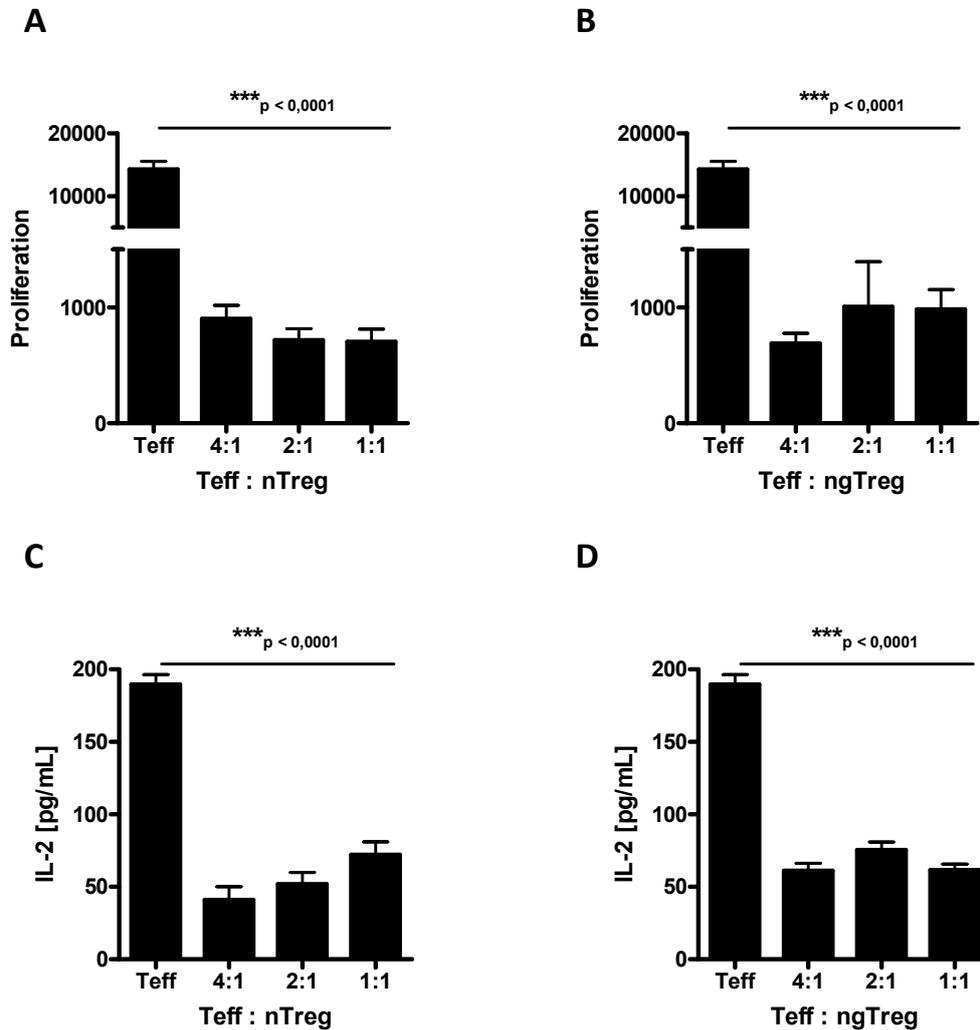
Nach der zeitweisen Depletion der T<sub>Reg</sub> mit DT in DEREK Mäusen hat sich das Niveau der eGFP<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> in den depletierten Mäusen nach etwa 17 Tagen wieder normalisiert. Derzeit ist nicht bekannt, ob dies auf die Proliferation der restlichen, nicht depletierten, T<sub>Reg</sub>, einer Proliferation der aus dem Thymus stammender T<sub>Reg</sub> oder einer Konversion konventioneller T-Zellen zurückzuführen ist. Hier sollte untersucht werden, ob die nach der Depletion neugenerierten T<sub>Reg</sub> eine vergleichbare regulatorische Kapazität wie die initiale T<sub>Reg</sub>-Population hatte. Zu diesem Zweck wurden DEREK Mäuse mit DT depletiert und T<sub>Reg</sub> dreißig Tage nach der Depletion mittels durchflusszytometrischer Analyse anhand ihrer eGFP-Expression sortiert. In ähnlicher Weise wurden eGFP<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> von nicht depletierten DEREK Mäusen sortiert.

Milzzellen aus OT-1-Mäusen, deren CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen transgenen TCR für das OVA-Epitop SIINFEKL (OVA<sub>257-264</sub>) tragen, wurden mit SIINFEKL-Peptid stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen von eGFP<sup>+</sup> natürlichen T<sub>Reg</sub> (nT<sub>Reg</sub>) oder mit nach der Depletion neugenerierten T<sub>Reg</sub> (ngT<sub>Reg</sub>) inkubiert. Die nT<sub>Reg</sub> und die ngT<sub>Reg</sub> zeigten eine vergleichbare suppressive Aktivität und haben die Produktion von IL-2 und die Proliferation von OT-1 T-Zellen inhibiert (Abb. 5). Dadurch wurde gezeigt, dass die ngT<sub>Reg</sub> funktionell waren.



**Abbildung 5: Nach der Depletion neugenerierte  $T_{Reg}$  ( $ngT_{Reg}$ ) sind funktionell.** Proliferation von T-Effektorzellen ( $T_{Eff}$ ) aus der Milz von OT-I Mäusen, stimuliert mit SIINFEKL-Peptid in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von  $T_{Reg}$  aus der Milz von F1 DEREK Mäusen. Nach 48 h Stimulierung mit SIINFEKL-Peptid wurde der  $^3H$ -Thymidineinbau in den Zellen und die IL-2 Konzentration der Überstände mit Hilfe des ELISA bestimmt. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet.  $nT_{Reg}$ : natürliche  $T_{Reg}$ ;  $ngT_{Reg}$ : nach der Depletion neugenerierte  $T_{Reg}$ . (A) Proliferation von  $2 \times 10^5$   $T_{Eff}$  aus OT-I Mäusen unter Zugaben verschiedener Mengen an  $T_{Reg}$  aus nicht depletierten DEREK Mäusen und (C) Bestimmung der IL-2 Konzentration. (B) Proliferation von  $2 \times 10^5$   $T_{Eff}$  aus OT-I Mäusen unter Zugaben verschiedener Mengen an  $T_{Reg}$  gewonnen am Tag +22 aus, an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelten (depletierten), DEREK Mäusen und (D) Bestimmung der IL-2 Konzentration.

ngT<sub>Reg</sub> konnten die unspezifische Proliferation der mit anti-CD3 Antikörper stimulierten T-Effektorzellen und ihre Produktion von IL-2 supprimieren (Abb. 6).



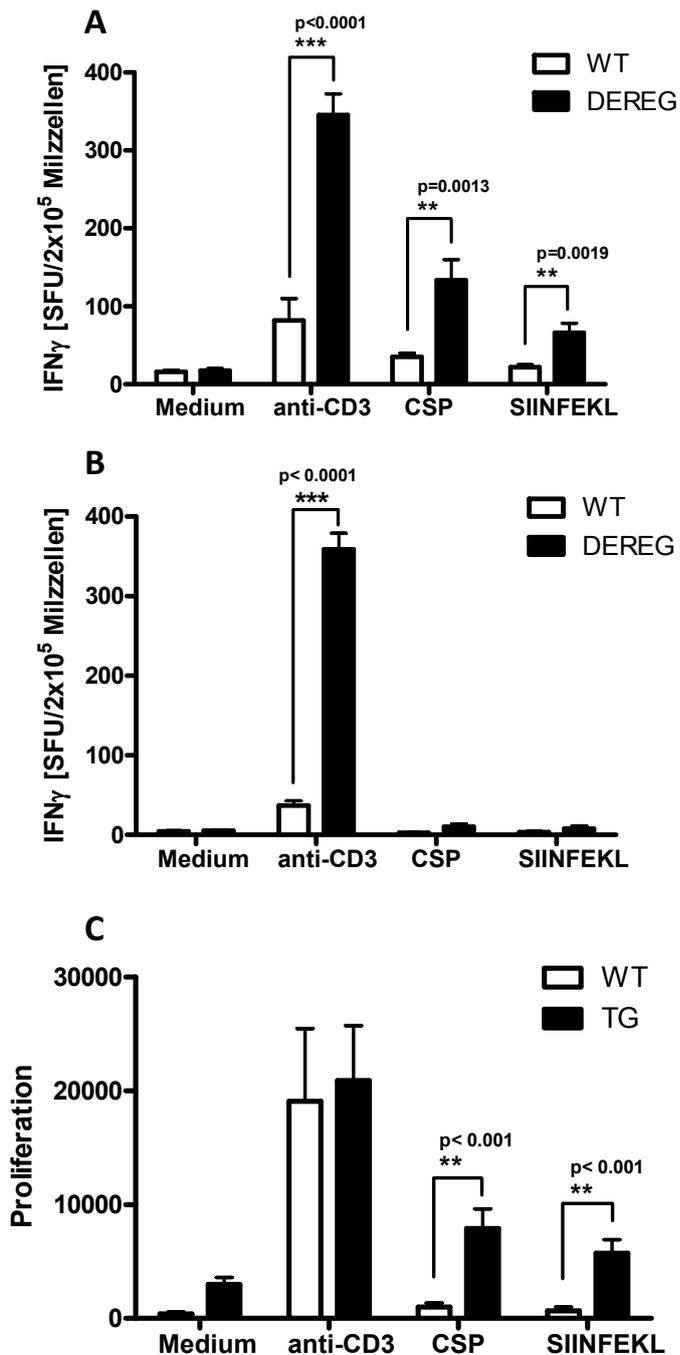
**Abbildung 6: Supprimierung der Proliferation der T<sub>Eff</sub> und ihrer IL-2 Produktion durch ngT<sub>Reg</sub>.** Proliferation von T<sub>Eff</sub> aus der Milz von Balb/c DEREg Mäusen, stimuliert mit anti-CD3-Antikörper, in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von T<sub>Reg</sub> aus der Milz von DEREg Mäusen. Nach 48 h Stimulierung mit SIINFEKL-Peptid wurde die <sup>3</sup>H-Thymidin Einschluss in den Zellen und die IL-2 Konzentration der Überstände mit ELISA bestimmt. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. (A) Proliferation von 2 x 10<sup>5</sup> T<sub>Eff</sub> aus DEREg Mäusen unter Zugaben verschiedener Mengen an T<sub>Reg</sub> aus nicht depletierten DEREg Mäusen und (C) Bestimmung der IL-2 Konzentration. (B) Proliferation von 2 x 10<sup>5</sup> T<sub>Eff</sub> aus DEREg Mäusen unter Zugaben verschiedener Mengen an T<sub>Reg</sub> gewonnen am Tag +22 aus, an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelten (depletierten), DEREg Mäusen und (D) Bestimmung der IL-2 Konzentration.

## 2. Depletion der T<sub>Reg</sub> während der Leberphase der Malaria

### 2.1. Effekte der Depletion der T<sub>Reg</sub> während der „Prime“- Immunisierung

ACT-CSP induziert eine CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort. Wie eine vorangegangene Studie gezeigt hat (Tartz *et al.*, 2007), kann eine einzige ACT-CSP-Anwendung IFN $\gamma$ -produzierende CSP-spezifische T-Zellen induzieren. Um die Frage zu beantworten, ob T<sub>Reg</sub> die spezifische Immunantwort nach der Immunisierung mit ACT-CSP kontrollieren können, wurde ein Protokoll etabliert, in dem die Mäuse am Tag 0 immunisiert und dann die T<sub>Reg</sub> an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT depletiert wurden. Dieses Protokoll wurde gewählt, da in diesem Zeitraum das Priming und die stärkste Expansion der T-Zellen im Verlauf einer Immunisierung zu erwarten sind (Abb. 4 B).

Die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden CSP-spezifischen T-Zellen wurde durch einen IFN $\gamma$ -spezifischen ELISPOT bestimmt. F1 Wildtyp Mäuse, welchen DT appliziert wurde und die i.p. mit ACT-CSP immunisiert wurden, zeigten eine Induktion von CSP- und SIINFEKL-spezifischen T-Zellen in der Milz, welche nach der Restimulierung IFN $\gamma$ -produzieren. In F1 DEREK Mäusen führt dieses Protokoll zu einer weitaus stärkeren Erhöhung der IFN $\gamma$ -Produktion als in Wildtyp Mäusen (Abb. 7 A). Im Gegensatz dazu zeigten die Wildtyp Mäuse, welche nicht immunisiert wurden, keine Erhöhung der spezifischen Antwort nach der Restimulierung (Abb. 7 B). Eine erhöhte antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellproliferation wurde nach der Restimulierung von Milzlymphozyten gefunden (Abb. 7 C).



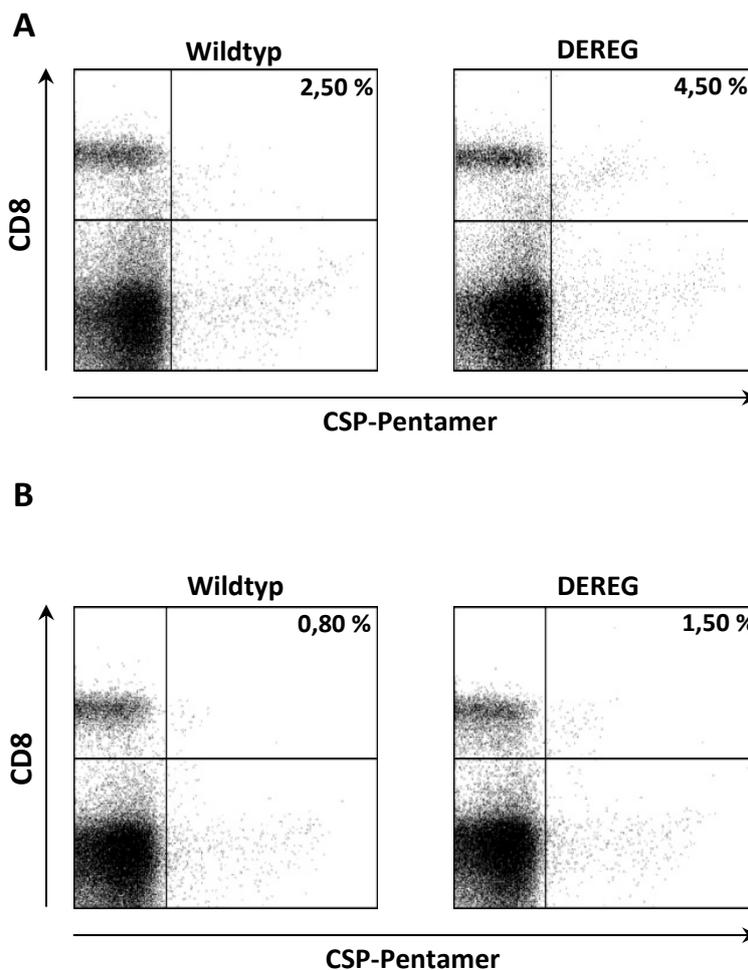
**Abbildung 7: Depletion der T<sub>Reg</sub> während der „Prime“ Immunisierung mit ACT-CSP.**

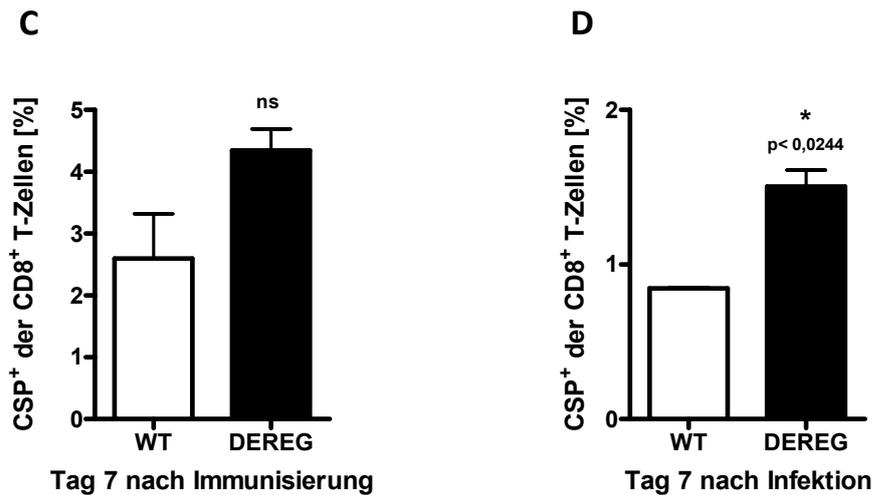
IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT und Proliferationsanalyse, durch Bestimmung des <sup>3</sup>H-Thymidineinbaus, von Milzzellen aus F1 DEREG und Wildtyp Mäusen. Gezeigt werden die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen und die Proliferation nach der Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper, CSP-Peptid und SIINFEKL-Peptid. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. SFU= „spot forming units“. (A) IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT von am Tag +7 gewonnenen Milzzellen aus F1 DEREG und Wildtyp Mäuse, die am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt wurden; n = 3. (B) Kontrollelexperiment ohne Immunisierung. IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT von am Tag +7 gewonnenen Milzzellen aus F1 DEREG und Wildtyp Mäuse, die am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt wurden; n = 3. (C) Proliferation von 2 x 10<sup>5</sup> T-Zellen am Tag +7; n=5.

Um zu evaluieren, ob die Anzahl an CSP-spezifischen T-Zellen durch die Depletion der T<sub>Reg</sub> erhöht wurde, wurden Milzzellen mittels MHC-Klasse-I-Multimer-Technologie angefärbt und mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Dafür wurde ein H2-K<sup>d</sup>-Pentamer verwendet, das mit dem Peptid SYIPSAEKI (CSP<sub>245-253</sub>) beladen und mit dem Farbstoff Allophycocyanin (APC) markiert wurde, was zu einer einfachen Detektion in der durchflusszytometrischen Analyse führte. Das H2-K<sup>d</sup> / SYIPSAEKI-Pentamer ermöglicht die Detektion einzelner T-Zellen, deren T-Zellrezeptor spezifisch das CSP-Epitop SYPSAEKI auf MHC-I Molekülen erkennt (Abb. 8 A und B).

Nach der Depletion der T<sub>Reg</sub> konnte in mit ACT-CSP immunisierten DEREK Mäusen eine höhere Anzahl von CSP-spezifischen T-Zellen als in Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden. Diese Mäuse wurden am Tag 0 mit ACT-CSP immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Am Tag +7 wurde der Anteil an CSP<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz mit durchflusszytometrischer Analyse bestimmt (Abb. 8 C).

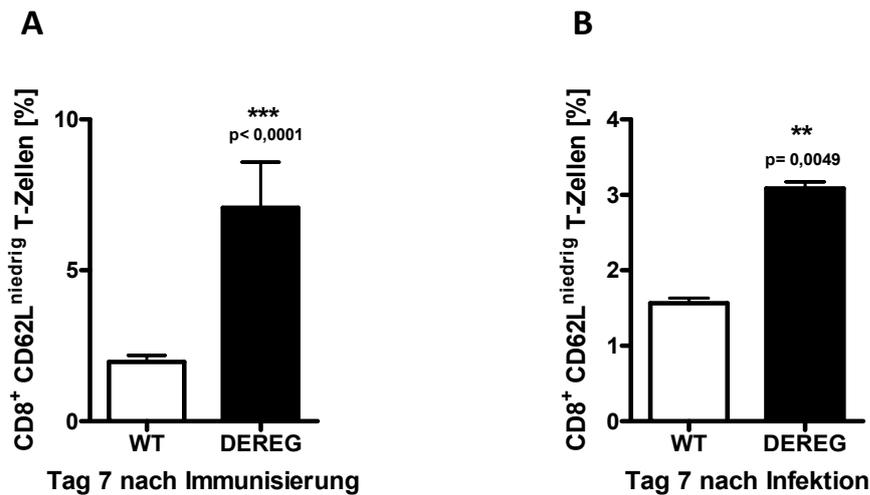
In einem weiteren Versuch wurden DEREK und Wildtyp Mäuse am Tag 0 mit *P. berghei* ANKA infiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Am Tag +7 wurde der Anteil an CSP<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz mit durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Auch in diesem Experiment konnte in den DEREK Mäusen eine erhöhte Anzahl von CSP-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 8 D).





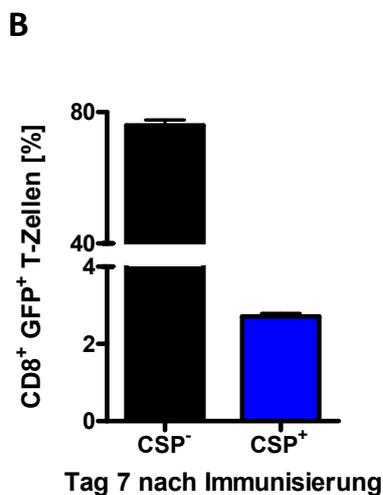
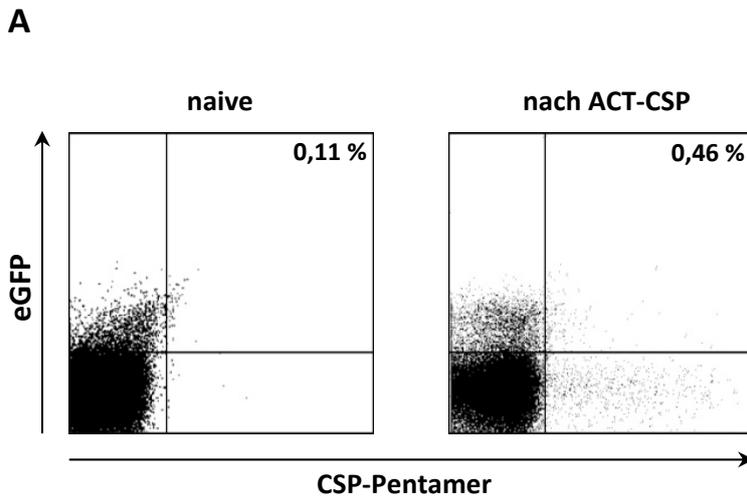
**Abbildung 8. Durchflusszytometrische Analyse CSP-spezifischer T-Zellen.** Milzzellen aus BALB/c-Mäusen wurden mit einem APC-H2-K<sup>d</sup>/CSP<sub>245-253</sub>-Pentamer sowie PerCP-anti-CD8-Antikörper gefärbt und mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse ihr Anteil im CD8<sup>+</sup> T-Zellgate bestimmt. DEREK und Wildtyp Mäusen wurden am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert oder mit 1000 Sporozysten von *P. berghei* ANKA infiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +7 wurde eine durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen durchgeführt. (A) „Dotplot“ einer Wildtyp und einer DEREK Maus nach der Immunisierung. (B) „Dotplot“ einer Wildtyp und einer DEREK Maus nach der Infektion. (C) Anzahl der CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in immunisierten Mäusen; n = 2. (D) Anzahl der CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in infizierten Mäusen; n = 2. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet.

Um den Effekt der Depletion der T<sub>Reg</sub> auf die T-Zellaktivierung im Verlauf der Immunisierung mit ACT-CSP bzw. im Verlauf der Infektion mit *P. berghei* näher zu untersuchen, wurde am Tag +7. der Anteil der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl an T-Zellen in der Milz bestimmt (Abb. 9). Dabei zeigte sich, dass bei der Immunisierung bzw. Infektion mit *P. berghei* nach der Depletion der T<sub>Reg</sub> ein größerer Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen aktivierten Phänotyp (CD62L<sup>niedrig</sup>) aufwies. Die Depletion der T<sub>Reg</sub> führte auch zu einem höheren Anteil aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz, der aber im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich war (Daten nicht gezeigt).



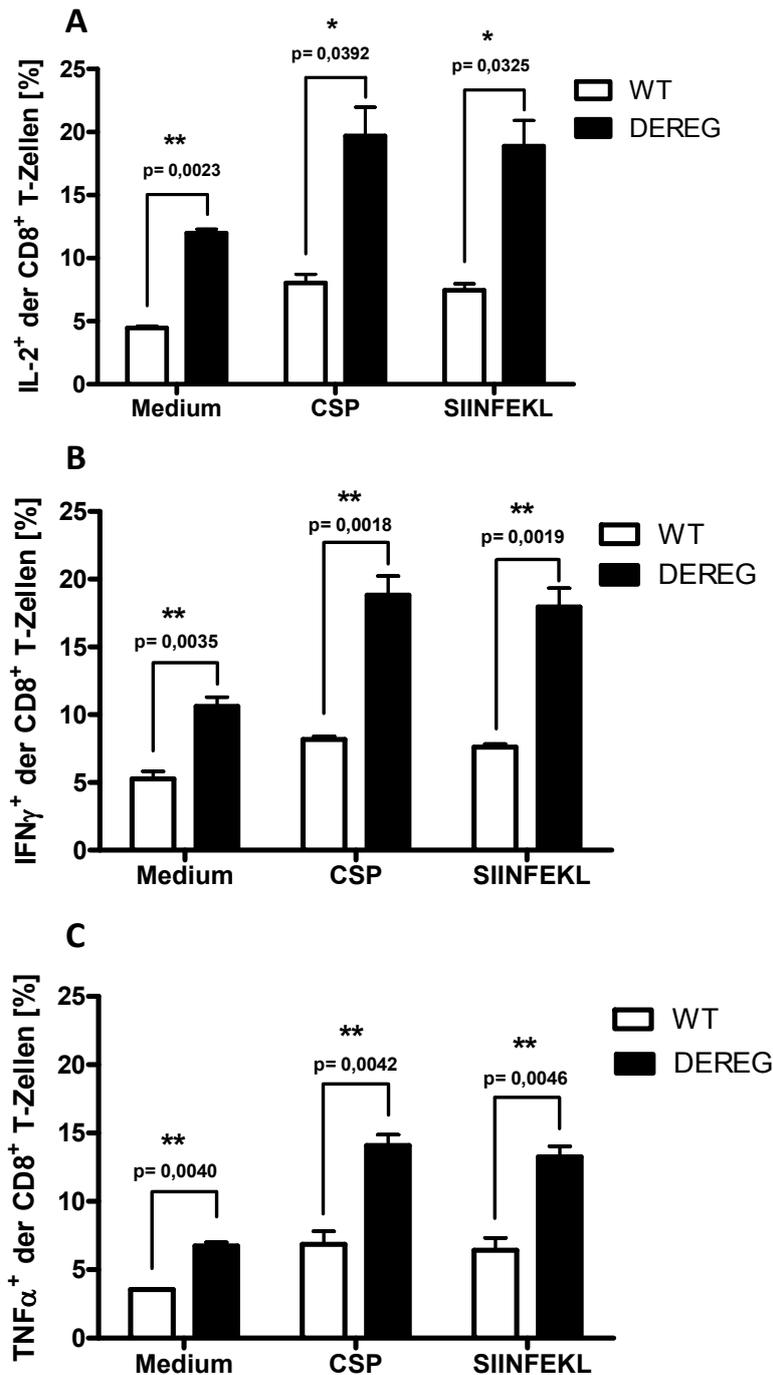
**Abbildung 9. Gesteigerte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Depletion der T<sub>Reg</sub><sup>+</sup>.** Balb/c DEREG und Wildtyp Mäusen wurden am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert oder mit 1000 Sporozoiten von *P. berghei* ANKA infiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +7 wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD62L auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse von Milzzellen bestimmt. Milzzellen wurden mit APC-anti-CD8-Antikörper und PE-anti-CD62L-Antikörper gefärbt. Der prozentuale Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl an Milzzellen ist aufgetragen, dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler der Mäuse in jeder Gruppe. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test (paired, two-tailed) berechnet; n = 3. (A) CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>niedrig</sup> T-Zellen in immunisierten Mäusen; n = 3. (B) CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>niedrig</sup> T-Zellen in infizierten Mäusen; n = 3.

Des weiteren erlaubte die CSP-Pentamer-Färbung die Bestimmung einer Population spezifischer CD8<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> in immunisierten DEREG Mäusen. Dafür wurden DEREG Mäuse am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert. Am Tag +7 wurden Milzzellen aus den Mäusen mit einem CSP-Pentamer sowie PE-anti-CD8-Antikörper gefärbt und eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt (Abb. 10).



**Abbildung 10. Durchflusszytometrische Analyse wies eine CSP-spezifische CD8<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> Population auf.** Milzzellen aus BALB/c DEREK Mäusen wurden mit einem APC-H2-K<sup>d</sup>/CSP<sub>245-253</sub>-Pentamer sowie PE-anti-CD8-Antikörper gefärbt. Die DEREK Mäuse wurden am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert. Am Tag +7 wurde eine durchflusszytometrische Analyse, im CD8<sup>+</sup> T-Zellgate, durchgeführt. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. (A) „Dotplot“ einer naiven und einer immunisierten DEREK Maus. (B) Prozentualer Anteil der CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> an der gesamten CD8<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> in immunisierten DEREK Mäusen; n = 2.

Die Wirksamkeit einer impfinduzierten Immunantwort kann abhängig von der spezifischen Produktion anderer Zytokine als IFN $\gamma$  sein (von der Weid und Langhorne, 1993). Daher wurde analysiert, ob eine Depletion der T<sub>Reg</sub> auch die Produktion anderer Zytokine vermehrt stimulieren kann. Mittels intrazellulärer durchflusszytometrischer Analyse wurde eine durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifische signifikante Produktion von IL-2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  nach Restimulation mit CSP- und SIINFEKL-Peptiden nachgewiesen (Abb. 11).

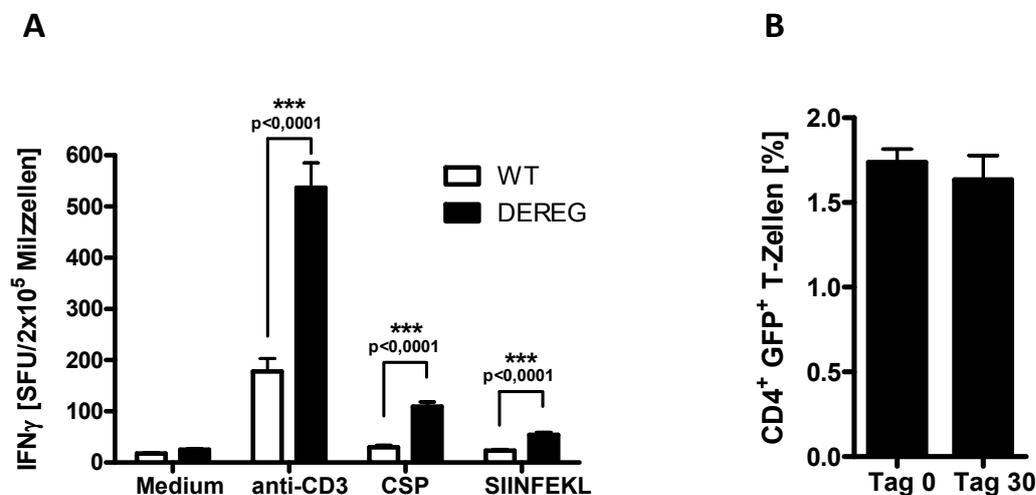


**Abbildung 11: Einfluss der Depletion der T<sub>Reg</sub> auf die Zytokinproduktion von CSP-spezifischen T-Zellen.** Balb/c Dereg und Wildtyp Mäusen wurden am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +7 wurde eine intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen, im CD8<sup>+</sup> T-Zellgate, durchgeführt. Die Zellen wurden mit APC-anti-CD8-Antikörper, PE-anti-IFN $\gamma$ -Antikörper, PE-anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und PE-anti-IL-2-Antikörper gefärbt. Gezeigt werden die zytokinproduzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach 6 h Stimulierung mit CSP- und SIINFEKL-Peptid. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. (A) IFN $\gamma$  produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen; n = 3. (B) TNF $\alpha$  produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen; n = 3. (C) IL-2 produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen n = 3.

## 2.2. Effekte der Depletion der T<sub>Reg</sub> auf CSP-spezifische Memory-Antworten

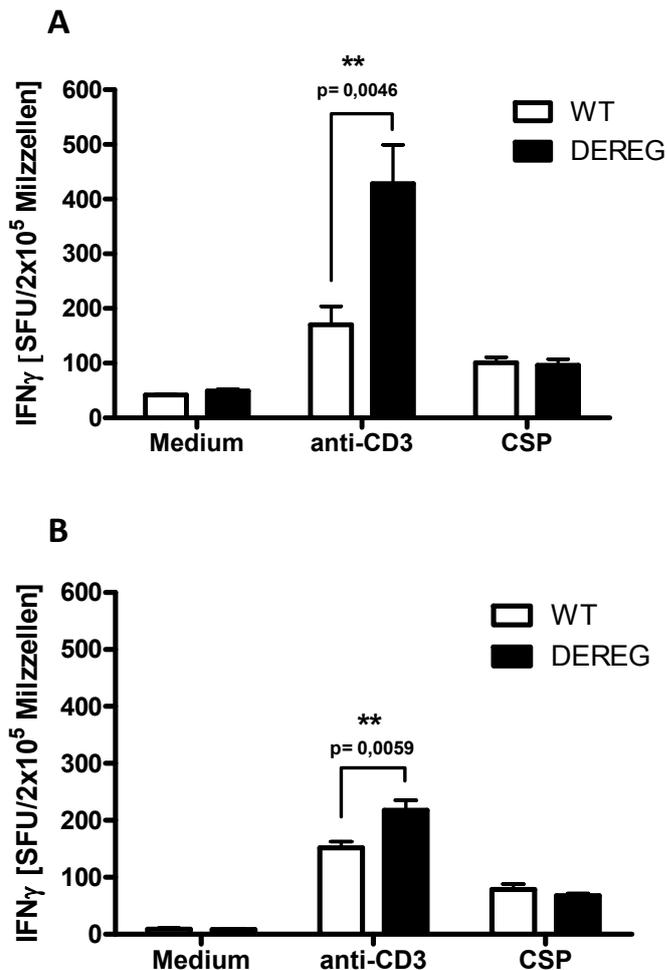
Nachdem gezeigt wurde, dass eine verstärkte Aktivierung von T-Effektorzellen nach einer Depletion der T<sub>Reg</sub> stattfindet, stellte sich die Frage, ob die Depletion der T<sub>Reg</sub> zusammen mit der Immunisierung eine Memory-Antwort vermitteln kann. Dafür wurden in den folgenden Experimenten DEREg und Wildtyp Mäuse am Tag 0 mit ACT-CSP immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Nach 4 bzw. 6, 9 und 12 Wochen wurde mittels einem IFN $\gamma$ -spezifischen ELISPOT die Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen in der Milz bestimmt (Abb. 12 und 13).

Obwohl die T<sub>Reg</sub> zwischen drei und vier Tagen nach der letzten DT Applikation, also am Tag +6 bzw. +7 nach der Immunisierung, ihr Ausgangsniveau erreichten (Abb. 4 B), konnte an den Tagen +10 bis +12 eine Hyperproliferation nachgewiesen werden. Zwischen Tag +17 und Tag +22 kehrte die T<sub>Reg</sub> Population wieder auf ihr initiales Niveau zurück. Trotz dieser Normalisierung der T<sub>Reg</sub> Population, hielt die verstärkte impfinduzierte Immunantwort für ungefähr vier Wochen nach der Immunisierung mit ACT-CSP in DEREg Mäusen an (Abb. 12).



**Abbildung 12. Persistenz der Immunantwort trotz Normalisierung der Anzahl der T<sub>Reg</sub> nach der Depletion.** F1 DEREg und Wildtyp Mäusen wurden am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +30 wurde ein IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT von Milzzellen durchgeführt. Gezeigt werden die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper, CSP-Peptid und SIINFEKL-Peptid. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. (A) IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT; n = 3. DEREg Mäuse wurden an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. An den Tagen 0 und +30 wurde eine durchflusszytometrische Analyse von Blutzellen, im Lymphozytengate, durchgeführt. Die Zellen wurden mit APC-anti-CD4-Antikörper gefärbt. (B) Anzahl der CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> vor der Depletion (Tag 0) und nach der Depletion (Tag +30); n= 4.

Die durch die transiente Depletion von T<sub>Reg</sub> verstärkte Immunantwort hat jedoch die Entwicklung einer Langzeitimmunität nicht gefördert. 6 Wochen nach der Immunisierung, wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an CSP-spezifischen IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen zwischen den Wildtyp Mäusen und den DERE $\gamma$  Mäusen mehr gefunden (Abb. 13). Damit induziert die Depletion der T<sub>Reg</sub> zwar eine starke Expansion von T-Zellen, diese führt aber nicht zu einer besseren CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup>-Memory-T-Zell-Antwort.

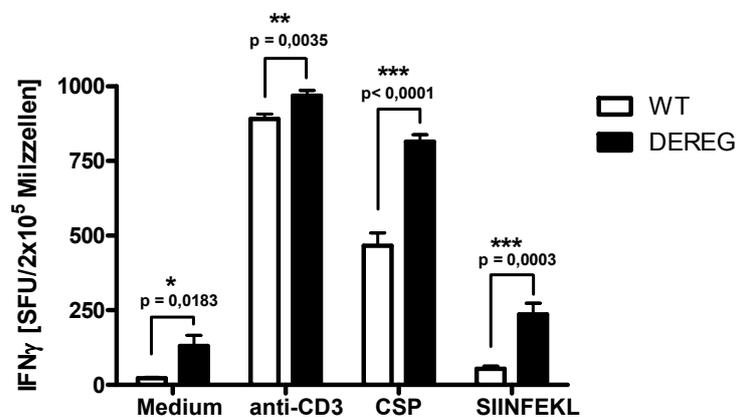


**Abbildung 13. Depletion der T<sub>Reg</sub> hat die Memory-T-Zellantwort nach Immunisierung mit ACT-CSP nicht verbessert.** Balb/c DERE $\gamma$  und Wildtyp Mäuse wurden am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt. Nach sechs Wochen (Tag +42) und neun Wochen (Tag +63) wurden IFN $\gamma$ -spezifische ELISPOT Analysen von Milzzellen durchgeführt. Gezeigt werden die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper und CSP-Peptid. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. (A) IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT am Tag +42; n = 3. (B) IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT am Tag +63; n = 3.

### 2.3. Effekte der Depletion der T<sub>Reg</sub> in der Immunantwort gegen bestrahlte Sporoziten von *P. berghei*

Die „Gold Standard“ Vakzine in der Malariaforschung ist die Immunisierung mit durch  $\gamma$ -Bestrahlung attenuierten Sporoziten. Die bestrahlten Sporoziten stellen ein potentes Vakzin dar, das eine effektive parasitenspezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort induziert, welche mit einer protektiven Wirkung assoziiert ist. Diese Sporoziten vermehren sich in den Hepatozyten und erlauben die Entwicklung einer starken Immunität in verschiedenen Mausmodellen, ohne eine infektiöse Blutphase zu induzieren (Hoffmann *et al.*, 1990; Engwerda und Good, 2008).

Deshalb wurde auch die Antwort gegen bestrahlte Sporoziten im Zusammenhang mit einer Depletion von T<sub>Reg</sub> analysiert. DEREK und Wildtyp Mäuse wurden am Tag 0 mit 10 000  $\gamma$ -bestrahlten Sporoziten von *P. berghei* immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Am Tag +7 wurden die IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen mit einem IFN $\gamma$ -spezifischen ELISPOT in der Milz bestimmt. Keine signifikant bessere spezifische Immunantwort konnte in DEREK Mäusen nachgewiesen werden, jedoch war die unspezifische Antwort stark erhöht (Abb. 14).

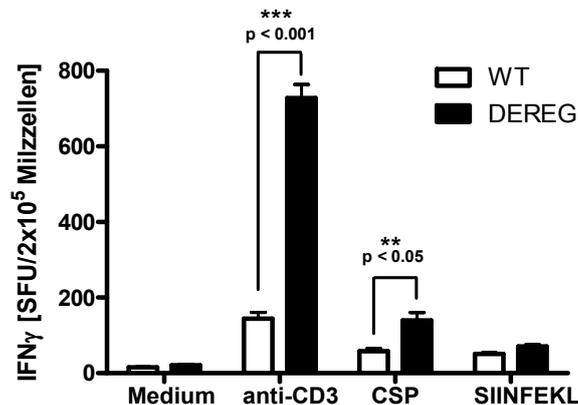


**Abbildung 14. Depletion der T<sub>Reg</sub> während der Immunisierung mit bestrahlten Sporoziten von *P. berghei*.** F1 DEREK und Wildtyp Mäuse wurden am Tag 0 mit 10000 durch  $\gamma$ -Bestrahlung attenuierten Sporoziten von *P. berghei* i.v. immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +7 wurde ein IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT von Milzzellen durchgeführt. Gezeigt werden die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper, CSP-Peptid und SIINFEKL-Peptid. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet; n = 3.

## 2.4. Effekte der Depletion der T<sub>Reg</sub> während der „Boost“-Immunsisierung

Der Einfluss der T<sub>Reg</sub> auf die Immunantwort nach einer Immunsisierung mit ACT-CSP wurde auch bei der „Boost“-Immunsisierung, also einer zweiten Immunsisierung am Tag +14, untersucht. Hierzu wurden die DEREK und Wildtyp Mäuse am Tag 0 mit ACT-CSP immunsisiert („Prime“-Immunsisierung), die Immunsisierung mit ACT-CSP am Tag +14 wiederholt und an den Tagen +15, +16 und +17 mit DT behandelt. Am Tag +21 wurden die IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen mit einem IFN $\gamma$ -spezifischen ELISPOT in der Milz bestimmt.

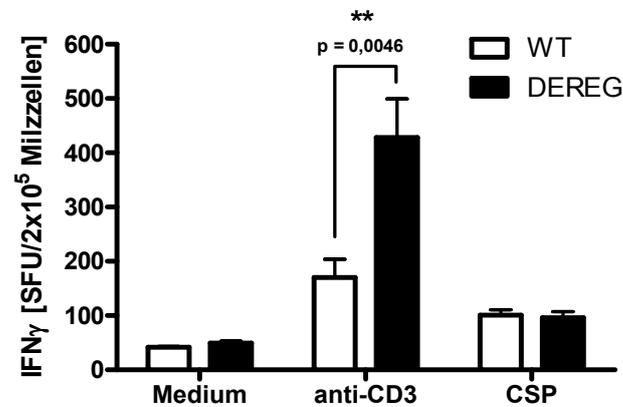
In DEREK Mäusen wurde eine Verbesserung der Immunantwort nach der „Boost“-Immunsisierung im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen beobachtet. Die Anzahl an CSP-induzierten Spots der DEREK Mäuse war jedoch bei der „Prime“- und der „Boost“-Immunsisierung vergleichbar (Abb. 15).



**Abbildung 15. Effekte der Depletion der T<sub>Reg</sub> während der „Boost“-Immunsisierung mit ACT-CSP.** F1 DEREK und Wildtyp Mäusen wurden an den Tagen 0 und +14 mit ACT-CSP i.p. immunsisiert und an den Tagen +15, +16 und +17 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +21 wurde ein IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT von Milzzellen durchgeführt. Gezeigt werden die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper, CSP-Peptid und SIINFEKL-Peptid. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet; n = 3.

In einem weiteren Experiment wurden DEREK und Wildtyp Mäuse am Tag 0 mit ACT-CSP „Prime“-immunsisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Am Tag +14 erfolgte die „Boost“-Immunsisierung mit ACT-CSP und an den Tagen +15, +16 und +17 eine erneute Behandlung mit DT. Am Tag +28 wurden die IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen mit einem IFN $\gamma$ -spezifischen ELISPOT in der Milz bestimmt.

Dieser Versuchsablauf führte nicht zu einer weiteren Verbesserung der spezifischen Immunantwort (Abb. 16). Allerdings wurde ein verbesserter Schutz nach dem Challenge erreicht (Abb. 18 D).



**Abbildung 16. Effekte der Depletion der T<sub>Reg</sub> während der „Prime“- und der „Boost“-Immunisierung mit ACT-CSP.** Balb/c DERE und Wildtyp Mäusen wurden am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert, an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt, am Tag +14 erneut i.p. mit ACT-CSP immunisiert und an den Tagen +15, +16 und +17 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +28 wurde ein IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT von Milzzellen durchgeführt. Gezeigt werden die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper und CSP-Peptid. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet; n = 3.

## 2.5. Die Funktion von CTLA4 bei der T-Zellregulation während Immunisierung

Bei CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*, auch als CD152 bezeichnet) handelt es sich um ein negativ kostimulatorisches Molekül, welches während der T-Zellaktivierung exprimiert wird und an der Inaktivierung aktiver T-Zellen beteiligt ist (Karandikar *et al.*, 1996, Sansom und Walker, 2006). Kürzlich wurde gezeigt, dass eine anti-CTLA4-Behandlung einen Effekt hatte, wenn sie während der „Boost“-Immunisierung mit ACT-CSP, aber nicht während der „Prime“-Immunisierung angewendet wurde (Tartz *et al.*, 2007).

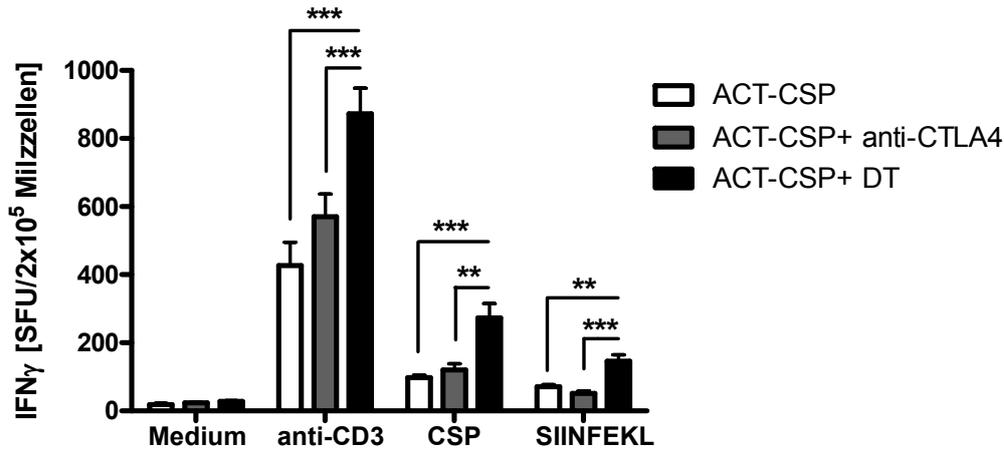
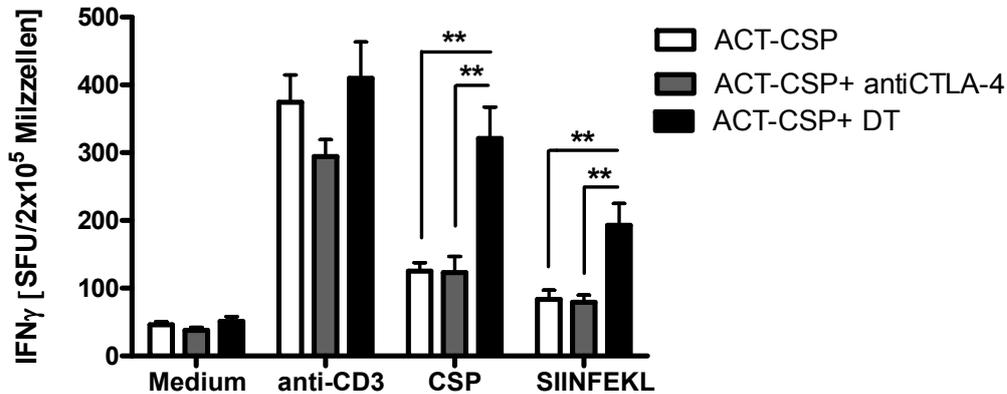
In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass die Depletion der T<sub>Reg</sub> einen starken Effekt in der impfinduzierten Antwort nach der „Prime“-Immunisierung verursacht. Da die T<sub>Reg</sub> CTLA4 konstitutiv auf ihrer Oberfläche exprimieren, kann eine Blockade mit anti-CTLA4-Antikörpern die T<sub>Reg</sub> supprimieren. Der monoklonale anti-CTLA4 Antikörper 4F10 bindet CTLA4, ohne aktivatorisch zu wirken, und verhindert die Bindung der Liganden CD80 und CD86 (Lepeniev, 2007). Um die Effekte der CTLA4 Blockade durch anti-CTLA4-Antikörper

und der Depletion der  $T_{Reg}$  mit DT auf die Immunantwort während einer Immunisierung gegen Malaria zu vergleichen, wurden beide Protokolle parallel getestet.

DEREG Mäuse wurden am Tag 0 mit ACT-CSP „Prime“-immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Wildtyp Mäusen wurde am Tag -1 anti-CTLA4-Antikörper (4F10) i.p. appliziert und am Tag 0 mit ACT-CSP „Prime“-immunisiert. Eine dritte Gruppe, bestehend aus Wildtyp Mäusen, erhielt am Tag 0 eine ACT-CSP „Prime“-Immunisierung. Am Tag +7 wurden Milzzellen isoliert und die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen mit einem IFN $\gamma$ -spezifischen ELISPOT bestimmt (Abb. 17 A).

In einem weiteren Versuch wurden DEREG Mäuse am Tag 0 mit ACT-CSP „Prime“-immunisiert, die Immunisierung mit ACT-CSP am Tag +14 wiederholt und an den Tagen +15, +16 und +17 mit DT behandelt. Wildtyp Mäusen wurden am Tag 0 mit ACT-CSP „Prime“-immunisiert, am Tag +13 wurden anti-CTLA4-Antikörper i.p. appliziert und am Tag +14 die Immunisierung mit ACT-CSP am Tag +14 wiederholt. Eine dritte Gruppe, bestehend aus Wildtyp Mäusen, erhielt am Tag 0 eine ACT-CSP „Prime“-Immunisierung und am Tag +14 die ACT-CSP „Boost“-Immunisierung. Am Tag +21 wurden Milzzellen isoliert und die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen mit einem IFN $\gamma$ -spezifischen ELISPOT bestimmt (Abb. 17B).

In beiden Experimenten führte die anti-CTLA4-Blockade zu keiner signifikanten Auswirkung auf die spezifische T-Zellantwort. Im Gegenteil, die Depletion von  $T_{Reg}$  zeigte eine Verstärkung der ACT-CSP-induzierten Antwort während der „Prime“- bzw. „Boost“-Immunisierung (Abb. 11). Dies belegt, dass die Depletion der  $T_{Reg}$  und die Inhibition der  $T_{Reg}$  mittels anti-CTLA4-Antikörper nicht äquivalent sind.

**A****B**

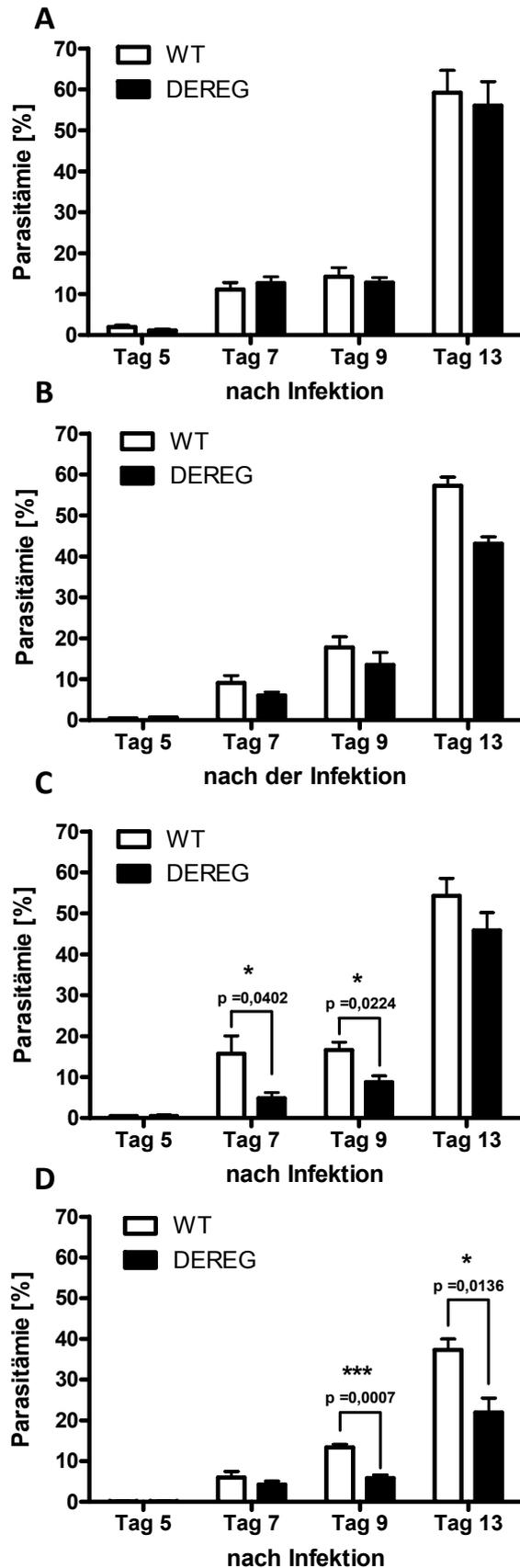
**Abbildung 17. CTLA4-Blockade im Vergleich zu Depletion der T<sub>Reg</sub> während der Immunisierung mit ACT-CSP.**

F1 Mäuse wurden ein Tag vor der „Prime“- oder „Boost“-Immunisierung mit anti-CTLA4-Antikörper i.p. behandelt oder mit DT an den drei folgenden Tagen nach der letzten Immunisierung i.p. behandelt. Sieben Tage nach der letzten Immunisierung wurde ein IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT von Milzzellen durchgeführt. Gezeigt werden die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen nach der Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper, CSP-Peptid und SIINFEKL-Peptid. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. SFU= „spot forming units“. (A) F1 DERE Mäuse wurden am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert und an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt. Wildtyp Mäuse wurden am Tag -1 mit anti-CTLA4-Antikörper i.p. injiziert und am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe aus Wildtyp Mäusen wurde am Tag 0 mit ACT-CSP i.p. immunisiert. Am Tag +7 wurde ein IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT von Milzzellen durchgeführt; n = 3. (B) F1 DERE Mäuse wurden an den Tagen 0 und +14 mit ACT-CSP i.p. immunisiert und an den Tagen +15, +16 und +17 i.p. mit DT behandelt. Wildtyp Mäuse wurden an den Tagen 0 und +14 mit ACT-CSP i.p. immunisiert und am Tag +13 mit anti-CTLA4-Antikörper i.p. behandelt. Eine Kontrollgruppe aus Wildtyp Mäusen wurde an den Tagen 0 und +14 mit ACT-CSP i.p. behandelt. Am Tag +21 wurde ein IFN $\gamma$ -spezifischer ELISPOT von Milzzellen durchgeführt; n = 3. \*\*\* < 0,0005; \*\* < 0,005.

## 2.6. Effekte der Depletion der T<sub>Reg</sub> auf den Verlauf der Infektion nach der Challenge mit *P. berghei* Sporozoiten

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Depletion der T<sub>Reg</sub> während der Immunisierung eine protektive Immunität gegen eine Malariainfektion vermittelt. Als Infektionsmodell wurde die Infektion mit *Plasmodium berghei* gewählt. Dafür wurden DEREK Mäuse und Wildtyp Mäuse am Tag 0 mit ACT-CSP „Prime“-immunisiert, an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt und am Tag +22 intravenös (i.v.) mit 1000 *P. berghei* ANKA Sporozoiten infiziert. In einem weiteren Versuch wurden DEREK Mäuse und Wildtyp Mäuse am Tag 0 mit ACT-CSP „Prime“-immunisiert, am Tag +14 mit ACT-CSP „Boost“-immunisiert, an den Tagen +15, +16 und +17 mit DT behandelt und am Tag +22 i.v. mit 1000 *P. berghei* ANKA Sporozoiten infiziert. In einem dritten Experiment wurden DEREK Mäuse und Wildtyp Mäuse am Tag 0 mit ACT-CSP „Prime“-immunisiert, an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt, am Tag +14 mit ACT-CSP „Boost“-immunisiert, an den Tagen +15, +16 und +17 mit DT behandelt und am Tag +22 i.v. mit 1000 *P. berghei* ANKA Sporozoiten infiziert. Der Verlauf der Infektion wurde anhand von Blutaussstrichen verfolgt und das Gewicht der Tiere alle zwei Tage bestimmt, da der Gewichtsverlust mit der Ausprägung der Pathologie einer Malariainfektion korreliert (May *et al.*, 2000; Lepenies, 2007). Jeden Tag wurde die Vitalität und der optische Zustand der Tiere kontrolliert.

Die induzierte Immunantwort vermittelte keinen signifikanten Schutz vor einer *P. berghei*-Infektion. DEREK Mäuse, die nach der „Prime“-Immunisierung depletiert wurden, entwickelten keine sterile Immunität und hatten nur einen kleinen positiven Effekt während des Verlaufs der Malaria (Abb. 18 B). Kein signifikanter Unterschied im Gewichtsverlust oder der Überlebenszeit zwischen den Gruppen wurde nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigten die zweimal immunisierten, während der „Boost“-Immunisierung depletierten, Mäuse einen signifikant verlangsamten Anstieg der Parasitämie im Vergleich mit den Wildtyp Mäusen (Abb. 18 C). Als am effizientesten erwies sich das Protokoll, in dessen Verlauf sowohl nach der „Prime“-Immunisierung, als auch nach der „Boost“-Immunisierung eine Depletion mit DT durchgeführt wurde (Abb. 18 D).



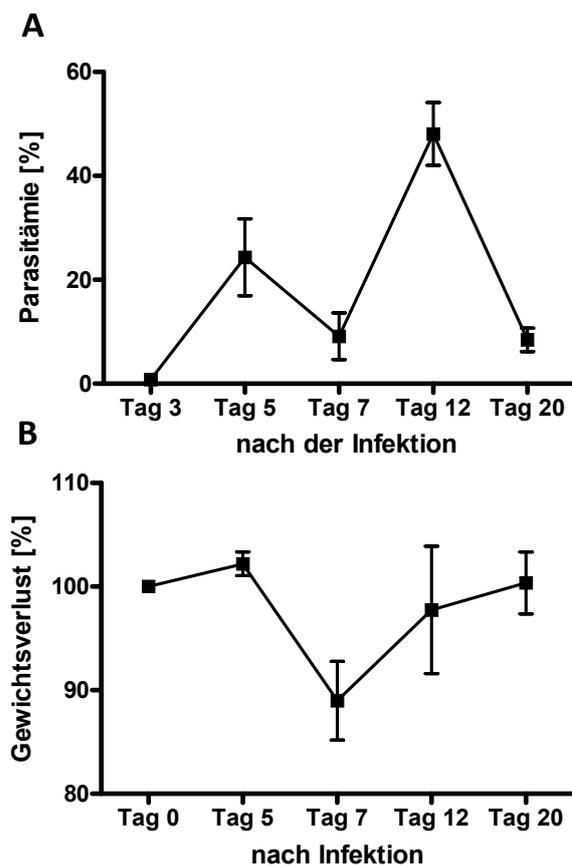
**Abbildung 18. Parasitämien nach Infektion mit *P. berghei* Sporozoiten.** Verlauf der Infektion mit Sporozoiten von *P. berghei* in Balb/c DEREK und Wildtyp Mäusen. Blutaussstriche der Mäuse wurden an verschiedenen Zeitpunkten genommen und mit Wright's stain gefärbt, und die Zahl der infizierten Erythrozyten wurde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Parasitämien der Mäuse in jeder Gruppe. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. (A) Kontrollexperiment ohne Immunisierung. Balb/c DEREK und Wildtyp Mäusen wurden an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +21 erfolgte eine i.v. Infektion mit 1000 Sporozoiten von *P. berghei* ANKA; n = 5. (B) Depletion der T<sub>Reg</sub> während der „Prime“-Immunisierung. Balb/c DEREK und Wildtyp Mäusen wurden am Tag 0 i.p. mit ACT-CSP immunisiert, an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +21 erfolgte eine i.v. Infektion mit 1000 Sporozoiten von *P. berghei* ANKA; n = 5. (C) Depletion der T<sub>Reg</sub> während der „Boost“-Immunisierung. Balb/c DEREK und Wildtyp Mäusen wurden am Tag 0 und +14 i.p. mit ACT-CSP immunisiert und an den Tagen +15, +16 und +17 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +35 erfolgte eine i.v. Infektion mit 1000 Sporozoiten von *P. berghei* ANKA; n = 5. (D) Depletion der T<sub>Reg</sub> während der „Prime“- und „Boost“-Immunisierung. Balb/c DEREK und Wildtyp Mäusen wurden am Tag 0 i.p. mit ACT-CSP immunisiert, an den Tagen +1, +2 und +3 i.p. mit DT behandelt, am Tag +14 erneut i.p. mit ACT-CSP immunisiert und an den Tagen +15, +16 und +17 i.p. mit DT behandelt. Am Tag +35 erfolgte eine i.v. Infektion mit 1000 Sporozoiten von *P. berghei* ANKA; n = 5.

### 3. Depletion der T<sub>Reg</sub> während der erythrozytären Phase der Malaria

#### 3.1. Verlauf der T<sub>Reg</sub> während einer *Plasmodium yoelii* Infektion

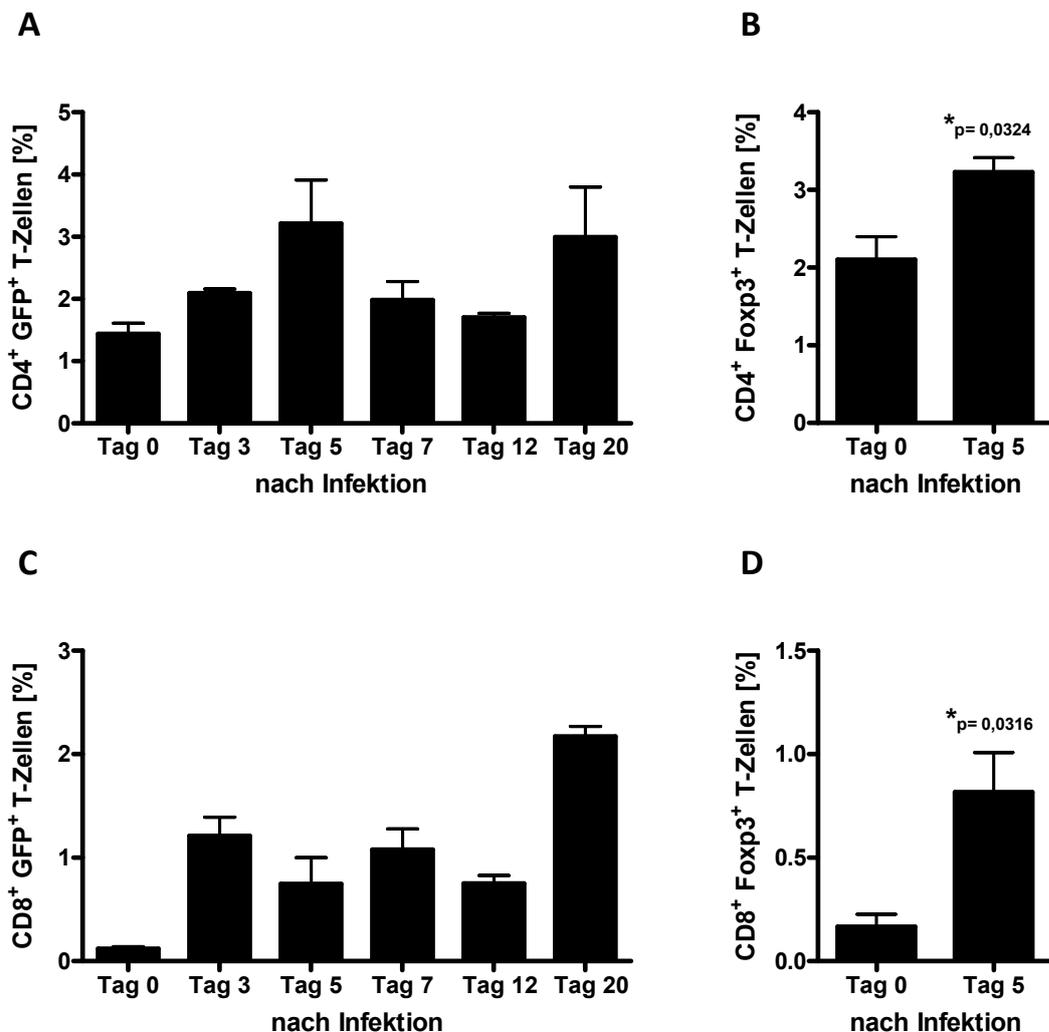
Eine Infektion mit *P. yoelii* 17XNL verursacht, anders als die *P. berghei* ANKA-Infektion, einen nichtletalen Infektionsverlauf, der durch eine transiente Parasitämie gekennzeichnet ist. Während der erythrozytären Phase einer *P. yoelii* 17XNL Infektion sind sowohl die zelluläre, als auch die humorale Immunantwort an der Bekämpfung und Beseitigung infizierter Erythrozyten beteiligt, was dazu führt, dass etwa 20 Tage nach Beginn der Infektion keine Parasiten mehr im Blut detektierbar sind (Langhorne *et al.*, 2002; Lepenies, 2007).

Der Verlauf einer Infektion mit *P. yoelii* 17XNL in C57Bl/6 Mäusen (Abb. 19 A) sowie in Balb/c Mäusen (Daten nicht gezeigt) zeigte zwei Phasen mit einem ersten Maximum um Tag +5 nach der Infektion und einem zweiten Maximum um Tag +12. Die maximale Parasitämie wurde am Tag +12 post infekional (p.i.) erreicht (etwa 50 % infizierte Erythrozyten). Etwa ab dem Tag +17 p.i. waren keine infizierten Erythrozyten mehr nachweisbar. Das Körpergewicht der infizierten Mäuse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und in Relation zum Gewicht vor der Infektion gesetzt und zeigte einen starken Verlust am Tag +7 mit späterer Normalisierung (Abb. 19 B).



**Abbildung 19. Verlauf der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL Stamm in C57Bl/6 Mäusen.** C57Bl/6 Mäuse wurden am Tag 0 mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert. Blutaussstriche der Mäuse wurden an verschiedenen Zeitpunkten genommen und mit Wright's stain gefärbt, und die Zahl der infizierten Erythrozyten wurde bestimmt. Das Körpergewicht der infizierten Mäuse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und in Relation zum Gewicht vor der Infektion gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mäuse. (A) Parasitämiekurve; n = 5. (B) Kurve des relativen Körpergewichts; n = 5.

Um zu überprüfen, ob  $T_{Reg}$  den Verlauf der Blutphase einer Malariainfektion beeinflussen, wurde die Kinetik der  $CD4^+ eGFP^+ T_{Reg}$  und der  $CD8^+ eGFP^+ T_{Reg}$  während der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL in Blut aus C57Bl/6 DEREK Mäusen evaluiert. C57Bl/6 DEREK Mäuse wurden am Tag 0  $5 \times 10^6$  infizierte Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert und an verschiedenen Zeitpunkten während der Infektion wurden durchflusszytometrische Analysen von T-Zellen aus dem Blut durchgeführt. An Tag 0 und Tag +5 wurden die Anzahl der  $CD4^+ Foxp3^+$  T-Zellen und der  $CD8^+ Foxp3^+$  T-Zellen mittels intrazellulärer durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die  $CD4^+ eGFP^+ T_{Reg}$  Population variierte stark und die  $CD8^+ eGFP^+ T_{Reg}$  Population veränderte sich während der Infektion auch dynamisch (Abb. 20 A und C). Im Vergleich zu nichtinfizierten C57Bl/6 DEREK Mäusen war der prozentuale Anteil der  $CD4^+ Foxp3^+ T_{Reg}$  und der  $CD8^+ Foxp3^+ T_{Reg}$  während der Infektion signifikant erhöht (Abb. 20 B und D).

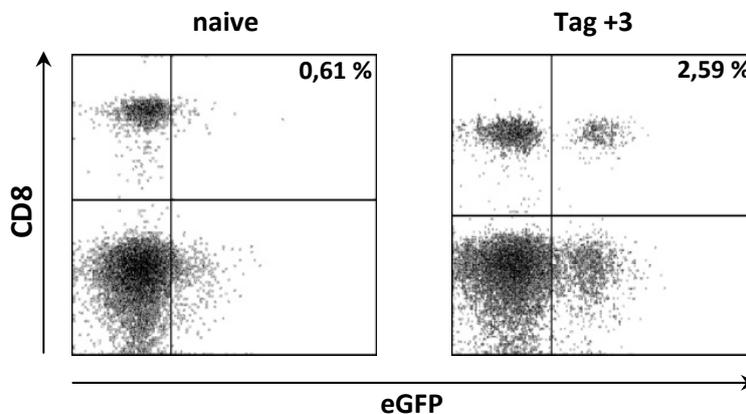


**Abbildung 20.** Kinetik der  $T_{Reg}$  im Verlauf einer Infektion mit *P. yoelii* 17XNL Stamm. C57Bl/6 DEREK Mäuse wurden am Tag 0 mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert. An verschiedenen Zeitpunkten während der Infektion wurde den Tieren Blut abgenommen und eine durchflusszytometrische Analyse von T-Zellen durchgeführt. Die Blutzellen wurden mit APC-anti-CD4- oder APC-anti-CD8-Antikörper und

mit PE-anti-Foxp3-Antikörper markiert und im Lymphozytengate analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mäuse. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. (A) Anzahl der CD4<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T-Zellen; n=2. (B) Anzahl CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen; n=2. (C) Anzahl der CD8<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T-Zellen; n=2. (D) Anzahl der CD8<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen; n=2.

### 3.2. Effekte der CD8<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> bei der T-Zellregulation im Verlauf der Blutphase der Malaria

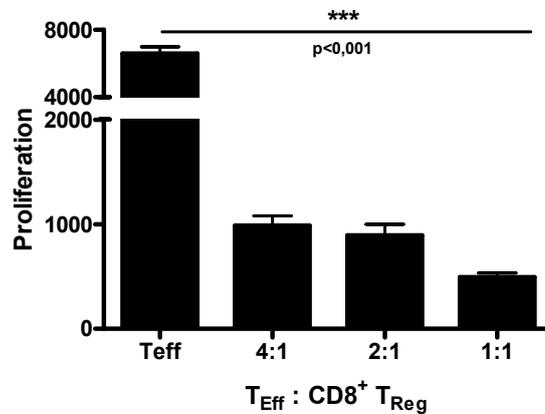
Am Tag +3 nach einer Infektion mit *P. yoelii* 17XNL, wurde eine eindeutige Erhöhung von CD8<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> im Blut aus C57Bl/6 DEREK Mäusen, welche mit 5 x 10<sup>6</sup> infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert wurden, festgestellt (Abb. 21).



**Abbildung 21. Die Infektion mit *P. yoelii* induziert Generation CD8<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub>.** C57Bl/6 DEREK Mäuse wurden am Tag 0 mit 5 x 10<sup>6</sup> infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert. An verschiedenen Zeitpunkten während der Infektion wurde den Tieren Blut abgenommen und eine durchflusszytometrische Analyse von T-Zellen durchgeführt. Die Blutzellen wurden mit APC-anti-CD8-Antikörper markiert und im Lymphozytengate analysiert. (A) „Dotplot“ einer naiven Maus. CD8<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T-Zellen ( im Quadrant „UR“) = 0,61 % der Lymphozyten. (B) „Dotplot“ einer infizierten Maus am Tag +3. CD8<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T-Zellen ( im Quadrant „UR“) = 2,59 % der Lymphozyten.

Um zu untersuchen, ob die während der *P. yoelii* 17XNL Infektion generierten CD8<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> suppressive Aktivität zeigen, wurden Balb/c DEREK Mäuse am Tag 0 mit 5 x 10<sup>6</sup> infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden Milzzellen isoliert und mit anti-CD8-Antikörper angefärbt. Mittels durchflusszytometrischer Analyse (FACS Aria) wurden die CD8<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T-Zellen sortiert. T-Effektorzellen (T<sub>Eff</sub>) aus der Milz naiver Balb/c DEREK Mäusen wurden mit anti-CD3-Antikörper stimuliert und in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der sortierten CD8<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> in Kultur genommen. Nach 48 h Inkubation wurde die Zellproliferation gemessen (Abb. 22). Das

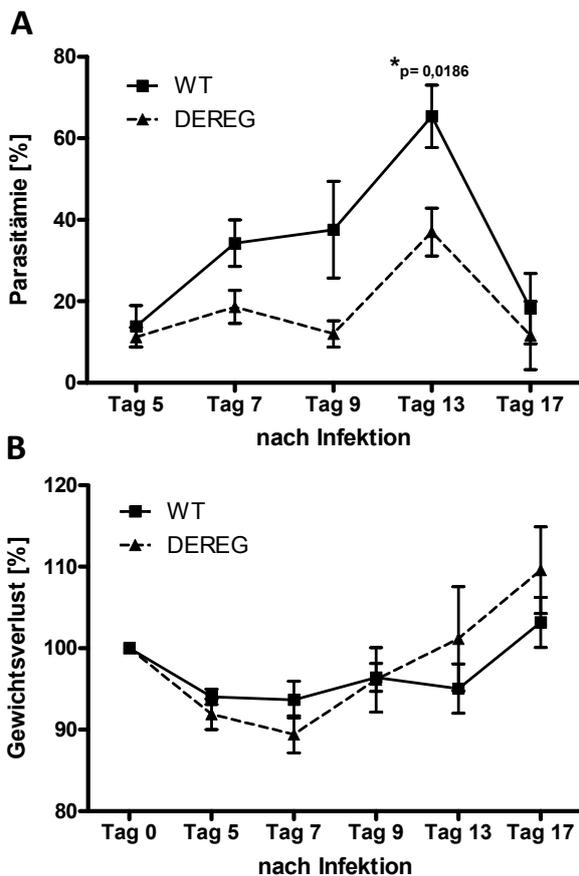
Experiment zeigte, dass die  $CD8^+ eGFP^+ T_{Reg}$  Population die Proliferation von  $T_{Eff}$  im Verlauf der *P. yoelii* 17XNL Infektion unterdrücken kann.



**Abbildung 22:  $CD8^+ T_{Reg}$  zeigen suppressive Funktionen *ex vivo*.** Balb/c DEREK Mäuse wurden am Tag 0 mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert. Am Tag +3 wurden Milzzellen isoliert, mit APC-anti-CD8-Antikörper gefärbt und die  $CD8^+ eGFP^+$  T-Zellen ( $CD8^+ T_{Reg}$ ) wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse (FACS Aria) sortiert.  $2 \times 10^5$   $T_{Eff}$  aus der Milz naiver Balb/c DEREK Mäusen wurden mit anti-CD3 Antikörper stimuliert und mit den sortierten  $CD8^+ T_{Reg}$  in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 48 h wurde der  $^3H$ -Thymidineinschluss in den Zellen gemessen. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Triplikaten von je einer Maus. Die Querbalken geben den Mittelwert aus allen Mäusen einer Gruppe an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet;  $n=2$ .

### 3.3. Einfluss der Depletion der $T_{Reg}$ auf klinische Parameter im Verlauf der Blutphase der Malaria

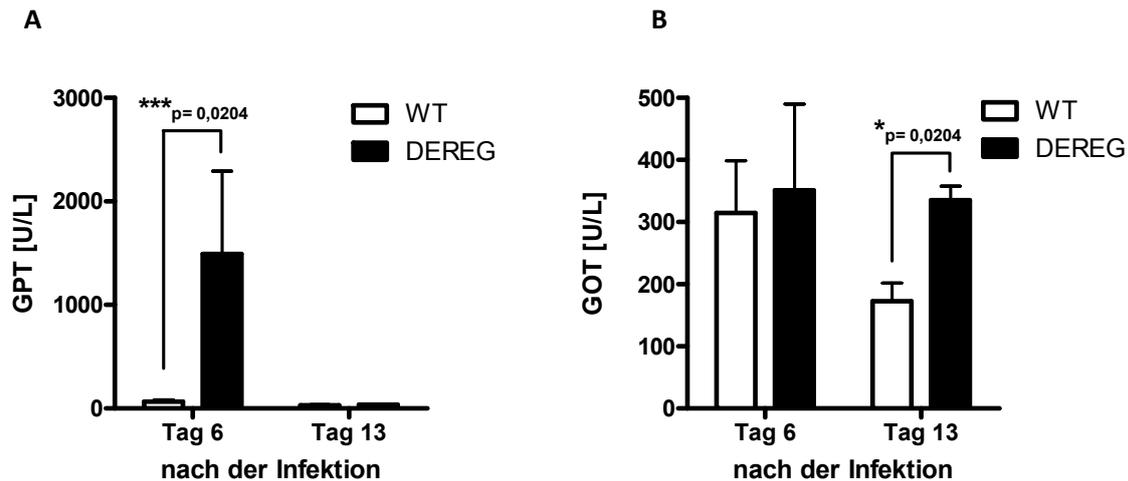
Um den Einfluss der Depletion der  $T_{Reg}$  auf den klinischen Verlauf einer Infektion mit *P. yoelii* 17XNL zu untersuchen, wurden DEREK Mäuse und Wildtyp Mäuse am Tag 0 mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Mäuse, deren  $T_{Reg}$  depletiert wurden, zeigten eine signifikant niedrigere Parasitämie und eine kürzere Krankheitsdauer im Verhältnis zu den Wildtyp Mäuse (Abb. 23).



**Abbildung 23. Effekt der Depletion der  $T_{Reg}$  im Verlauf der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL.** F1 DERE und Wildtyp Mäuse wurden am Tag 0 mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Blutausstriche der Mäuse wurden an verschiedenen Zeitpunkten genommen und mit Wright's stain gefärbt, und die Zahl der infizierten Erythrozyten wurde bestimmt. Das Körpergewicht der infizierten Mäuse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und in Relation zum Gewicht vor der Infektion gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mäuse in jeder Gruppe. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. (A) Parasitämiekurve; n= 5. (B) Kurve des relativen Körpergewichts; n= 5.

Andere gemessene klinische Kennwerte waren das Gewicht sowie das Niveau der Lebertransaminasen im Serum. Vorherige Studien haben gezeigt, dass eine Leberschädigung im Verlauf der Malaria mit einer schlechteren Prognose korreliert (Kremsner *et al.*, 1990; Meyer, 2007). Eine Leberschädigung kann anhand veränderter Transaminasenkonzentration im Serum nachgewiesen werden (Jacobs *et al.*, 2004).

DEREG Mäuse und Wildtyp Mäuse wurden am Tag 0 mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. An den Tagen +6 und +13 wurde die Serumkonzentration der Leberenzyme mit dem Reflotron Photometer bestimmt. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Gewichtsverlust zwischen den Gruppen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Depletion der  $T_{Reg}$  führte jedoch zu einem Anstieg der Konzentration der Alaninaminotransferase (GPT) an den Tagen +6 und +13 nach der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL. Am Tag +6 waren GPT-Konzentrationen von bis zu 3000 U/l messbar, was auf eine Hepatitis hindeutet. Uninfizierte Mäuse zeigten GPT-Konzentrationen von ca. 30 U/l und bei infizierten Wildtyp Mäusen stieg das Enzym nur minimal an (Abb. 24). Am Tag +6 nach der *P. yoelii* 17XNL-Infektion stiegen in depletierten Mäusen ebenfalls die Konzentrationen der Aspartataminotransferase (GOT) an (Abb. 24).



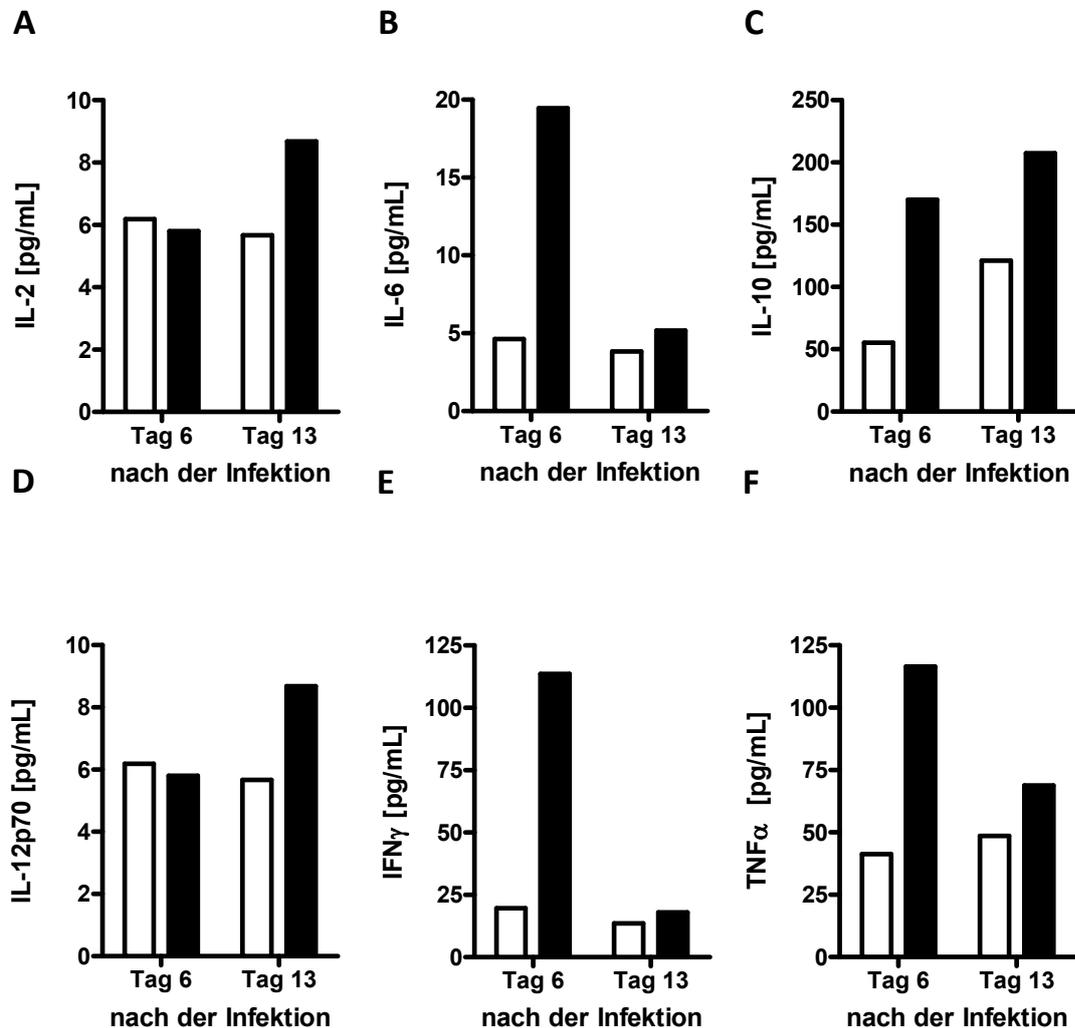
**Abbildung 24. Einfluss der Depletion der  $T_{Reg}$  auf den klinischen Verlauf der *P. yoelii*-Infektion.** F1 Dereg und Wildtyp Mäuse wurden i.p. mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL injiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. An den Tagen +6 und +13 wurden die Konzentrationen der Leberenzyme mit einem Reflotron Photometer bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler der Mäuse in jeder Gruppe. Die Signifikanz wurde mit Student's t-test (unpaired, one-tailed) berechnet. (A) Alanin-Aminotransferase (GPT) Konzentrationen; n = 6. (B) Aspartat-Aminotransferase (GOT) Konzentrationen; n = 6.

### 3.4. Die Depletion der $T_{Reg}$ im Verlauf einer Infektion mit *P. yoelii* 17XNL führt zu einer gesteigerten Zytokinproduktion

Eine *P. yoelii* 17XNL Infektion führt zu einer Freisetzung von Th1- und Th2-Zytokinen, wohingegen bei einer Infektion mit *P. berghei* eine polarisierte Th1-Antwort ausgelöst wird. Im Verlauf der *P. yoelii* 17XNL Infektion werden sowohl Th1-Zytokine wie  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$ , die direkt antiparasitär wirken, als auch IL-4, IL-10 und  $TGF\beta$ , die zu einer humoralen und antiinflammatorischen Immunantwort beitragen, freigesetzt (Langhorne *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2001; Omer *et al.*, 2003).

Um den Effekt der Depletion der  $T_{Reg}$  auf die Zytokinproduktion zu untersuchen, wurden die Konzentrationen von IL-2, IL-6, IL-10, IL-12,  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  im Verlauf der *P. yoelii* 17XNL-Infektion in Serum gemessen. Dereg Mäuse und Wildtyp Mäuse wurden am Tag 0 mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Am Tag +6 und am Tag +13 wurde Blut der Mäuse via Herzpunktion abgenommen. Die Zytokine im Serum wurden mittels eines Cytometric-Bead-Array Tests (CBA) analysiert. Eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-2, IL-6, IL-12p70,  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$ ) wurde in depletierten Mäusen nachgewiesen (Abb. 25 A, B, D, E und F). Ebenso war die Produktion von IL-10 in den depletierten Mäusen erhöht (Abb. 25 C), was darauf schließen lässt, dass die Depletion der  $T_{Reg}$  die Immunantwort im Verlauf einer *P.*

*yoelii* 17XNL Infektion verstärkt. Die gesteigerte T-Zellaktivierung und Zytokinproduktion nach der Depletion der  $T_{Reg}$  führten zu einer schnelleren Kontrolle der Infektion, verursachten aber eine stärkere Pathologie.

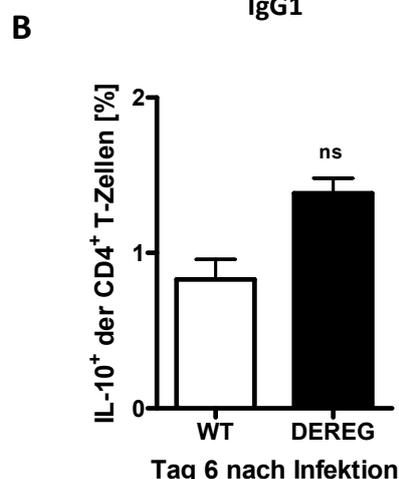
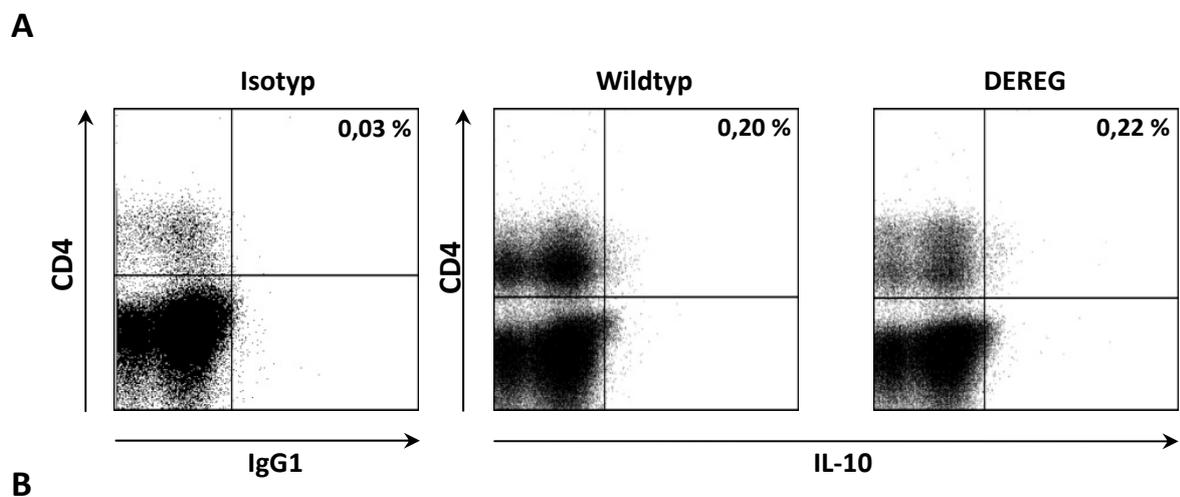


**Abbildung 25. Gesteigerte Zytokinproduktion nach der Depletion der  $T_{Reg}$  im Verlauf einer Infektion mit *P. yoelii*.** F1 DEREK und Wildtyp Mäuse wurden i.p. mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL injiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. An den Tagen +6 bzw. +13 wurde Blut mittels Herzpunktion abgenommen und mit dem CBA-Kit verschiedene Zytokine im Serum gemessen. Jede Spalte repräsentiert den Wert einem Serum-Pool aus drei Mäusen. (A) Konzentration von IL-2; n = 3. (B) Konzentration von IL-6; n = 3. (C) Konzentration von IL-10; n = 3. (D) Konzentration von IL-12p70; n = 3. (E) Konzentration von IFN $\gamma$ ; n = 3. (F) Konzentration von TNF $\alpha$ ; n = 3.

### 3.5. Regulatorische T-Zellen sind nicht für die IL-10-Produktion im Verlauf der *P. yoelii* 17XNL Infektion verantwortlich

IL-10 ist sehr wichtig für die Immunregulation und die Kontrolle der Pathologie im Verlauf der Malaria (May *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob die  $T_{Reg}$  Depletion nach der *P. yoelii*

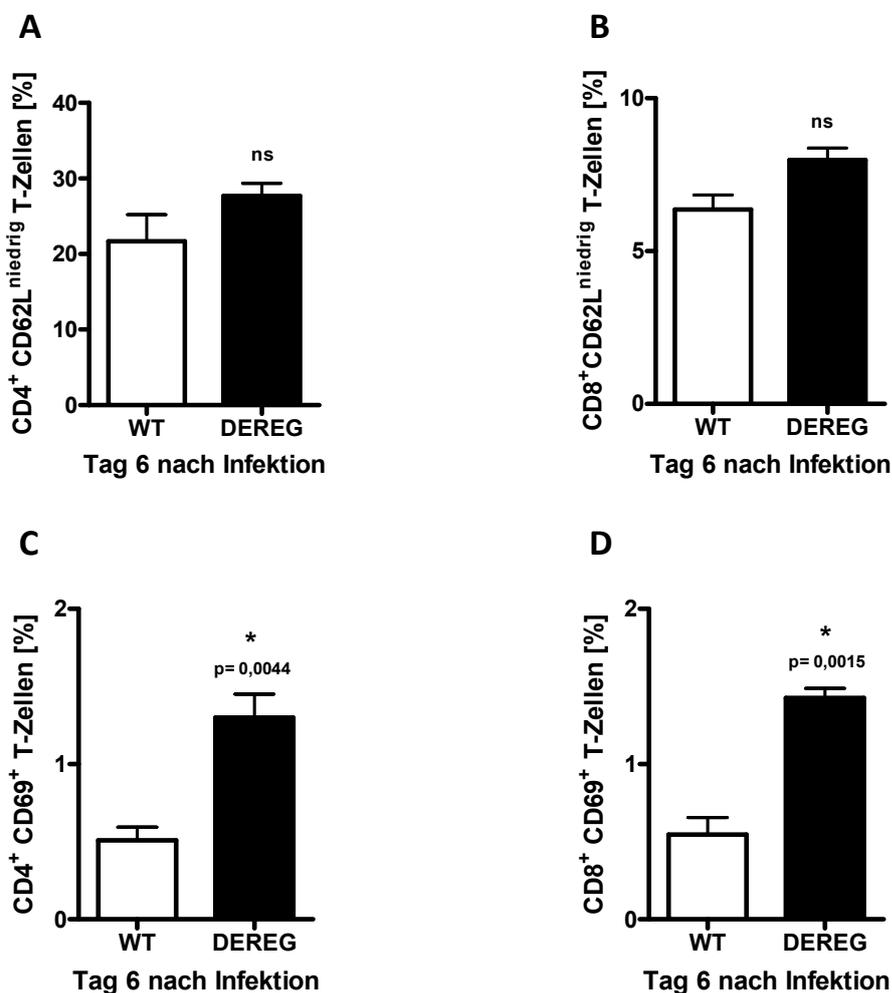
17XNL Infektion einen Effekt auf die IL-10-Produktion hat, wurden Balb/c DEREK Mäuse und Wildtyp Mäuse am Tag 0 mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Am Tag +6 nach der Infektion waren unter 1%  $CD4^+$  eGFP<sup>+</sup> T-Zellen im Blut aus depletierten Mäusen nachweisbar. Allerdings war die im Serum gemessene IL-10 Konzentration in depletierten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen erhöht (Abb. 25). Das heißt, dass in diesem Modell die IL-10 Produktion im Verlauf der Infektion unabhängig von T<sub>Reg</sub> ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Produktion dieses Zytokins in verschiedenen Lymphozytenpopulationen der Milz ( $CD4^+$  T-Zellen,  $CD4^+$  eGFP<sup>+</sup> T-Zellen,  $CD8^+$  T-Zellen, und  $CD19^+$  B-Zellen) mittels intrazellulärer durchflusszytometrischer Analyse am Tag +6 p.i. bestimmt. Eine Produktion von IL-10 wurde in  $CD4^+$  T-Zellen nachgewiesen, es konnte allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen depletierten und nicht depletierten Mäusen gezeigt werden (Abb. 26). Keine detektierbare Produktion des Zytokins wurde in  $CD8^+$  T-Zellen bzw. B-Zellen oder T<sub>Reg</sub> gefunden (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 26.  $CD4^+$  T-Zellen produzieren IL-10 während einer *P. yoelii*-Infektion.** F1 DEREK und Wildtyp Mäuse wurden i.p. mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL injiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. Am Tag +6 wurde die IL-10 Produktion mittels intrazellulärer durchflusszytometrischer Analyse von Milzzellen bestimmt. Milzzellen wurden mit PE-anti- $CD4$ -Antikörper und APC-anti-IL-10-Antikörper markiert und die Zellen im  $CD4^+$  T-Zellgate analysiert. (A) „Dotplot“ einer Isotyp Kontrolle und von Proben einer Wildtyp und einer DEREK Maus. (B) Anzahl der IL-10 produzierenden  $CD4^+$  T-Zellen; n= 2.

### 3.6. Verstärkte T-Zellaktivierung nach der Depletion der T<sub>Reg</sub>

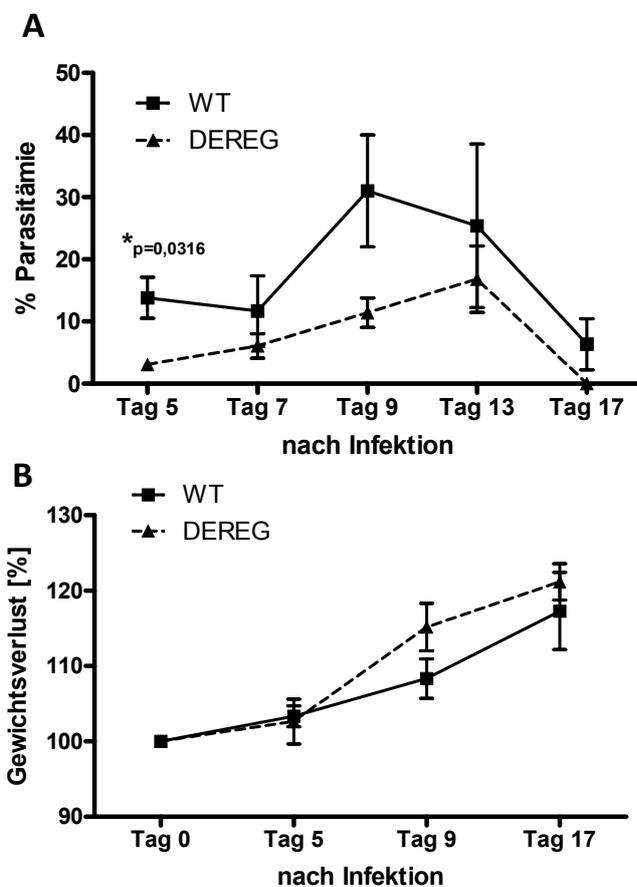
Um den Effekt der Depletion der T<sub>Reg</sub> auf die T-Zellaktivierung im Verlauf der *P. yoelii*-Infektion näher zu untersuchen, wurde am Tag +6 der Anteil der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl an T-Zellen in der Milz bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bei der *P. yoelii* 17XNL-Infektion nach der Depletion der T<sub>Reg</sub> ein größerer Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen aktivierten Phänotyp (CD62L<sup>niedrig</sup>, CD69<sup>+</sup>) aufwies. Die Depletion der T<sub>Reg</sub> führte auch zu einem höheren Anteil an aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz, der im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich war (Abb. 27).



**Abbildung 27. Gesteigerte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Depletion der T<sub>Reg</sub>.** F1 DEREK und Wildtyp Mäuse wurden i.p. mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL injiziert und an den Tagen +1, +2 und +3 mit DT behandelt. An den Tagen +6 bzw. +13 wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD62L und CD69 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse von Milzzellen bestimmt. Der prozentuale Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzahl an Milzzellen ist aufgetragen, dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler der Mäuse in jeder Gruppe. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test (paired, two-tailed) berechnet. (A) CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>niedrig</sup> T-Zellen; n = 3. (B) CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>niedrig</sup> T-Zellen; n = 3. (C) CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> T-Zellen; n = 3. (D) CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> T-Zellen; n = 3.

### 3.7. Effekte einer verlängerten Depletion der T<sub>Reg</sub> auf die Parasitämie

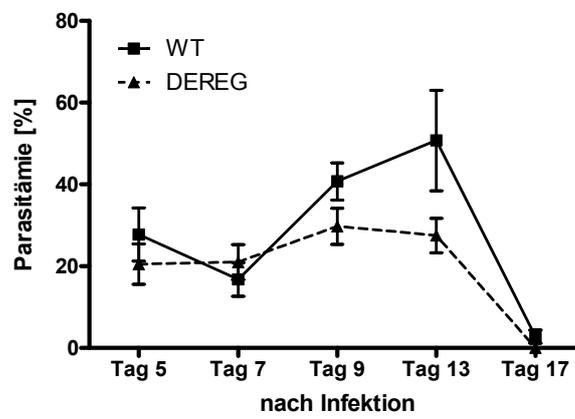
Der Effekt einer verlängerten Depletion der T<sub>Reg</sub> während der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL wurde mit DEREГ Mäusen und Wildtyp Mäusen, welchen am Tag 0  $5 \times 10^6$  infizierte Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert und an den Tagen +1 bis +6 DT appliziert wurde, analysiert. Im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen zeigten die depletierten Mäuse eine signifikant niedrigere Parasitämie, die auch einen anderen Verlauf als die der Wildtyp Mäuse, ohne die beschriebenen zwei Maxima, zeigte (Abb. 28).



**Abbildung 28. Verlauf der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL Stamm bei verlängerter Depletion der T<sub>Reg</sub>.** F1 DEREГ und Wildtyp Mäuse wurden am Tag 0 mit  $5 \times 10^6$  infizierten Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert und an den Tagen +1 bis +6 mit DT behandelt. Blutausstriche der Mäuse wurden an verschiedenen Zeitpunkten genommen und mit Wright's stain gefärbt, und die Zahl der infizierten Erythrozyten wurde bestimmt. Das Körpergewicht der infizierten Mäuse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und in Relation zum Gewicht vor der Infektion gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mäuse in jeder Gruppe. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet. (A) Parasiämiekurve; n= 5. (B) Kurve des prozentualen Gewichtsverlusts; n= 5.

### 3.8. Depletion der $T_{Reg}$ vor der Infektion

Die nach der Depletion neugenerierten  $T_{Reg}$  ( $ngT_{Reg}$ ) sind im Vergleich mit natürlichen  $T_{Reg}$  ( $nT_{Reg}$ ) *ex vivo* funktionell (Abb. 5). Um die suppressive Funktionen der „neugenerierten“  $T_{Reg}$  ( $ngT_{Reg}$ ) *in vivo* zu untersuchen, wurden DEREK Mäuse und Wildtyp Mäuse mit DT an den Tagen -23, -22 und -21 behandelt. Am Tag 0 wurden den Mäusen  $5 \times 10^6$  infizierte Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert. Die depletierten Mäuse zeigten eine niedrigere Parasitämie (Abb. 29), was die Vermutung nahelegt, dass die  $ngT_{Reg}$  *in vivo* eine geringere suppressive Kapazität als die  $nT_{Reg}$  besitzen.



**Abbildung 29. Effekt der Depletion der  $T_{Reg}$  vor der Infektion mit *P. yoelii* 17XNL.** F1 DEREK und Wildtyp Mäuse wurden an den Tagen -23, -22 und -21 mit DT behandelt. Am Tag 0 wurden den Mäusen  $5 \times 10^6$  infizierte Erythrozyten von *P. yoelii* 17XNL i.p. injiziert. Blutaussstriche der Mäuse wurden an verschiedenen Zeitpunkten genommen und mit Wright's stain gefärbt, und die Zahl der infizierten Erythrozyten wurde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Parasitämiekurve der Mäuse in jeder Gruppe. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test (unpaired, two-tailed) berechnet;  $n=5$ .

## IV. Diskussion

Die T-Zellantwort ist ein Kernbestandteil der protektiven Immunantwort. Sie unterliegt komplizierten regulatorischen Mechanismen, welche auch dem Selbstschutz des Organismus dienen, um beispielsweise die durch eine unkontrollierte oder zu starke Immunantwort verursachte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zu verhindern.

T<sub>Reg</sub> begrenzen die T-Zellaktivierung im Verlauf von Infektionen und Impfreaktionen und bei der Entstehung und Persistenz von Tumoren. Ebenso spielen sie in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegen Selbstantigene eine zentrale Rolle (Sakaguchi, 2005). Eine Fehlregulation oder ein Mangel an T<sub>Reg</sub> führt zu Autoimmunerkrankungen und chronisch inflammatorischen Erkrankungen (Asano *et al.*, 1996; Shevach *et al.*, 2001). Es gibt verschiedene Hinweise, dass eine Vielzahl unterschiedlicher T<sub>Reg</sub> Subpopulationen existieren, die überlappende Funktionen aufweisen. Die Komplexität wird auch aufgrund der Gewebespezifität der regulatorischen Mechanismen und durch die große Variation der Immunantworten, die kontrolliert werden müssen, erhöht (Corthay, 2009; Sakaguchi *et al.*, 2009). Daher müssen die regulatorischen Mechanismen genau angepasst sein, um die entsprechende Immunantwort mit ihren bestimmten Merkmalen zu erzeugen. Dennoch ist die Modulation von T<sub>Reg</sub> ein attraktiver Angriffspunkt, um die Wirkung von Impfstoffen zu verbessern und inflammatorische Erkrankungen, Transplantatreaktionen oder Tumore zu behandeln. Die Vorbedingung für eine klinische Anwendung ist jedoch eine Minimierung möglicher Nebenwirkungen durch die Entwicklung einer für den bestimmten regulatorischen Mechanismus hochspezifischen Behandlungsform (Esensten *et al.*, 2009; Long und Wood, 2009).

In dieser Arbeit wurde die Funktion der T<sub>Reg</sub> in der Regulation von T-Effektorzellfunktionen im Verlauf der murinen Malaria untersucht.

### 1. Das DEREK-Mausmodell

Foxp3<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> zeigen eine konstitutive Expression von CD25. In vielen Studien werden deshalb Antikörper gegen CD25 zur Depletion der T<sub>Reg</sub>-Population verwendet. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass T<sub>Reg</sub> die Wirkung einer impfinduzierten T-Zellantwort

beschränken können. Die Depletion der  $CD4^+CD25^+$   $T_{Reg}$  vor einer Immunisierung führte zu einer verstärkten T-Zellantwort gegen virale oder Tumorantigene (Kursar *et al.*, 2007; Toka *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2005). In verschiedenen experimentellen Modellen erzeugte die antikörpervermittelte Depletion der  $T_{Reg}$  eine erhöhte Anzahl impfinduzierter T-Zellen (Boudosquié *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2009). Anti-CD25-Antikörper haben allerdings auch depletierende Effekte auf nichtregulatorische T-Zellen die CD25 exprimieren. Problematisch ist auch, dass nicht alle  $T_{Reg}$  Populationen CD25 exprimieren. Außerdem hängt das Ergebnis der anti-CD25-Antikörper induzierten Depletion stark von jeweiligen Gewebeart und dem Zeitpunkt der Antikörperanwendung ab. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind keine Verfahren zur spezifischen Depletion der  $T_{Reg}$  bekannt (Couper *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009).

Um die spezifische Funktion der  $T_{Reg}$  während der Immunisierung gegen das Leberstadium einer *P. berghei* Infektion zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit transgene Mäuse verwendet, deren  $Foxp3^+$   $T_{Reg}$  spezifisch depletiert werden können. Die BAC-transgenen DEREK-Mäuse exprimieren einen Diphtherietoxinrezeptor (DTR)-eGFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des *Foxp3*-Lokus. Dieses Mausmodell erlaubt nicht nur die Detektion der  $CD4^+$   $Foxp3^+$   $T_{Reg}$  und der  $CD8^+$   $Foxp3^+$   $T_{Reg}$ , sondern auch deren Depletion *in vivo* durch Diphtherietoxin (DT). Im Vergleich zu den konventionellen Strategien für die Depletion der  $T_{Reg}$  ermöglicht die Behandlung mit DT eine effizientere selektive Depletion der  $Foxp3^+$  T-Zellen, ohne die  $CD25^+$  T-Effektorzellen zu beeinflussen (Lahl *et al.*, 2007). Die Analyse des Phänotyps der DEREK Mäuse zeigt eine *Foxp3*- und eGFP-Expression in  $T_{Reg}$ , welche mit der in zuvor publizierten *Foxp3* „Reporter“ Mäusen gezeigten vergleichbar ist (Collison *et al.*, 2007; Rubtsov *et al.*, 2008).

Die DT Anwendung an drei aufeinanderfolgenden Tagen führt dazu, dass ein Großteil der  $T_{Reg}$  depletiert werden. Durch dieses Applikationsschema wurde ein Zeitfenster von drei bis fünf Tagen erzeugt, in dem die Zahl  $T_{Reg}$  statistisch signifikant reduziert war, ohne eine offensichtliche Pathologie zu erzeugen. Die Analyse der  $T_{Reg}$  zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Depletion zeigte eine sehr schnelle Wiederherstellung der  $T_{Reg}$ -Population, welche ungefähr drei Tage nach der letzten Injektion mit DT begann. Diese starke Neubildung konnte auch in anderen Publikationen demonstriert werden, welche eine stärkere homöostatische Proliferation von  $T_{Reg}$  im Vergleich zu naiven  $CD4^+$  T-Zellen zeigen (Gavin *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2008). Nach der temporären Depletion der  $T_{Reg}$  mit DT in DEREK-Mäusen hat sich das Niveau an  $GFP^+Foxp3^+$   $T_{Reg}$  sehr schnell wieder normalisiert. Dadurch sind die

DEREG-Mäuse ein ideales Modell, um den Einfluss der  $T_{Reg}$  auf das T-Zellpriming während des initialen Antigenkontakts durch Vakzine zu analysieren und die Anwesenheit funktioneller  $T_{Reg}$  sicherzustellen. Im Gegensatz dazu führt einer Behandlung mit anti-CD25 Antikörper zu einer mindestens zwei Wochen lang anhaltenden Depletion. Daher beeinflusst die Abwesenheit der  $T_{Reg}$  nicht nur das Priming, sondern auch die Expansions- und Kontraktionsphase.

Es ist bisher nicht bekannt, ob die schnelle Neubildung der  $T_{Reg}$  nach der Depletion aufgrund einer Neugenerierung der  $T_{Reg}$  im Thymus mit darauffolgender homöostatischer Proliferation, durch die Proliferation der restlichen  $T_{Reg}$  oder durch Konversion naiver oder konventioneller T-Zellen in die Peripherie entsteht. Studien, welche das DT-Modell verwendeten, zeigten, dass die *in vivo* Funktion der  $T_{Reg}$  zum schnellen Auffüllen der unbesetzten Kompartimente angeboren ist und die  $T_{Reg}$  in der Neubildungsphase nicht vollfunktionell sind (Haudebourg *et al.*, 2009). Die Beobachtungen vorangegangener Studien zeigten eine fehlende  $T_{Reg}$  Funktion während der Proliferationsphase *in vitro* (Takahashi *et al.*, 1998; Thornton und Shevach, 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die nach der Depletion neugenerierten  $T_{Reg}$  *ex vivo* vergleichbare suppressive Funktionen wie die ursprünglichen  $T_{Reg}$  aufwiesen. Dagegen spricht die niedrigere Parasitämie der DEREG-Mäuse, deren  $T_{Reg}$  drei Wochen vor der Infektion mit *P. yoelii* depletiert wurden. Möglicherweise haben die neugenerierten  $T_{Reg}$  andere Eigenschaften *in vivo*. Um diese Hypothese zu unterstützen, sind weitere Experimente, z. B. eine bessere phänotypische und funktionelle Charakterisierung der neugenerierten  $T_{Reg}$ , notwendig.

## **2. Depletion der $T_{Reg}$ als Therapie bei Erkrankungen**

Über Auswirkungen einer Depletion der  $T_{Reg}$  im Menschen existieren bisher nur unzureichende Ergebnisse, die aus retrospektiven oder kleinen prospektiven Studien aus der Transplantationsmedizin und der Onkologie stammen (Ensor *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). Die Auswirkung einer Depletion der  $T_{Reg}$  zu späteren Zeitpunkten in der Tumorentwicklung oder im Verlauf von Infektionen beim Menschen, welche für therapeutische Zielsetzungen von entscheidender Bedeutung wäre, ist nicht hinreichend geklärt.

In onkologischen Studien über die Rolle der  $T_{Reg}$  im fortgeschrittenen Stadium maligner Tumorerkrankungen (Mamakarzinom, Ovarialkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolorektalkarzinom) konnte, im Vergleich zum Frühstadium maligner Tumorerkrankungen,

eine erhöhte Anzahl regulatorischer Zellen in peripherem Blut sowie die Infiltrierung des Tumorgewebes mit regulatorischen Zellen gezeigt werden. (Curiel *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2007). Auch konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl der T<sub>Reg</sub> mit der Tumorprogression korreliert (Beyer und Schultze, 2006; Beyer *et al.*, 2006).

Die Depletion der T<sub>Reg</sub> durch gegen CD25 gerichtete Antikörper (Daclizumab, Zenapax, Roche) konnte in mehreren onkologischen Studien erste Erfolge aufzeigen (Barnett *et al.*, 2005; Simova *et al.* 2006). Eine erfolgreiche Generierung zytotoxischer T-Lymphozyten konnte beobachtet werden, wenn ein Vakzin mit Tumorantigen während der Daclizumab induzierten T<sub>Reg</sub> Depletion angewendet wird. Dies legt nahe, dass Daclizumab ein wirksames Therapeutikum für Patienten mit Tumorerkrankungen sein kann (Rech und Vonderheide, 2009). Als Schwachpunkt der Therapie mit anti-CD25 Antikörper muss jedoch gesehen werden, dass die Depletion mit Anti-CD25 Antikörpern relativ unspezifisch ist und neben den T<sub>Reg</sub> auch andere Zellen depletiert werden, was zu einer starken Anfälligkeit für Infektionen und selbstgerichtete Immunreaktionen führen kann (Kohm *et al.*, 2006; Baumann, 2009).

In anderen onkologischen Studien wurde, um T<sub>Reg</sub> *in vivo* zu depletieren, ein Fusionsprotein aus IL-2 und Diphtherie Toxin (DT) (Denileukin Diftitox, Ontak, Seragen) verwendet. Über das IL-2 bindet dieses Fusionsprotein an CD25 auf T<sub>Reg</sub> und wird internalisiert. In der Zelle wird das DT aktiviert und verhindert die weitere Proteinbiosynthese durch die Blockade des Elongationsfaktor-2 (EF-2), wodurch die Zelle stirbt. Berichte über den durch Ontak erreichten Erfolg in der Depletion der T<sub>Reg</sub> in Melanompatienten sind jedoch kritisch zu betrachten, auch wenn in einer Studie 90% der mit Ontak behandelten Patienten eine Produktion melanomspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten, konnte dadurch keine verbesserte Prognose erreicht werden (Attia *et al.*, 2005; Mahnke *et al.*, 2007). In der Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphomes zeigte das Fusionsmolekül aus IL-2 und Diphtherie Toxin jedoch eine sehr hohe Effektivität (Finn, 2008).

### **3. ACT-CSP als Impfmodell**

Trotz der Fortschritte in der Erforschung antimalarischer Medikamente hat das immer häufigere Auftreten multiresistenter *P. falciparum* Stämme seit 1960 die Behandlung der Parasitose sehr problematisch gemacht (Warhust, 2003). Die Resistenz von *P. falciparum* gegen Artemisin, welches in der Behandlung der chloroquinresistenten Malaria tropica

wirksam ist, wurde 2009 in Kambodscha bestätigt (Le Ker, 2009). Hierzu ist weiterhin die Entwicklung effektiver Vakzine von entscheidender Bedeutung.

Eine effiziente Impfung gegen Malaria führt im Idealfall zu einer sterilen Immunität gegen das Leberstadium der Malaria, da hierdurch der Erreger vor der Entwicklung einer Parasitämie und damit vor dem Auftreten klinischer Symptome im Patienten bekämpft werden würde. Die Immunisierung mit einer großen Anzahl  $\gamma$ -bestrahlter Sporozoiten war für lange Zeit das einzige Modell, das in Nagetieren und Menschen eine sterile Immunität induziert hat. Sporozoitenbasierte Vakzine sind jedoch mit verschiedenen Problemen assoziiert. Neben der Tatsache, dass die Produktion kompliziert ist, sind diese auch aufgrund logistischer Probleme, wie beispielsweise Lagerung, Transport und Anwendung, unter realistischen Bedingungen in der Anwendung sehr beschränkt. Aufgrund dessen liegt der Fokus der Impfstoffforschung daher in der Entwicklung von Subunit-Impfstoffen, welche aus Antigenen des Leberstadiums bestehen (Kanoi und Egwang, 2007).

Ein effektives Vakzin gegen die Malaria sollte auch das Antigen in den MHC-Klasse-I-Weg einschleusen und dadurch seine Präsentation zu  $CD8^+$  T-Zellen erlauben. Bisher wurden verschiedene DNA-Impfungen, virale Komponenten und virale bzw. bakterielle rekombinante Vektoren als Trägermittel für Impfungen evaluiert (Sedegah *et al.*, 1994). Alle bisher aufgeführten Strategien werden allerdings durch verschiedene Umstände limitiert, zum Beispiel die eingeschränkte Anzahl gut charakterisierter Malariaantigene bzw. immundominanter Antigene. Auch Beschränkungen in der Effizienz, mit der Antigene in den MHC-Klasse-I-Weg eingebracht werden können, und dem Mangel an geeigneten Adjuvantien stellen ein Problem dar (Schlecht *et al.*, 2004).

Das Circumsporozoitenprotein (CSP) ist das, in der Leberphase, am besten charakterisierte Malariaantigen (Kumar *et al.*, 2002). Eine sterile Immunität gegen Malaria kann durch die Induktion  $IFN\gamma$  produzierender  $CD8^+$  T-Zellen, welche CSP-Epitope auf der Oberfläche infizierter Hepatozyten erkennen, erreicht werden (Zavala *et al.*, 1987). CSP-spezifische  $CD8^+$  T-Zellen können auch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) induzieren, was zu einer Eliminierung der intrazellulären Parasiten beiträgt (Schofield *et al.*, 1987; Romero *et al.*, 1989, Doolan *et al.*, 1996).

Vakzine mit CSP-Epitopen können in immunisierten Tieren die Ausprägung der Leberphase signifikant verringern und sogar eine sterile Immunität hervorrufen. Im Menschen erwies sich dies als weitaus schwieriger, jedoch führte auch hier die Impfung mit „RTS,S/ASO2A“ in

mehr als der Hälfte der freiwilligen Probanden zu vielversprechenden Ergebnissen (Kester *et al.*, 2008). In Kindern führte dieser Impfstoff zu einer verringerten Infektionshäufigkeit nach der Vakzinierung und einem verringertem Auftreten schwerer Malariaerkrankungen (Alonso *et al.*, 2005; Bejon *et al.*, 2008; Guinovart *et al.*, 2009).

Studien mit verschiedenen rekombinanten trägerbasierten Vakzinen haben eine protektive, aber nicht langanhaltende CSP-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort induziert (Sedegah *et al.*, 1994; Lanar *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde die protektive Effizienz des rekombinanten experimentellen Stoffes ACT-CSP im Kontext einer Diphtherietoxin induzierten Depletion der T<sub>Reg</sub> evaluiert. *B. pertussis* Adenylatzyklase (ACT) hat eine hohe Affinität für das Integrin  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$  (CD11b/CD18), das präferenziell auf myeloiden Zellen wie dendritische Zellen (DCs) exprimiert wird. Diese Affinität für CD11b/CD18 erlaubt den effizienten Transport der Antigene zu den antigenpräsentierenden Zellen (APZ) (Karimova *et al.*, 1998; El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003; Schlecht *et al.*, 2004). ACT-CSP ermöglicht die Einschleusung des CD8<sup>+</sup> T-Zellepitops CSP von *P. berghei* und des Ovalbumin-Peptid SIINFEKL auf dem MHC Klasse I-Präsentationsweg. Das OVA-Epitop SIINFEKL diente dem Nachweis der biologischen Aktivität des Moleküls *in vitro* (Tartz, 2006).

ACT-CSP verursacht ohne Hilfe von Adjuvantien eine starke Th1-Polarisierung und induziert eine Immunantwort gegen ein einziges protektives Epitop von CSP von *P. berghei* ANKA. Eine einzelne Dosis ACT-CSP induziert eine hohe Anzahl CSP-spezifischer und SIINFEKL-spezifischer IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz, Leber und Blut immunisierter Mäuse. Die Zahl, Funktion und biologische Aktivität dieser T-Zellen kann mittels MHC-Klasse-I Multimertechnologie und ELISPOT analysiert werden. Die durch ACT-CSP vermittelte Immunantwort ist aber für den Schutz nicht ausreichend (Tartz *et al.*, 2007).

Mit dem Konstrukt ACT-CSP wurden Mäuse aus der F1 Generation der Kreuzung von C57Bl/6 und Balb/c immunisiert, die das Epitop OVA<sub>257-264</sub>, sowie das Epitop CSP<sub>245-253</sub> präsentieren können. Diese F1 Mäuse tragen MHC-I-Moleküle vom Haplotyp H2-K<sup>b</sup> aus den C57Bl/6-Mäusen und MHC-I-Moleküle vom Haplotyp H2-K<sup>d</sup> aus BALB/c-Mäusen. Die Verwendung dieses Mausstammes ermöglicht den simultanen Nachweis von OVA- und CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten (Fayolle *et al.*, 2001; Schlecht *et al.*, 2004, Tartz *et al.*, 2007).

#### **4. Die Depletion der T<sub>Reg</sub> während der Immunisierung mit ACT-CSP verbesserte die spezifische T-Zellantwort**

T<sub>Reg</sub> können die Differenzierung der T-Zellen zu protektiven T-Effektorzellen supprimieren (Sakaguchi *et al.*, 2009). Möglicherweise limitieren T<sub>Reg</sub> das CD8<sup>+</sup> T-Zellpriming durch Hemmung der Aktivierung von DC. Dies lässt die Möglichkeit offen, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellhilfe benötigt wird, um die T<sub>Reg</sub> vermittelte Inhibierung der DC aufzuheben (Smith *et al.*, 2004; Filatenkov *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit verursachte der temporäre Verlust von T<sub>Reg</sub> in DEREK-Mäusen eine Verstärkung der spezifischen T-Zellantwort. Während der Depletion der T<sub>Reg</sub> im Verlauf des Primings konnte eine stark erhöhte Zahl IFN $\gamma$  produzierender CSP-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden. Es ist festzustellen, dass zum Zeitpunkt der *ex vivo* Analyse die T<sub>Reg</sub> Population ihre ursprüngliche Größe wieder erreicht hatte und ihre Funktionalität *in vitro* nachgewiesen wurde. Dies legt nahe, dass die Anwesenheit der T<sub>Reg</sub> während des initialen Antigenkontakts die Zahl der T-Effektorzellen vermindert.

Ebenso wurde die Immunantwort, die durch einen Challenge mit *P. berghei* drei Wochen nach der Immunisierung verstärkt ausgelöst wurde, auch wenn der Anteil an T<sub>Reg</sub> wieder vollkommen hergestellt war. Der Challenge mit *P. berghei* Sporozoiten stellt sehr hohe Anforderungen an die hervorgerufene Immunantwort. Nur sehr wenige Hepatozyten werden infiziert und innerhalb von drei Tagen kann eine einzelne infizierte Zelle bis zu 30000 Merozoiten freisetzen. Was ausreicht, um die Blutphase der Malariaerkrankung auszulösen. Nach einer Infektion mit *P. berghei* Sporozoiten entwickelten die während des Primings von T<sub>Reg</sub> depletierten Mäusen eine verlangsamte Blutphase im Vergleich zu den immunisierten Kontrollmäusen. Das deutet darauf hin, dass die beobachtete Erhöhung der CSP-spezifischen T-Zellantwort die Anzahl der infizierten Hepatozyten verringert und die Ausschüttung der Merozoiten in der Leber begrenzt, da kein Einfluss einer T<sub>Reg</sub> Depletion auf die Entwicklung der Infektion während der Blutphase der *P. berghei* ANKA Infektion in nichtimmunisierten Mäusen beobachtet wurde.

Die in der Milz erhöhte Expansion CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen hat aber nicht ausgereicht, um die Freisetzung der Parasiten ins Blut komplett zu verhindern. Die Immunisierung mit ACT-CSP im Kontext der effektiven Depletion der T<sub>Reg</sub> vermittelte nur einen partiellen Schutz und keine sterile Immunität, was mit dem Immunisierungszeitpunkt

zusammenhängen könnte. Es existiert nur ein sehr kleines Zeitfenster, in dem T-Effektorzellen die infizierten Hepatozyten bekämpfen können, da mit den ersten freigesetzten Merozoiten der Übergang in die Blutphase ausgelöst wird. Deswegen können kleine Veränderungen im Immunisierungsablauf für Unterschiede im Schutz verantwortlich sein. Eine andere Erklärung wäre, dass außer den  $T_{Reg}$ , noch weitere Mechanismen an der negativen Regulation der T-Effektorzellen beteiligt sind oder andere Mechanismen als  $IFN\gamma$  an der Protektion beteiligt sind. Für die Eliminierung der Plasmodien sind nicht nur die spezifischen T-Zellen wichtig, sondern auch die Zellen der angeborenen Immunabwehr. Makrophagen, DC, NK-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen haben auch im Verlauf der Malariainfektion, in der Einleitung der spezifischen Immunantwort, eine besondere Bedeutung (Stevenson und Riley, 2004). Während der Infektion mit *P. falciparum* sind beispielsweise  $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen eine frühe Quelle von  $IFN\gamma$ . Außerdem zeigen NK-Zellen eine zytotoxische Wirkung auf infizierte Erythrozyten (de Souza *et al.*, 1997; Mohan *et al.*, 1997).

Nach einer Immunisierung mit ACT-CSP fanden sich in der Milz ungefähr 70% zentrale (TCM) und 30% Effektor-T-Memoryzellen (TEM) (Tartz, 2006). TCM werden hauptsächlich in lymphatischen Organen gefunden. TEM sind in nichtlymphatischen Organen prädominant. Sie sind durch schnelle Effektorfunktionen nach Antigenkontakt, wie Zytokinfreisetzung und zytotoxische Aktivität, gekennzeichnet (Carvalho *et al.*, 2002; Wherry *et al.*, 2003). Die Persistenz von TEM in der Leber ist für die Protektion während der Leberphase der Malaria kritisch, da diese Zellen nach Antigenkontakt schnell expandieren sowie IL-2 sekretieren (Carvalho *et al.*, 2002; Lanzavecchia *et al.*, 2004). Vorangegangene Studien zeigten, dass  $IFN\gamma$  produzierende TEM, die auch zytotoxische Aktivität haben, für den Schutz gegen schnell replizierende Pathogene wie *Plasmodium* von größerer Bedeutung sind (Reyes-Sandoval *et al.*, 2008). Die kontinuierliche Abnahme der Zahl der TEM in der Leber in Abwesenheit von Antigenkontakt assoziierte einen Verlust der protektiven Immunität. (Krzych *et al.*, 2000; Berenson *et al.*, 2003). Es wurde auch gezeigt, dass TCM sich im Verlauf des Leberstadiums der Malaria in potente  $T_{Eff}$  differenzieren und stark proliferieren können. Diese Zellen sind an der Protektion gegen Malaria nach einer Immunisierung oder einer natürlichen Infektion beteiligt. (Keating *et al.*, 2005; Todryk *et al.*, 2008). Möglicherweise ist eine dauerhafte protektive Immunität gegen Sporoziten Resultat eines Gleichgewichts von TCM und TEM. Die Produktion anderer Zytokine als  $IFN\gamma$ , wie  $TNF\alpha$  oder IL-2, kann das Potenzial antigenspezifischer T-Zellen erhöhen (Korten *et al.*, 2005).

Dies deutet darauf hin, dass die gesteigerte Induktion von T-Zellen in Abwesenheit von T<sub>Reg</sub> durch eine starke Kontraktion der T-Zellpopulation begleitet wird. In DERE- und Kontrollmäusen konnte mehrere Wochen nach der Impfung mit ACT-CSP kein Unterschied in der Zahl der CSP-spezifischen T-Zellen gefunden werden, obwohl in beiden Gruppen noch eine signifikante Zahl an CSP-spezifischen T-Zellen weiterhin nachweisbar sind.

In diesem Modell erzeugte die Depletion der T<sub>Reg</sub> während der primären Immunisierung mit ACT-CSP keine bessere CSP-spezifische Memory-Antwort. Die erhöhte Anzahl an antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der T<sub>Reg</sub> Depletion war nicht dauerhaft. Drei Monate nach der Immunisierung gab es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den depletierten Mäusen und den Kontrolltieren und die Gesamtzahl der IFN $\gamma$ -produzierenden CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen veränderte sich nur wenig. Die Erhöhung der Anzahl impfspezifischer T-Zellen korrelierte nicht mit der Anzahl der T-Memoryzellen in diesem Modell, was zur Annahme führt, dass die Anzahl spezifischer T-Memoryzellen innerhalb eines Zeitraums von drei Monaten unter einen kritischen Schwellenwert fallen. Es kann sein, dass die Stärke der Effektorantwort kein geeigneter Parameter ist, um das protektive Potenzial einer Impfung zu bewerten, da die IFN $\gamma$  produzierenden T-Effektorzellen nach einer Stimulierung sehr schnell nach ihrer Aktivierung an Apoptose zugrunde gehen könnten. Die Depletion der T<sub>Reg</sub> während der „Boost“-Immunisierung induzierte keinen weiteren Anstieg der spezifischen Immunantwort. Das Priming mit ACT-CSP mit darauffolgender Depletion der T<sub>Reg</sub> erhöhte die CSP-spezifische T-Zellantwort und erzeugte einen partiellen Schutz gegen die Entwicklung der Parasitämie. Auch wenn die Depletion der T<sub>Reg</sub> nach einer „Boost“-Immunisierung mit ACT-CSP zu einem signifikant besseren Schutz gegen die Parasitämie führte, konnte mit dieser Strategie keine weitere Steigerung der Anzahl CSP-spezifischer T-Zellen erreicht werden. Sehr ähnlich der Situation während des Primings, verschwinden die Unterschiede bei einer Beprobung zu einem späteren Zeitpunkt. Das heißt, die Anzahl der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen in Milz korrelierte nicht mit dem Grad des Schutzes. Das bedeutet, dass andere Mechanismen für die Protektion verantwortlich sind. Auch das tolerogene Milieu in der Leber, welches die Generierung von Anergie in T-Zellen fördert, könnte von Bedeutung für die Protektion sein (Limmer *et al*, 2000; Klugewitz *et al*, 2002).

Verschiedene Arten nichthämopoetischer Leberzellen, einschließlich sinusoidalen Endothelzellen und Sternzellen, welche sich im Subendothelraum befinden, und

Leberparenchymalzellen übernehmen die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen. Diese Zellen präsentieren Antigene im Zusammenhang mit immunsuppressiven Zytokinen und inhibitorischen Zelloberflächenliganden und lösen Immunantworten gegen Leberantigene aus, was oft in Toleranz endet (Crispe, 2009). Der Malariaparasit nutzt das Milieu der Leber, untergräbt eine Immunantwort und verursacht somit eine dauerhafte Infektion. Außerdem wird CSP nach der Infektion der Hepatozyten mit Sporozoiten nur sehr kurz exprimiert (Bodescot *et al*, 2004).

Die „Boost“-Immunisierung mit ACT-CSP zeigte in dieser Arbeit keinen Effekt auf die Anzahl der durch die „Prime“-Immunisierung ausgelösten T-Zellen. Eine Aktivierung induzierter  $T_{Reg}$  ( $iT_{Reg}$ ) infolge der Primärimmunisierung könnte nach der „Boost“-Immunisierung eine weitere Expansion antigenspezifischer T-Zellen verhindern. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass andere  $T_{Reg}$  Populationen in der „Priming“-Phase generiert werden und diese die Proliferation der Effektorzellen inhibieren können. Ein weiterer möglicher Faktor für den nur partiellen Erfolg der homologen „Prime/Boost“-Impfstrategie ist, dass T-Memoryzellen, in Vergleich zu naive T-Zellen, sensibler auf immunsuppressive Mechanismen reagieren (Bannard *et al.*, 2009; DiSpirito und Shen 2010).

Direkt nach der homöostatischen Proliferation, zeigen  $T_{Reg}$  ihr höchstes regulatorisches Potenzial (Gavin *et al*, 2002). Natürliche  $T_{Reg}$  und induzierte  $T_{Reg}$  zeigen unterschiedliche Eigenschaften. Es muss noch gezeigt werden, ob die Abwesenheit bestimmter Populationen von  $T_{Reg}$  während des Challenges einen besseren Schutz erzeugen kann.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit, dass eine spezifische und transiente Depletion der  $T_{Reg}$  eine impfinduzierte  $CD8^+$  T-Zellantwort während der „Prime“- und der „Boost“-Immunisierung verbessern kann. Eine Depletion der  $T_{Reg}$  während einer Immunisierung gegen Malaria ist nicht von einer erhöhten Anzahl an langlebigen T-Memoryzellen begleitet, obwohl sie zu einer erhöhten Anzahl kurzlebiger T-Effektorzellen führt, was das Hauptziel einer vorbeugenden Impfung ist. Dies kann wichtige Implikationen für die Impfstoffentwicklung haben. Folglich könnte eine transiente Inhibierung der Funktion der  $T_{Reg}$  von weitaus größerem Nutzen sein, wenn eine starke, aber kurzanhaltende Immunantwort benötigt wird, wie beispielsweise in therapeutischen Impfungen z. B. dagegen Tumoren, wo eine Immunantwort gegen Selbstantigene hervorgerufen werden soll. Das Design neuer Impfstrategien sollte nicht nur auf die Optimierung einer starken

Kurzzeitantwort fokussiert sein, da diese nicht zwingend notwendig für eine langandauernde Memoryantwort ist.

## **5. CTLA4-Blockade während der Immunisierung mit ACT-CSP hat nicht den gleichen Effekt wie eine Depletion der T<sub>Reg</sub>**

CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*, CD152) ist ein potentes koinhibitorisches Molekül, das für die periphere Toleranz notwendig ist. Auf aktivierten T-Zellen exprimiertes CTLA4 ist ein negativer Regulator der T-Zellaktivierung. Dieses Molekül konkurriert mit CD28 um die Bindung an CD80 bzw. CD86, was zur Inaktivierung der T-Zellen beiträgt (Walunas *et al.*, 1994; Krummel *et al.*, 1995). In T<sub>Reg</sub>, welche eine konstitutive Expression von CTLA4 zeigen, spielt dies eine zentrale Rolle bei der Suppression der T-Effektorzellen (Takahashi *et al.*, 2000; Grohmann *et al.*, 2002). Neue Ergebnisse legen nahe, dass CTLA4 seine immunregulatorischen Funktionen einerseits durch die Kontrolle antigenspezifischer T-Effektorzellen und andererseits durch die Kontrolle der T<sub>Reg</sub> ausübt (Ise *et al.*, 2010; Paterson und Sharpe, 2010).

Um zu untersuchen, ob die Blockade von CTLA4 eine vergleichbare Auswirkung wie die Depletion der T<sub>Reg</sub> bei der Suppression der impfinduzierten Immunantwort hatte, wurde ein monoklonaler, blockierender, Antikörper gegen CTLA4 in Kombination mit der „Prime“- oder „Boost“-Immunisierung mit ACT-CSP appliziert. Im Gegensatz zur Depletion der T<sub>Reg</sub> zeigte die Blockade der CTLA4-Interaktionen während der primären Immunisierung keine Auswirkung auf die Anzahl der aktivierten spezifischen T-Zellen. Die Applikation von anti-CTLA4 während der „Boost“-Immunisierung führte auch nicht zu einer gesteigerten T-Zellantwort. Es wurde kein Unterschied in der Anzahl der CD8<sup>+</sup> CSP-spezifischen T-Zellen in der Milz gefunden. Die Blockade der CTLA4-Interaktionen kann die Funktionen regulatorischer T-Zellen, die in Folge der Immunisierung aktiv werden, supprimieren, aber T-Effektorzellen können ebenso inhibiert werden. Dies wäre eine Erklärung für das Ausbleiben einer Erhöhung an CSP-spezifischen T-Zellen in diesem Modell. Möglicherweise könnte auch die Stärke der Expression von CTLA4 entscheidend für den Effekt seiner Blockade sein. T-Memoryzellen sind beispielsweise anfälliger für eine CTLA4-Blockade als aktivierte naive T-Zellen (Gregor *et al.*, 2004).

Kürzlich wurde gezeigt, dass eine transiente Blockade von CTLA4 eine Auswirkung hat, wenn sie während der „Boost“-Immunisierung angewandt wird. Im selben Model konnte auch gezeigt werden, dass sie eine erhöhte Anzahl an spezifischen T-Zellen zur Folge hat (Tartz, 2006). Dies steht im Widerspruch zur Depletion der  $T_{Reg}$ , die während der „Prime“- und „Boost“-Immunisierung wirkt, welche zur Vermutung führt, dass eine anti-CTLA4 Behandlung im ACT-CSP Impfmodell nicht die Funktion der  $T_{Reg}$  während der „Prime“-Immunisierung beeinträchtigt, aber vielleicht die Aktivierungsschwelle kürzlich aktivierter T-Zellen während des Antigenkontakt verändert. Eine CTLA4 Blockade führte während der „Boost“-Immunisierung zu einer höheren Schutzwirkung (Tartz *et al.*, 2007) als die  $T_{Reg}$  Depletion während der „Prime“- und „Boost“-Immunisierung. Dies deutet daraufhin, dass eine transiente Blockade negativer Kostimulatoren durch Antikörper effektiver für die Verbesserung von Impfstoffen sein könnte, als die Manipulierung der  $T_{Reg}$  Aktivität.

## **6. Effekte der Depletion der $T_{Reg}$ bei der Immunantwort gegen bestrahlte Sporozoiten**

Die Verwendung  $\gamma$ -bestrahlter (Nussenzweig *et al.*, 1967; Hoffman *et al.*, 1989) bzw. durch Mutation attenuierter Sporozoiten (Mueller *et al.*, 2005; Ting *et al.*, 2008) hat zu einem signifikantem Schutz während der Leberphase der Malaria geführt. Attenuierte Sporozoiten können zwar die Leberzellen infizieren, entwickeln sich aber nicht zu Merozoiten. Es kommt zu einer längeren Antigenpräsenz in der Leber und zur Induktion protektiver und lange vorhaltender zytotoxischer T-Zellantworten (Hoffmann *et al.*, 1990).

Eine Depletion der  $T_{Reg}$  während der Immunisierung mit  $\gamma$ -bestrahlten Sporozoiten von *P. berghei* wurde in dieser Arbeit durchgeführt. Mäuse, deren  $T_{Reg}$  depletiert wurden, hatten eine stärkere Immunantwort gegen  $\gamma$ -bestrahlte Sporozoiten als Kontrollmäuse. Die CSP-spezifische T-Zellantwort wurde verstärkt, aber auch die unspezifische Antwort nach Stimulierung mit anti-CD3 Antikörper war signifikant erhöht. Die Milzzellen haben mit einer starken Produktion von IFN $\gamma$  auch ohne Stimulation reagiert. Dies kann bedeuten, dass die Abwesenheit der  $T_{Reg}$  während der Immunisierung mit Sporozoiten eine Induktion der Zellen des angeborenen Immunsystems verursacht hat. Beispielsweise Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Natürliche T-Killerzellen (NKT-Zellen) und  $\gamma\delta$  T-Zellen sind in außergewöhnlich

großen Mengen in der Leber vorhanden (Crispe, 2009) und spielen eine wichtige Rolle im Verlauf der Malaria (Doolan und Martínez-Alier, 2006).

*P. falciparum* kann *in vitro* schnell humane  $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen aktivieren (Bouyou-Akotet und Mavoungou, 2009). Von Parasiten stammende Antigene, wie *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1 (PfEMP-1) und Glykosylphosphatidylinositol (GPI) können NK-Zellen stimulieren (Baratin *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2007).

Von Parasiten induziertes frühes IFN $\gamma$  stammt hauptsächlich von  $\gamma\delta$  T-Zellen, die beim Schutz gegen Malaria positiv mitwirken könnten (D'Ombrian *et al.*, 2007; D'Ombrian *et al.*, 2008).

## **7. *P. yoelii* als Modell für die Immunregulation im Verlauf der Blutphase der Malaria**

Im dritten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Depletion der T<sub>Reg</sub> auf den Verlauf einer *P. yoelii* Infektion in der Maus untersucht. Im Vergleich zur *P. berghei* ANKA Infektion, welche eine Th1-dominierte Immunantwort verursacht, kommt es bei der *P. yoelii* Infektion zur Sekretion von Th1-Zytokinen wie IFN $\gamma$ , aber auch IL-4, IL-10 und TGF $\beta$  (Omer *et al.*, 2003). Die starke Zytokinproduktion in der Blutphase der *P. yoelii* Infektion inhibiert die protektive CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort (Ocaña-Morgner *et al.*, 2007).

Th1- und Th2-Antworten sind für die Kontrolle der Parasitämie im Verlauf der *P. yoelii* Infektion wichtig (Riley *et al.*, 2006). Im Gegensatz zum *P. berghei*-Modell, verursacht *P. yoelii* keine zerebrale Malaria, eine Erklärung dafür wäre die Dominanz der Th1-Antwort bei der *P. berghei* ANKA Infektion (Lepeniev, 2007).

Im Gegensatz zu einer Infektion mit *P. berghei*, welche kaum Veränderungen in der T<sub>Reg</sub>-Anzahl verursacht, steigt die Zahl der Foxp3<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> in Milz und Blut der mit *P. yoelii* infizierten Mäuse an. Dies schließt aus, dass ruhende T<sub>Reg</sub> im Verlauf der Infektion aktiviert wurden. Während der *P. yoelii* Infektion migrieren DC in die Milz und produzieren TGF $\beta$ , Prostaglandin E2 (PGE2) und IL-10, welche die Differenzierung der T<sub>Reg</sub> unterstützen (Ocaña-Morgner *et al.*, 2007). So wurde gezeigt, dass PGE2 die Foxp3-Expression in T<sub>Reg</sub> induzieren kann (Sharma *et al.*, 2005).

Ein eindeutiger Anstieg von CD8<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> wurde in mit *P. yoelii* infizierten Dereg-Mäusen nachgewiesen. In naiven Mäusen ist diese Population mittels Durchflusszytometrie fast

undetektierbar.  $CD8^+Foxp3^+$   $T_{Reg}$  haben nur schwache zytotoxische Aktivität, aber produzieren IL-10. Plasmazytoide dendritische Zellen (DC2) induzieren die Differenzierung der  $CD8^+$   $T_{Reg}$  (Gilliet und Liu, 2002). Ihre Aktivierung ist von TGF $\beta$  und IL-10 abhängig, die im Verlauf der *P. yoelii* Infektion hochreguliert sind (Omer *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde die suppressive Kapazität der  $CD8^+$   $T_{Reg}$  nach der nicht letalen *P. yoelii* Infektion *ex vivo* bestätigt. Verschiedene regulatorische Wirkungen der  $CD8^+$   $Foxp3^+$   $T_{Reg}$  wurden in der Literatur beschrieben, aber ihre Rolle bleibt unklar. Diese Zellen können durch CTLA4 die Aktivierung von T-Effektorzellen verhindern. Zudem können sie durch LAG3 (lymphocyte-activation gene 3) MHC-II-Moleküle binden und die Reifung von DCs hemmen (Zozulya und Wiendl, 2008). LAG3 inhibiert die Expansion aktivierter T-Zellen und ist für die maximale suppressive Funktion der  $T_{Reg}$  nötig (Workman *et al.*, 2009).

## **8. Die Depletion der $T_{Reg}$ verbesserte die Immunantwort während der Blutphase einer *P. yoelii* Infektion, aber verstärkte deren Pathologie**

Bei der Infektion mit Py17NL verursachte die Depletion der  $T_{Reg}$  eine verstärkte T-Zellaktivierung, eine gesteigerte Zytokinproduktion und eine verminderte Parasitämie. Allerdings wurde eine Erhöhung der Lebertransaminasen festgestellt. Im Verlauf der Py17NL Infektion wurde in vorherigen Arbeiten die Infiltration von T-Zellen in die Leber nachgewiesen (Lepenes, 2007). Im Normalfall werden in der Leber aktivierte T-Zellen, zum Schutz vor Inflammation der Leber, teilweise inaktiviert (Ocaña-Morgner *et al.*, 2007). Es ist möglich, dass in Abwesenheit der  $T_{Reg}$  diese Inaktivierung nicht stattfindet, was eine Erklärung für die in dieser Arbeit beobachtete Leberpathologie in depletierten Mäusen wäre. Ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ist ausschlaggebend, um einerseits eine adäquate Protektion zu erhalten, jedoch andererseits um eine stark ausgeprägte Pathologie zu vermeiden (Chaiyaroj *et al.*, 2004). Dementsprechend ist der Preis einer Suppression antiinflammatorischer Mechanismen eine Verstärkung der Pathologie (Singh *et al.*, 2002).

Einer der Hauptfaktoren für eine derartige Leberpathologie ist TNF $\alpha$ , das nicht nur für die Inhibition der Parasitenreplikation wichtig ist, sondern auch für die Induktion pathogener Mechanismen wie Leberschädigung und Gewichtsverlust (Grau *et al.*, 1987; Lepenes, 2007). Im Gegensatz zu TNF $\alpha$  hat beispielsweise IL-10 eine protektive Wirkung gegen derartige

Leberpathologien. In Studien mit der Infektion durch *P. chabaudi* in IL-10 defizienten Mäusen konnte eine vergleichbare Steigerung in Leberpathologie und eine daraus resultierenden Letalität gezeigt werden (Sanni *et al.*, 2004). Durch die Depletion der T<sub>Reg</sub> im Verlauf der Infektion hat sich die IL-10-Produktion aber nicht reduziert. Es wurde mittels Durchflusszytometrie gezeigt, dass in der frühen Phase der Infektion die CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen die wichtigste Quelle von IL-10 sind. Dies korreliert mit einer Studie mit *P. falciparum* im Menschen, in der eine Erhöhung der IL-10-Produktion nachgewiesen wurde, für die die CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T-Effektorzellen verantwortlich waren (Walther *et al.*, 2009).

Auch eine verlängerte Depletion der T<sub>Reg</sub> verbesserte die Immunantwort gegen *P. yoelii* und die Parasitämiekurve zeigte einen linearen Verlauf statt der zwei klassischen Maxima. Es konnte gezeigt werden, dass T<sub>Reg</sub> direkt mit DC interagieren und ihren Reifungsstatus abschwächen. So könnten sie die Signalstärke einschränken, indem sie die Reifung der Dendritischen Zellen verhindern, was wiederum das Priming der T-Zellen beeinflusst. In dieser Theorie würde eine verlängerte Depletion der T<sub>Reg</sub> das Priming der T-Zellen erhöhen, was zu einer Zunahme der T-Effektorzellen führen würde.

In den Experimenten mit *in vivo* Depletion der T<sub>Reg</sub> konnte gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit *P. yoelii* die T<sub>Reg</sub> eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung der Immunantwort spielen, indem sie die T-Zellantwort eingeschränkt und damit eine Inflammation verhindert wird.

## V. Zusammenfassung

T<sub>Reg</sub> spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Immunantwort bei Autoimmunerkrankungen, bei der Tumorentstehung, in der Transplantationsmedizin und in Infektionen.

Das DEREK Mausmodell ist ein neues Hilfsmittel, um die Foxp3<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> *in vivo* zu analysieren. Die bisherigen Einschränkungen der antikörperbasierten Depletionsprotokolle werden umgangen, da die Foxp3<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> in DEREK Mäusen, jederzeit während der Immunantwort selektiv depletiert werden können. Dadurch können mit dem DEREK Modell weitaus besser Informationen über die Rolle der T<sub>Reg</sub> in Tumorerkrankungen, Autoimmunreaktionen, bei Transplantationen und Infektionen gewonnen werden (Lahl *et al.*, 2007). Die Kinetik der T<sub>Reg</sub> während der *in vivo* Depletion mit DT wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht. Es wurde belegt, dass die nach der Depletion neu generierten T<sub>Reg</sub> keine funktionellen Einschränkungen zeigten. Dies ist für zukünftige Therapieansätze von großem Interesse.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Funktion der T<sub>Reg</sub> im Verlauf der Immunisierung gegen die Leberphase einer *P. berghei* Infektion analysiert. Als experimenteller Träger für eine Impfung wurde rekombinantes Fusionsmolekül aus ACT von *Bordetella pertussis* und einem MHC-Klasse-I-Epitop von CSP aus *Plasmodium berghei* verwendet. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass ACT-CSP die Eigenschaft besitzt, ein Epitop von *Plasmodium berghei*-CSP in den MHC-Klasse-I Präsentationsweg von antigenpräsentierenden Zellen einzubringen und damit spezifisch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu induzieren.

Durch die Verwendung von DEREK Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Depletion der T<sub>Reg</sub> während der Priming-Phase zu einer Verstärkung der CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort führt. Dies führt nicht nur zu einer höheren CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellanzahl und stärkerer Zytokinproduktion, sondern auch zu einem besseren Schutz gegen einen Challenge mit Sporozoiten. Diese partielle protektive Immunität war aber nicht lang anhaltend. Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die Depletion der T<sub>Reg</sub> während einer Vakzinierung gegen Malaria nicht ausreichend ist, um eine sterile bzw. dauerhafte Immunität zu erreichen. Außerdem belegen sie, dass eine erhöhte Anzahl an T-Effektorzellen nicht notwendigerweise mit einer verbesserten Memory-T-Zellantwort korreliert.

T-Zellen sind für eine protektive Immunantwort notwendig, aber sie können auch im Falle einer unkontrollierten Aktivierung zu einer Pathologie führen. Deshalb ist eine effektive Regulation der T-Zellaktivität durch T<sub>Reg</sub> wichtig.

Das Ziel des dritten Teils der Arbeit war die Analyse der Funktion der T<sub>Reg</sub> im Verlauf der murinen *P. yoelii* Infektion. Die Depletion der T<sub>Reg</sub> im DEREK Mausmodell führte zu einer Reduktion der Parasitämie. Dies korrelierte mit einer verstärkten Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und mit der Zunahme der Th1-Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , aber auch der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 im Serum. Das bedeutet, dass die Depletion der T<sub>Reg</sub> während einer nichtletalen *P. yoelii* Infektion nicht die Polarisierung der Immunantwort veränderte, sondern die ablaufenden Th1- und Th2-Antworten insgesamt verstärkte.

Während einer *P. yoelii* Infektion, wurde die Steigerung der aktivierten T-Zellen infolge der Depletion der T<sub>Reg</sub> von einer gesteigerten Zytokinproduktion begleitet. Die systemische Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, hauptsächlich TNF $\alpha$ , war begleitet von einer ausgeprägte Leberpathologie. Dies zeigte das Risiko einer unkontrollierter T-Effektorzellexpansion durch Depletion der T<sub>Reg</sub>, weil damit eine Pathologie induziert wurde. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Bedeutung der T<sub>Reg</sub> für Protektion und Pathologie in einer nichtletalen *P. yoelii* Infektion gezeigt. Die *in vivo* Depletion der T<sub>Reg</sub> dokumentierte, dass diese Zellpopulation essenziell ist, um die T-Zellantwort im Verlauf der Malaria zu limitieren und damit eine exzessive Inflammation zu verhindern.

## VI. Literatur

Aandahl E.M., Michaelsson J., Moretto W.J., Hecht F.M., Nixon D.F. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 2004; 78: 2454-2459

Akdis C.A., Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001; 103(2): 131-136

Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke, K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9.Auflage, Urban und Fischer, Elsevier GmbH, München. 2005,

Alatrakchi N., Koziel M. Regulatory T cells and viral liver disease. *J Viral Hepat* 2009; 16(4): 223-9

Alonso P.L., Sacarlal J., Aponte J.J., Macete E., Aide P., Sigauque B., Milman J., Mandomando I., Bassat Q., Guinovart C., Espasa M., Corachan S., Lievens M., Navia M., Dubois M.C., Menendez C., Dubovsky F., Cohen J., Thompson R., Ballou W.R. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *The Lancet* 2005; 366: 2012-2018

Aly A.S., Vaughan A.M., Kappe S.H. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol* 2009; 63: 195-221

Anders R.F., Saul A. Malaria vaccines. *Parasitology Today* 2000; 16(10): 444-447

Andersen M.L., Ruhwald M., Nissen M.H., Buus S., Claesson M.H. Self-Peptides with Intermediate Capacity to Bind and Stabilize MHC Class I Molecules may be Immunogenic. *Scand J Immunol* 2003; 57(1): 21-27

Andersson J., Boasso A., Nilsson J., Zhang R., Shire N.J., Lindback S., Shearer G.M., Chougnat

C.A. Cutting edge: The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol* 2005; 174: 3143-3147

Andreassen K., Bendiksen S., Kjeldsen E., Van Ghelue M., Moens U., Arnesen E., Rekvig O.P. T cell autoimmunity to histones and nucleosomes is a latent property of the normal immune system. *Arthritis Rheum* 2002; 46(5): 1270-1281

Asano M., Toda M., Sakaguchi N., Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184: 387-396

Attia P., Maker A.V., Haworth L.R, Rogers-Freezer L., Rosenberg S.A. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother* 2005; 28(6): 582-592

Bacchetta R., Passerini L., Gambineri E., Dai M., Allan S.E., Perroni L., Dagna-Bricarelli F., Sartirana C., Matthes-Martin S., Lawitschka A., Azzari C., Ziegler S.F., Levings M.K., Roncarolo M.G. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006; 116(6): 1713-22

Bannard O., Kraman M., Fearon D. Pathways of memory CD8+ T-cell development. *Eur J Immunol* 2009; 39(8): 2083-7

Baratin M., Roetyneck S., Pouvelle B., Lemmers C., Viebig N.K., Johansson S., Bierling P., Scherf A., Gysin J., Vivier E., Ugolini S. Dissection of the role of PfEMP1 and ICAM-1 in the sensing of *plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by natural killer cells. *PLoS One* 2007; 2(2): e228

Barnes M.J., Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 2009; 31(3) :401-11

Barnett B., Kryczek I., Cheng P., Zou W., Curiel T.J. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54(6): 369-377

Baron U., Floess S., Wieczorek G., Baumann K., Grützkau A., Dong J., Thiel A., Boeld T.J., Hoffmann P., Edinger M., Türbachova I., Hamann A., Olek S., Huehn J. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37(9): 2378-89

Baumann K. DNA-Methylierungsmuster im *foxp3* Gen in humanen CD4<sup>+</sup> Foxp3-exprimierenden T-Zellen. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.). Medizinischen Fakultät Charité, Universitätsmedizin Berlin, 2009

BD Bioscience. Maus Inflammation Kit Instruction Manual, 2007

Becker C., Stoll S., Bopp T., Schmitt E., Jonuleit H. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med Microbiol Immunol* 2006; 195: 113-124

Bejon P., Lusingu J., Olotu A., Leach A., Lievens M., Vekemans J., Mshamu S., Lang T., Gould J., Dubois M.C., Demoitié M.A., Stallaert J.F., Vansadia P., Carter T., Njuguna P., Awuondo K.O., Malabeja A., Abdul O., Gesase S., Mturi N., Drakeley C.J., Savarese B., Villafana T., Ballou W.R., Cohen J., Riley E.M., Lemnge M.M., Marsh K., von Seidlein L. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N Engl J Med* 2008; 359(24): 2521-2532

Belkaid Y., Mendez S., Lira R., Kadambi N., Milon G., Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 2000; 165: 969-977

Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S., Shevach E.M., Sacks D.L. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; 420: 502-507

Belkaid Y., Rouse B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353-360

Bennett C.L., Christie J., Ramsdell F., Brunkow M.E., Ferguson P.J., Whitesell L., Kelly T.E., Saulsbury F.T., Chance P.F., Ochs H.D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001; 27(1) 20-21

Berenzon D., Schwenk R.J., Letellier L., Guebre-Xabier M., Williams J., Krzych U. Protracted protection to *Plasmodium berghei* malaria is linked to functionally and phenotypically heterogeneous liver memory CD8+ T cells. *J Immuno.* 2003; 171(4): 2024-2034

Beyer M., Kochanek M., Endl E. In vivo peripheral expansion of naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood* 2006; 107(10): 3940-3949

Beyer M., Schultze J.L. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006; 108(3):804-811

Bodescot, M., Silvie O., Siau A., Refour P., Pino P., Franetich J.F., Hannoun L., Sauerwein R., and Mazier D. Transcription status of vaccine candidate genes of *Plasmodium falciparum* during the hepatic phase of its life cycle. *Parasitol Res* 2004; 92: 449-452

Böttler T.M. Rolle von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen bei der chronischen HCV-Infektion. Dissertation zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, 2005

Boudosquié C., Pellaton C., Barbier N., Spertini F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell depletion impairs tolerance induction in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 2009; 16

Bouharoun-Tayoun H., Oeuvray C., Lunel F., Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 182: 409-418

Bouma G., Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(7): 521-33

Bouyou-Akotet M.K., Mavoungou E. Natural killer cell IFN-gamma-activity is associated with *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy. *Exp Parasitol* 2009; 123(3): 265-8

Bruch-Gerharz D., Ruzicka T., Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in the pathogenesis of inflammatory dermatoses. *J Dtsch Dermatol Ges* 2003; 1(11): 894-905

Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paepfer B., Clark L.B., Yasayko S.A., Wilkinson J.E., Galas D., Ziegler S.F., Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27(1): 68-73

Butcher G.A. Models for malaria: Nature knows best. *Parasitology Today* 1996; 12, 378-382

Carrier Y., Yuan J., Kuchroo V., Weiner H. Th3 cells in peripheral tolerance. *The Journal of Immunology* 2007; 178: 179-185

Carter B., Diggs C.L. Parasitic Protozoa, Third Edition: 359-465. Academic Press, New York, 1977

Carvalho L.H., Sano G.I., Hafalla J.C.R., Morrot A., Curotto de Lafaille M.A., Zavala F. IL-4 secreting CD4<sup>+</sup> T cells are crucial to the development of CD8<sup>+</sup> T cell responses against malaria liver stages. *Nature Medicine* 2002; 8: 166-170

Center of Disease Control (CDC), Division of Parasitic Diseases (DPDx), *Public Health Image Library* 2006

Chaiyaroj S.C., Rutta A.S., Muenthaisong K., Watkins P., Na Ubol M., Looareesuwan S. Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. *Acta Trop* 2004; 89(3): 319-327

Chakravorty S.J., Craig A. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur J Cell Biol* 2005; 84(1): 15-27

Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G., Wahl S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198(12): 1875-86

Chizzolini C., Grau G.E., Geinoz A., Schrijvers D. T lymphocyte interferon gamma production induced by *Plasmodium falciparum* antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 95-99

Claesson M.H., Bregenholt S., Bonhagen K., Thoma S., Möller P., Grusby M.J., Leithäuser F., Nissen M.H., Reimann J. Colitis-inducing potency of CD4+ T cells in immunodeficient, adoptive hosts depends on their state of activation, IL-12 responsiveness, and CD45RB surface phenotype. *J Immunol* 1999; 162(6): 3702-10

Clark I.A., Rockett K.A., Cowden W.B. Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *Lancet* 1990; 340: 894-896

Clark I.A., Alleva L.M., Mills A.C., Cowden W.B. Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 17: 509-539

Clyde D.F., Most H., McCarthy V.C., Vanderberg J.P. Immunization of man against sporozoite induced falciparum malaria. *Am J Med Science* 1973; 266: 169-177

Cohen S., Lambert P.H. Immunology of parasitic infections. Oxford, GB: Blackwell Science Publications, 1982

Cohen J., Nussenzweig V., Nussenzweig R., Vekemans J., Leach A. From the circumsporozoite protein to the RTS,S/AS candidate vaccine. *Hum Vaccin* 2009; 6(1)

Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., Vignali K.M., Cross R., Sehy D., Blumberg R.S., Vignali D.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450 (7169): 566-569

Confer D.L., Eaton J.W. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 1982; 217: 948-950

Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 2009; 70(4): 326-36

Costa V., Oliva T., Norton L. Successful treatment with daclizumab of refractory anaplastic lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 13

Couper KN, Blount DG, de Souza JB, Suffia I, Belkaid Y, Riley EM. Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3+ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J Immunol* 2007; 178(7): 4136-46

Crispe I.N. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 147-63

Curiel T.J., Coukos G., Zou L. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10 (9): 942-949

Czerkinsky C.C., Nilsson L.A., Nygren H., Ouchterlony O., Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 109-121

Dadaglio G., Moukrim Z., Lo-Man R., Sheshko V., Sebo P., Leclerc C. Induction of a polarized Th1 response by insertion of multiple copies of a viral T cell epitope into adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 2000; 68: 3867-3872

De Souza, J. B., Williamson K. H., Otani T., Playfair J. H. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infection and immunity* 1997; 65: 1593-1598

Dieckmann D., Plottner H., Berchtold S., Berger T., Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp*

*Med* 2001; 193(11): 1303-1310

DiSpirito J.R., Shen H. Quick to remember, slow to forget: rapid recall responses of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Cell Res* 2010; 20(1): 13-23

D'Ombra MC, Hansen DS, Simpson KM, Schofield L. Gammadelta-T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN-gamma response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur J Immunol* 2007; 37(7): 1864-73

D'Ombra M.C., Robinson L.J., Stanicic D.I., Taraika J., Bernard N., Michon P., Mueller I., Schofield L. Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. *Clin Infect Dis* 2008; 47(11): 1380-7

Doolan D.L., Sedegah M., Hedstrom R.C., Hobart P., Charoenvit Y., Hoffman S.L. Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8<sup>+</sup> cell-, interferon gamma- and nitric oxide-dependent immunity. *J Exp Med* 1996; 183: 1739-1746

Doolan D.L., Martinez-Alier N. Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Curr Mol Med* 2006; 6(2): 169-85

Duggan P.J., Ponchel F., Matarese G., Lombardi G., Edwards A.D., Isaacs J.D., Lechler R.I. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; 98(9): 2736-2744

El-Azami-El-Idrissi M., Bauche C., Loucka J., Osicka R., Sebo P., Ladant D., Leclerc C. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem* 2003; 278: 38514-38521

Engvall E., Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of

immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871-874

Engwerda C.R., Good M.F. Disarming the malaria parasite. *Nature Medicine* 2008; 14 (9): 912-913

Ensor C.R., Cahoon W.D. Jr., Hess M.L., Kasirajan V., Cooke R.H. Induction of immunosuppression for orthotopic heart transplantation: a review. *Prog Transplant* 2009; 19(4): 333-41

Esensten J.H., Wofsy D., Bluestone J.A. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5(10): 560-5

Fayolle C., Abdel-Motal U.M., Berg L., Deriaud E., Jondal M., Leclerc C. Induction of cytotoxic T-cell response by optimal-length peptides does not require CD4<sup>+</sup> T-cell help. *Immunology* 1996;89(1): 41-45

Fayolle C., Sebo P., Ladant D., Ullmann A., Leclerc C. In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8<sup>+</sup> T cell epitopes. *J Immunol* 1996, 156: 4697-4706

Fayolle C., Osičkova A., Osička R., Henry T., Rojas M.J., Saron M.F., Sebo P., Leclerc C. Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity. *J Virol* 2001; 75: 7330-7338

Filatenkov A.A., Jacovetty E.L., Fischer U.B., Curtsinger J.M., Mescher M.F., Ingulli E. CD4 T cell-dependent conditioning of dendritic cells to produce IL-12 results in CD8-mediated graft rejection and avoidance of tolerance. *J Immunol* 2005; 174(11): 6909-6917

Filion M.C., Proulx C., Bradley A.J., Devine D.V., Sekaly R.P., Decary F., Chartrand P. Presence in peripheral blood of healthy individuals of autoreactive T cells to a membrane antigen present on bone marrow-derived cells. *Blood* 1996; 88(6): 2144-2150

Finn O.J. Cancer Immunology. *N Engl J Med* 2008; 358: 2704-2715

Floess S., Freyer J., Siewert C., Baron U., Olek S., Polansky J., Schlawe K., Chang H.D., Bopp T., Schmitt E., Klein-Hessling S., Serfling E., Hamann A., Huehn J. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007; 5(2): e38

Florens L. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 2002; 419 (3): 520-526

Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programmes the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336

Gardner M.J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R.W., Carlton J.M., Pain A., Nelson K.E., Bowman S., Paulsen I.T., James K., Eisen J.A., Rutherford K., Salzberg S.L., Craig A., Kyes S., Chan M.S., Nene V., Shallom S.J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Pertea M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M.W., Vaidya A.B., Martin D.M., Fairlamb A.H., Fraunholz M.J., Roos D.S., Ralph S.A., McFadden G.I., Cummings L.M., Subramanian G.M., Mungall C., Venter J.C., Carucci D.J., Hoffman S.L., Newbold C., Davis R.W., Fraser C.M., Barrell B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002; 419 (3): 498-509.

Gavin M.A., Clarke S.R., Negrou E., Gallegos A., Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3(1): 33-41

Gavin M.A., Rasmussen J.P., Fontenot J.D., Vasta V., Manganiello V.C., Beavo J.A., Rudensky A.Y. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007. 445(7129): 771-775

Gershon R.K., Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18(5): 723-737

Giha H.A., Staalsoe T., Dodoo D., Elhassan I .M., Roper C., Satti,G.M., Arnot D.E., Theander

T.G., Hviid, L. Nine-year longitudinal study of antibodies to variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect Immun* 1999; 67: 4092-4098

Gilliet M., Liu Y.J. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195(6): 695-704

Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Immunology, 5th edition, W. H. Freeman, New York, 2003

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

Grau G.E., Fajardo L.F., Piguet P.F., Allet B., Lambert P.H., Vassalli P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987; 237(4819): 1210-1212

Graves P., Gelband H. Vaccines for preventing malaria. *Cochrane data base of sytematic reviews* 2006

Gray W., Szabos G., Otero A.S., Gray L., Hewlett E. Distinct mechanisms for K<sup>+</sup> efflux, intoxication and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 18260-18267

Gregor P.D., Wolchok J.D., Ferrone C.R., Buchinshky H., Guevara-Patino J.A., Perales M.A., Mortazavi F., Bacich D., Heston W., Latouch J.B., Sadelain M., Allison J.P., Scher H.I., Houghton A.N. CTLA4 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* 2004; 22: 1700-1708

Grohmann U., Orabona C., Fallarino F., Vacca C., Calcinaro F., Falorni A., Candeloro P., Belladonna M.L., Bianchi R., Fioretti M.C., Puccetti P. CTLA4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3: 1097-1101

Groux H., Sornasse T., Cottrez F., De Vries J.E., Coffman R.L., Roncarolo M.G., Yssel H. Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFNgamma receptor beta-chain expression. *J Immunol* 1997; 158(12): 5627-5631

Guinovart C., Aponte J.J., Sacarlal J., Aide P., Leach A., Bassat Q., Macete E., Dobaño C., Lievens M., Loucq C., Ballou W.R., Cohen J., Alonso P.L. Insights into long-lasting protection induced by RTS,S/AS02A malaria vaccine: further results from a phase IIb trial in Mozambican children. *PLoS One* 2009;4(4) :e5165 2009

Hansen D.S., D'Ombrain M.C., Schofield L. The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(4): 416-23

Haudebourg T., Poirier N., Vanhove B. Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation. *Transpl Int* 2009; 22(5): 509-18

Heintz, N. BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(12): 861-870

Hellings N., Baree M., Verhoeven C., D'hooghe M.B., Medaer R., Bernard C.C., Raus J., Stinissen P. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res* 2001; 63(3): 290-302

Hill AV. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(1): 21-32 2006

Hisaeda H., Maekawa Y., Iwakawa D., Okada H., Himeno K., Kishihara K., Tsukumo S., Yasutomo K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Med* 2004; 10: 29-30

Hoffman S. L., Isenbarger D., Long G.W., Sedegah M., Szarfman A., Waters L., Hollingdale

M.R., van der Meide P.H., Finbloom D.S., Ballou W.R. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. *Science* 1989; 244: 1078-1081

Hoffman S. L., Isenbarger D., Long G.W., Sedegah M., Szarfman A., Mellouk S., Ballou W.R. T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes. *Bulletin WHO* 1990; 68 (Suppl.): 132-137

Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003, 299: 1057-1061

Hurwitz A.A., Sullivan T.J., Sobel R.A., Allison J.P. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) limits the expansion of encephalitogenic T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-resistant BALB/c mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(5): 3013-1317

Ise W., Kohyama M., Nutsch K.M., Lee H.M., Suri A., Unanue E.R., Murphy T.L., Murphy K.M. CTLA-4 suppresses the pathogenicity of self antigenspecific T cells by cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Nature Immunology* 2010; 11: 129–135

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

Janse C., Waters A. The *Plasmodium berghei* research model of malaria. Leiden University Medical Center, 2006

Jetten T.H. Anophelism without Malaria in Europe: a review of the ecology and distribution of the genus Anopheles in Europe. Den Haag: Wageningen Agricultural University Papers, 1994

Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuetttenberg A., Knop J., Enk A.H. Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193(11): 1285-1294

Kanoi B.N., Egwang T.G. New concepts in vaccine development in malaria. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20(3): 311-6

Karandikar N.J., Vanderlugt C.L., Walunas T.L., Miller S.D., Bluestone J.A. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 1996; 184(2): 783-788

Karimova G., Fayolle C., Gmira S., Ullmann A., Leclerc C., Ladant D. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12532-12537

Katz D.H. The allogeneic effect on immune responses: model for regulatory influences of T lymphocytes on the immune system. *Transplant Rev* 1972; 12: 141-179

Keating S.M., Bejon P., Berthoud T., Vuola J.M., Todryk S., Webster D.P., *et al.* Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime „Boost“ immunization and correlate with protection against malaria. *J Immunol* 2005;175: 5675-5680

Kester K.E., Cummings J.F., Ockenhouse C.F., Nielsen R., Hall B.T., Gordon D.M., Schwenk R.J., Krzych U., Holland C.A., Richmond G., Dowler M.G., Williams J., Wirtz R.A., Tornieporth N., Vigneron L., Delchambre M., Demoitie M.A., Ballou W.R., Cohen J., Heppner D.G. Jr. Phase 2a trial of 0, 1, and 3 month and 0, 7, and 28 day immunization schedules of malaria vaccine RTS,S/AS02 in malaria-naive adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 2008; 26: 2191–2202

Kilshaw P.J., Brent L., Pinto M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *Nature* 1975; 255(5508): 489-491

Kinter A.L., Hennessey M., Bell A., Kern S., Lin Y., Daucher M., Planta M., McGlaughlin M., Jackson R., Ziegler S.F. and Fauci A.S. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from the peripheral blood

of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 2004; 200: 331-343

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

Kobayashi F., Morii T., Matsui T., Fujino T., Watanabe Y., Weidanz W.P., Tsuji M. Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and non-lethal variants of *Plasmodium yoelii*. *Parasitology Research* 1996; 82: 385-391

Kohm A.P., McMahon J.S., Podojil J.R., Begolka W.S., DeGutes M., Kasprovicz D.J., Ziegler S.F., Miller S.D. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol* 2006; 176(6): 3301-3305

Kojima A., Prehn R.T. Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. *Immunogenetics* 1981; 14: 15-27

Korten S., Anderson R.J., Hannan C.M., Sheu E.G., Sinden R., Gadola S., *et al.* Invariant V alpha 14 chain NKT cells promote *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein-specific gamma interferon- and tumor necrosis factor alpha-producing CD8<sup>+</sup>T cells in the liver after poxvirus vaccination of mice. *Infect Immun* 2005; 73: 849-858

Kremsner P.G., Zotter G .M., Feldmeier, Graninger W., Rocha R. M., Jassen- Rosseck R., Bienzle U. Immune response in patients during and after *P. falciparum* infection. *J Infect Dis* 1990; 161: 1025-1028

Krummel M.F., Allison J.P. CD28 and CTLA4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995; 182(2): 459-65

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

Kumar S., Epstein J., Richie T.L., Mkrumah F.K., Soisson L., Carucci D.J., Hoffman S.L. A multilateral effort to develop DNA vaccines against *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology* 2002; 18 (3): 129-34

Kursar M., Koch M., Mittrücker H.W., Nouailles G., Bonhagen K., Kamradt T., Kaufmann S.H. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2007; 178 (5): 2661-2665

Ladant D., Ullmann A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* 1999; 7: 172-176

Lahl K., Loddenkemper C., Drouin C., Freyer J., Arnason J., Eberl G., Hamann A., Wagner H., Huehn J., Sparwasser T. Selective depletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *JEM* 2007; 204 (1): 57-63

Lahl K., Control of immune responses toward self and non-self by Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Technische Universität München, 2008

Lanar D.E., Tine J.A., de Taisne C., Seguin M.C., Cox W.I., Winslow J.P., Ware L.A., Kauffman E.B., Gordon D., Ballou W.R., Paoletti E., Sadoff J.C. Attenuated vaccinia virus-circumsporozoite protein recombinants confer protection against rodent malaria. *Infect Immun* 1996; 64(5): 1666-1671

Lang W., Löscher T. Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 3. Auflage, Stuttgart, New York, 2000

Langhorne J. The Role of CD4<sup>+</sup> T-Cells in the immune-response to *Plasmodium chabaudi*. *Parasitology Today* 1989; 5: 362-364

Langhorne J., Gillard S., Simon B., Slade S., Eichmann K. Frequencies of CD4<sup>+</sup> T-cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with TH1 and TH2 characteristics during infection. *Int Immunol* 1989; 1: 416-424

Langhorne J., Simon B. Limiting dilution analysis of the T-cell response to *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice. *Parasite Immunology* 1989; 11: 545-559

Langhorne J., Quin S.J., Sanni L.A. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol* 2002; 80: 204-228

Lanzavecchia A., Sallusto F. Lead and follow: the dance of the dendritic cell and T cell. *Nat Immunol* 2004; 5(12): 1201-1202

Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl* 1993; 4: 275–287

Leach M.W., Bean A.G., Mauze S., Coffman R.L., Powrie F. Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RB<sup>high</sup> subset of CD4<sup>+</sup> T cells. *Am J Pathol* 1996; 148(5): 1503-15

Le Ker H. Mensch gegen Moskito. *Spiegel Online* 2009

Lepenius B. Funktion der Koinhibitoren CTLA4 und BTLA bei der T-Zellregulation im Verlauf der Blutphase der experimentellen Malaria. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Universität Hamburg, 2007

Li C., Seixas E., Langhorne J. Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Medical Microbiology and Immunology* 2001; 189: 115-126

Li C., Sanni L., Omer F., Riley E., Langhorne J. Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by TNF $\alpha$  and exacerbated by TGF antibodies. *Infection and Immunity* 2003; 71(9): 4850-4856

Li J., Li X., Tan M., Lin B., Hou S., Qian W., Li B., Zhang D., Zhou B., Wang H., Zhu T., Guo Y. Two doses of humanized anti-CD25 antibody in renal transplantation: a preliminary comparative study. *MAbs* 2009; 1(1): 49-55

Li S., Floess S., Hamann A., Gaudieri S., Lucas A., Hellard M., Roberts S., Paukovic G., Plebanski M., Loveland B.E., Aitken C., Barry S., Schofield L., Gowans E.J. Analysis of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells that display apparent viral antigen specificity during chronic hepatitis C virus infection. *PLoS Pathog* 2009; 5(12)

Limmer A., Ohl J., Kurts C., Ljunggren H.G., Reiss Y., Groettrup M., Momburg F., Arnold B., Knolle P.A. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8<sup>+</sup> T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000; 6: 1348-1354

Ling K.L., Pratap S.E., Bates G.J. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immun* 2007; 7: 7

Liu X., Newton R.C., Friedman S.M., Scherle P.A. Indoleamine 2,3-dioxygenase, an emerging target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9(8): 938-52

Long E., Wood K.J. Regulatory T cells in transplantation: transferring mouse studies to the clinic. *Transplantation* 2009; 88(9): 1050-6

Lucius R., Loos-Frank B. Biologie von Parasiten. 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008

Mahnke K., Schonfeld K., Fondel S., Ring S., Karakhanova S., Wiedemeyer K., Bedke T., Johnson S.T., Storn V., Schallenberg S., Enk A.H. Depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> human regulatory T

cells in vivo: Kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 2007; 120(12): 2723-2733

Mailankot M., Stanieszewska M., Butler H., Caprara M., Howell S. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase overexpression causes kynurenine-modification of proteins, febrile cell apoptosis and cataract formation in the mouse lens. *Laboratory Investigation* 2009; 89: 498-512

Marson A., Kretschmer K., Frampton G.M., Jacobsen E.S., Polansky J.K., Maclsaac K.D., Levine S.S., Fraenkel E., von Boehmer H., Young R.A. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 2007; 445(7130): 931-5

Martens, P. Endemische Malaria in Deutschland. Maastricht University 2007. [www.medizin.de](http://www.medizin.de)

Martin R., Jaraquemada D., Flerlage M., Richert J., Whitaker J., Long E.O., McFarlin D.E., McFarland H.F. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol.* 1990; 145(2): 540-548

Marty, A. Patología de enfermedades parasitarias. Teorías y aspectos generales. Departamento de Parasitología, Universidad de Valencia, 2002: 11-13

Mason D., Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(6): 649-655

Mass-Coma S. Especies de *Plasmodium* humano. Departamento de Parasitología, Universidad de Valencia, 2002: 1-4

May J., Lell B., Luty A.J.F., Meyer C.G., Kremsner P.G. Plasma interleukin-10: Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis* 2000; 182: 1570-1573

Meyer C. Tropenmedizin Infektionskrankheiten. Zweite Auflage. Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, ecomed Medizin 2007. ISBN 978-3-609-16334-5

Miller L.H., Smith J.D. Motherhood and malaria. *Nature Medicine* 1998; 4 (11): 1244-1245

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

Mittrücker H.W., Kaufmann S.H. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol* 2004; 34(2): 306-312

Miura Y., Thoburn C.J., Bright E.C., Chen W., Nakao S., Hess A.D. Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood* 2002; 100 (7): 2650-2658

Mohan K., Moulin P., Stevenson M.M. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J Immunol* 1997; 159: 4990-4998

Morgan M.E., van Bilsen J.H., Bakker A.M., Heemskerk B., Schilham M.W., Hartgers F.C., Elferink B.G., van der Zanden L., de Vries R.R., Huizinga T.W., Ottenhoff T.H., Toes R.E. Expression of Foxp3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005; 66: 13-20

Morrissey I., Smith J.T. Activity of 4-quinolones against *Pseudomonas aeruginosa*. *Arzneimittelforschung* 1994; 44(10): 1157-61

Mueller A.K., Labaied M., Kappe S.H., Matuschewski K. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* 2005; 433: 164-167

Mueller A.K., Deckert M., Heiss K., Goetz K., Matuschewski K., Schlüter D. Genetically Attenuated *Plasmodium berghei* Liver Stages Persist and Elicit Sterile Protection Primarily via CD8 T cells. *Am J Pathol* 2007; 171 (1): 107–115

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

Nakamura K., Kitani A., Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194 (5): 629-644

Nayar A. Malaria vaccine enters phase III clinical trials. *Nature News* 2009

Nebe-von-Caron G., Stephens P.J., Hewitt C.J., Powell J.R., Badley R.A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods* 2000; 42: 97-114

Nussenzweig R.S., Vanderberg J., Most H., Orton C. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 1967; 216: 160-162

Nussenzweig R.S., Vanderberg J., Most H., Orton C. Immunity in simian malaria induced by irradiated sporozoites. *J Parasitol* 1970; 56: 252-257

Obaldia N. 3rd, Kotecka B.M., Edstein M.D., Haynes R.K., Fugmann B., Kyle D.E., Rieckmann K.H. Evaluation of artemisone combinations in *Aotus* monkeys infected with *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8): 3592-4

Ocaña-Morgner C., Wong K.A., Lega F., Dotor J., Borrás-Cuesta F., Rodríguez A. Role of TGF-beta and PGE2 in T cell responses during *Plasmodium yoelii* infection. *Eur J Immunol* 2007;

37(6): 1562-74

O'Connor M., Peifer M., Bender W. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* 1989; 244(4910): 1307-12

O'Garra A., Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004; 10: 801-805

Omer F.M., Riley E.M. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J Exp Med* 1998; 188: 39-48

Omer F.M., De Souza J.B., Riley, E.M. Differential induction of TGF $\beta$  regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and non-lethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol* 2003; 171: 5430-5436

Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T and Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999; 59: 3128-3133

Ormandy L.A., Hillemann T., Wedemeyer H., Manns M.P., Greten T.F., Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 2457-2464

Osicka R., Osicková A., Basar T., Guermonprez P., Rojas M., Leclerc C., Sebo P. Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun* 2000; 68(1): 247-56

Overstreet M.G., Cockburn I.A., Chen Y.C., Zavala F. Protective CD8 T cells against *Plasmodium* liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response. *Immunol Rev*. 2008; 225: 272-83

Pain A., Böhme U., Berry A.E., Mungall K., Finn R.D., Jackson A.P., Mourier T., Mistry J., Pasini E.M., Aslett M.A., Balasubrammaniam S., Borgwardt K., Brooks K., Carret C., Carver T.J., Cherevach I., Chillingworth T., Clark T.G., Galinski M.R., Hall N., Harper D., Harris D., Hauser H., Ivens A., Janssen C.S., Keane T., Larke N., Lapp S., Marti M., Moule S., Meyer I.M., Ormond D., Peters N., Sanders M., Sanders S., Sargeant T.J., Simmonds M., Smith F., Squares R., Thurston S., Tivey A.R., Walker D., White B., Zuiderwijk E., Churcher C., Quail M.A., Cowman A.F., Turner C.M., Rajandream M.A., Kocken C.H., Thomas A.W., Newbold C.I., Barrell B.G., Berriman M. The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* 2008; 455 (9): 799-803

Pasternak N.D., Dzikowski R. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(7): 1463-1466

Paterson A.M., Sharpe A.H. Taming tissue-specific T cells: CTLA-4 reins in self-reactive T cells. *Nature Immunology* 2010; 11: 109-11

Paul W.E. Fundamental Immunology. Sixth Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2008

Pelfrey C.M., Tranquill L.R., Vogt A.B., McFarland H.F. T cell response to two immunodominant proteolipid protein (PLP) peptides in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Mult Scler* 1996; 1 (5): 270-278

Peters N., Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 213: 159-79

Petersen R.P., Campa M.J., Sperlazza J. Tumor infiltrating Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 2006; 107(12): 2866-2872

Prasad S.J., Farrand K.J., Matthews S.A., Chang J.H., McHugh R.S., Ronchese F. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol* 2005; 174: 90-98

Rabinovich G., Toscano M. Turning „sweet“ on immunity: galectin-glycan interaction in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2009; 9: 338-352

Rao P.E., Petrone A.L., Ponath P.D. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- $\beta$ . *J Immunol* 2005; 174(3): 1446-55

Rech A.J., Vonderheide R.H., Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1174: 99-106

Renggli J., Hahne M., Matile H., Betschart B., Tschopp J., Corradin G. Elimination of *P. berghei* liver stages is independent of Fas (CD95/Apo-1) or perforin-mediated cytotoxicity. *Parasite Immunology* 1997; 19: 145-148

Reyes-Sandoval A., Sridhar S., Berthoud T., Moore A.C., Harty J.T., Gilbert S.C., *et al.* Single-dose immunogenicity and protective efficacy of simian adenoviral vectors against *Plasmodium berghei*. *Eur J Immunol* 2008; 38: 732-741

Richards J.S., Beeson J.G. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol* 2009; 87(5): 377-390

Richie T.L., Saul A. Progress and challenge for malaria vaccines. *Nature* 2002; 415: 694-701

Riley E.M., Jakobsen P.H., Allen S.J., Wheeler J.G., Bennet S., Jepsen S., Greenwood B.M. Immune response to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* may contribute to both pathogenesis and protection in clinical malaria: evidence from a longitudinal, prospective study of semi-immune African children. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1019-1025

Riley E. M., Wahl S., Perkins D. J., Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite immunology* 2006; 28: 35-49

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

Rodrigues E.G., Zavala F., Eichinger D., Wilson J.M., Tsuji M. Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8<sup>+</sup> T cell-mediated protective immunity against malaria. *J Immunol* 1997; 158(3): 1268-1274

Romero P., Maryanski J.L., Corradin G., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V., Zavala F. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 1989; 341: 323-326

Roncarolo M.G., Gregori S., Battaglia M., Bacchetta R., Fleischhauer K., Levings M.K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans *Immunol Rev.* 2006; 212: 28-50

Rose T., Sebo P., Bellalou J., Ladant D. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J. Biol. Chem* 1995; 270: 26370-26376

Rubtsov Y.P., Rasmussen J.P., Chi E.Y., Fontenot J., Castelli L., Ye X., Treuting P., Siewe L., Roers A., Henderson W.R. Jr., Muller W., Rudensky A.Y. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008. 28(4): 546-558

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839): 487-491

Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance

maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155 (3): 1151-1164

Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101(5): 455-458

Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6(4): 345-352

Sakaguchi S., Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009; 21(10): 1105-11

Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001

Sanni L.A., Jarra W., Li C., Langhorne J. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun* 2004; 72(5): 3054-3058

Sansom D.M., Walker L.S. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) in regulatory T-cell biology. *Immunol Rev* 2006; 212: 131-148

Schilbach K.E., Geiselhart A., Wessels J.T., Niethammer D., Handgretinger R. Human gammadelta T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J Immunother* 2000; 23(5): 536-548

Schlecht G., Loucka J., Najjar H., Sebo P., Leclerc C. Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J Immunol* 2004; 173: 6089-6097

Schofield L., Villaquiran J., Ferreira A., Schellekens H., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V.  $\gamma$

interferon CD8<sup>+</sup> T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 1987; 330: 664-666

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

Schubert L.A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F., Ziegler S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001; 276(40): 37672-9

Schwartz R.H. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat. Immunol* 2005, 6: 327-330

Sedegah M., Hedstrom R., Hobart P., Hoffman S.L. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 9866

Sharma S., Yang S.C., Zhu L., Reckamp K., Gardner B., Baratelli F., Huang M., Batra R.K., Dubinett S.M. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65(12): 5211-20

Shear H.L., Srinivasan R., Nolan T. Role of IFN $\gamma$  in lethal and non-lethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *Journal of Immunology* 1989; 143: 2038-2044

Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M.. Control of T-cell activation by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 58-67

Shevach E.M., DiPaolo R.A., Andersson J., Zhao D.M., Stephens G.L., Thornton A.M. The lifestyle of naturally occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212:60-73

Shimizu J., Yamazaki S., Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999; 163:

5211-5218

Shizuya H., Birren B., Kim U.J., Mancino V., Slepak T., Tachiiri Y., Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(18): 8794-7

Simova J., Bubenik J., Bieblova J., Rosalia R.A., Fric J., Reinis M. Depletion of Treg cells inhibits minimal residual disease after surgery of HPV16-associated tumours. *Int J Oncol* 2006; 29 (6): 1567-1571

Singh R.P., Kashiwamura S., Rao P., Okamura H., Mukherjee A., Chauhan V.S. The role of IL-18 in blood-stage immunity against murine malaria *Plasmodium yoelii* 265 and *Plasmodium berghei* ANKA. *J Immunol* 2002; 168(9): 4674-4681

Sitkovsky M.V. T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol* 2009; 30(3): 102-108

Smith C.M., Wilson N.S., Waithman J., Villadangos J.A., Carbone F.R., Heath W.R., Belz G.T. Cognate CD4<sup>+</sup> T cell licensing of dendritic cells in CD8<sup>+</sup> T cell immunity. *Nat Immunol* 2004; 5(11): 1143-1148

Sparwasser T. General method for the modification of different BAC types and the rapid generation of BAC transgenic mice. *Genesis* 2004; 38(1): 39-50

Sparwasser T., Eberl G. BAC to immunology: bacterial artificial chromosome mediated transgenesis for targeting of immune cells. *Immunology* 2007; 121(3): 308-313

Steeg C., Adler G., Sparwasser T., Fleischer B., Jacobs T. Limited role of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the control of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2009; 183(11): 7014-22

Stevenson M.M., Tam M.F. Differential Induction of Helper T-Cell Subsets During Blood-

Stage *Plasmodium chabaudi* As Infection in Resistant and Susceptible Mice. *Clinical and Experimental Immunology* 1993; 92: 77-83

Stevenson M.M., Riley E.M. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(3): 169-80

Stryer, L. Lehrbuch der Biochemie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, 1990

Su Z., Stevenson M.M. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *Journal of Immunology* 2002; 168: 1348-1355

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

Tang A.L., Teijaro J.R., Njau M.N., Chandran S.S., Azimzadeh A., Nadler S.G., Rothstein D.M., Farber D.L. CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cell homeostasis. *J Immunol* 2008; 181(3): 1806-1813

Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., Sakaguchi N., Itoh M., Iwata M., Shimizu J., Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10(12): 1969-1980

Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192(2): 303-310

Tartz S. Experimentelle Immunisierungen gegen das Leberstadium der *Plasmodium berghei* Malaria-Infektion. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Hamburg, 2006

Tartz S., Kamanova J., Simsova M., Sebo P., Bolte S., Heussler V., Fleischer B., Jacobs T. 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* 2007; 74(4): 2277–2285

Tartz S., Rüssmann H., Kamanova J., Sebo P., Sturm A., Heussler V., Fleischer B., Jacobs T. Complete protection against *P. berghei* malaria upon heterologous prime/“Boost” immunization against circumsporozoite protein employing *Salmonella* type III secretion system and *Bordetella* adenylate cyclase toxoid. *Vaccine* 2008; 26: 5935-5943

Ten Hove T., The Olle F., Berkhout M., Bruggeman J.P., Vyth-Dreese F.A., Slors J.F., Van Deventer S.J., Te Velde A.A. Expression of CD45RB functionally distinguishes intestinal T lymphocytes in inflammatory bowel disease. *J Leukoc Biol* 2004; 75(6): 1010-5

Ting L., Gissot M., Coppi A., Sinnis P., Kim K. Attenuated *Plasmodium yoelii* lacking purine nucleoside phosphorylase confer protective immunity. *Nature Medicine* 2008; 14(9): 954-958

Thornton, A.M, Shevach E.M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 188(2): 287-296

Thornton A.M., Shevach E.M. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; 164(1): 183-190

Todryk S.M., Bejon P., Mwangi T., Plebanski M., Urban B., Marsh K., *et al.* Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4 CD25 high T cells with susceptibility in Kenyans. *PLoS ONE* 2008; 3: e2027

Toka F.N., Suvas S., Rouse B.T. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells regulate vaccine-generated primary and memory CD8<sup>+</sup> T-cell responses against herpes simplex virus type 1. *J Virol* 2004; 78(23):

13082-13089

Tran T.T., Uhl M., Ma J.Y., Janssen L., Sriram V., Aulwurm S., Kerr I., Lam A., Webb H.K., Kapoun A.M., Kizer D.E., McEnroe G., Hart B., Axon J., Murphy A., Chakravarty S., Dugar S., Protter A.A., Higgins L.S., Wick W., Weller M., Wong D.H. Inhibiting TGF-beta signaling restores immune surveillance in the SMA-560 glioma model. *Neuro Oncol* 2007; 9(3): 259-70

Tsuji M., Bergmann C.C., Takita-Sonoda Y., Murata K., Rodrigues E.G., Nussenzweig R.S., Zavala F. Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. *J. Virol* 1998; 72: 6907

Uhlig H.H., Coombes J., Mottet C., Izcue A., Thompson C., Fanger A., Tannapfel A., Fontenot J.D., Ramsdell F., Powrie F. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006; 177(9): 5852-60

Unitt E., Rushbrook S.M., Marshall A., Davies S., Gibbs P., Morris L.S., Coleman N., Alexander G.J. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T regulatory cells. *Hepatology* 2005; 41: 722-730

Urban B.C., Mwangi T., Ross A., Kinyanjui S., Mosobo M., Kai O., Lowe B., Marsh K., Roberts D.J. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood* 2001; 98(9): 2859-2861

Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., Hafler D.A. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199: 971-979

Vignali D., Collison L., Workman C. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8: 523- 532

Vincent M.S., Roessner K., Lynch D., Wilson D., Cooper S.M., Tschopp J., Sigal L.H., Budd R.C.

Apoptosis of Fashigh CD4<sup>+</sup> synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand (high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J Exp Med* 1996; 184(6): 2109-2117

Vollmar A., Dingermann T. Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe. 2005; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Deutschland

von der Weid T., Langhorne J. The roles of cytokines produced in the immune response to the erythrocytic stages of mouse malaras. *Immunobiology* 1993; 189: 397-418

von der Weid T., Honarvar N., Langhorne J. Gene-targeted mice lacking B-cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *Journal of Immunology* 1996; 156: 2510-2516

Waldmann H., Graca L., Cobbold S., Adams E., Tone M., Tone Y. Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin Immunol* 2004; 16: 119-126

Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. CTLA4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1(5): 405-413

Walther M., Jeffries D., Finney O., Njie M., Ebonyi A., Deininger S., Lawrence E., Ngwa-Amambua A., Jayasooriya S., Cheeseman I., Gomez-Escobar N., Okebe J., Conway D.J., Riley E.M. Distinct roles for Foxp3<sup>+</sup> and Foxp3<sup>-</sup> CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* 2009; 5(4): e1000364

Wang H.Y., Lee D.A., Peng G., Guo Z., Li Y., Kiniwa Y., Shevach E.M., Wang R.F. Tumor-specific human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 2004; 20: 107-118

Warhurst D.C. Polymorphism in the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter protein links verapamil enhancement of cloroquine sensitivity whit the clinical efficacy of amodiaquine. *Malarial Journal* 2003; 2 (1): 31

Weiner H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207-14

Weiss L., Donkova-Petrini V., Caccavelli L., Balbo M., Carbonneil C., Levy Y. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. *Blood* 2004, 104: 3249-3256

Wherry E.J., Teichgräber V., Becker T.C., Masopust D., Kaech S.M., Antia R., von Andrian U.H., Ahmed R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 2003; 4(3): 225-234

Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., Buist N., Levy-Lahad E., Mazzella M., Goulet O., Perroni L., Bricarelli F.D., Byrne G., McEuen M., Proll S., Appleby M., Brunkow M.E. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001; 27(1): 18-20

Wood K.J., Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210

World Health Organisation, World Malaria Report, 2006

World Health Organisation, World Malaria Report, 2008

Workman C.J., Wang Y., El Kasmi K.C., Pardoll D.M., Murray P.J., Drake C.G., Vignali D.A. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol* 2009; 182(4): 1885-91

Wu Y., Wang Q., Zheng L., Feng H., Liu J., Ma S., Cao Y. *Plasmodium yoelii*: distinct CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. *Experimental Parasitology* 2007; 115(3): 301-304

Yaqub S, Taskén K. Role for the cAMP-protein kinase A signaling pathway in suppression of

antitumor immune responses by regulatory T cells. *Crit Rev Oncog* 2008; 14(1): 57-77

Yoshida S., Kondoh D., Arai E., Matsuoka H., Seki C., Tanaka T., Okada M., Ishii A. Baculovirus displaying *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein protected mice against malaria sporozoite infection. *Virology* 2003; 316 (1): 161-70

Zavala F., Tam J.P., Barr P.J., Romero P., Ley V., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V. Synthetic peptide vaccine confers protection against murine malaria. *J Exp Med* 1987; 166: 1591-6

Zenclussen M.L., Thuere C., Ahmad N., Wafula P.O., Fest S., Teles A., Leber A., Casalis P.A., Bechmann I., Priller J., Volk H.D., Zenclussen A.C. The Persistence of Paternal Antigens in the Maternal Body is Involved in Regulatory T-Cell Expansion and Fetal-Maternal Tolerance in Murine Pregnancy. *Am J Reprod Immuno* 2010

Zheng Y., Josefowicz S.Z., Kas A., Chu T.T., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 2007; 445(7130): 936-40

Ziegler S. F. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:209-26

Zozulya A., Wiendl H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nature Clinical Practice Neurology* 2008; 4 (79): 384-398