

**Regulation der Immunantwort gegen *Plasmodium yoelii* (Landau, Michel & Adam, 1968) durch den Immunzelloberflächenrezeptor BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator, CD252) in der Maus (*Mus musculus*, Linnaeus 1758)**

**Dissertation**

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Guido Adler**

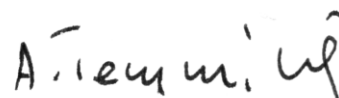
aus Hamburg

Hamburg, 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Prof. Dr. B. FLEISCHER  
Weiterere Gutachterin der Dissertation:  
Frau Priv.-Doz. Dr. M. BRELOER

Tag der Disputation: 27. Mai 2011

Hamburg, den 12. Mai 2011



Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Fachbereichs Biologie

Nach mehr als vier Jahren am Bernhard-Nocht-Institut möchte ich den Menschen danken, die diese Zeit zu einem schönen Lebensabschnitt gemacht haben.

Herrn Professor Bernhard Fleischer danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Immunologie und die Begutachtung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Minka Breloer danke ich für wertvolle Anregungen und die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. Thomas Jacobs. Lieber Thomas, ich danke Dir, dass Du mir die Arbeit in Deiner Arbeitsgruppe ermöglicht hast. Ich danke Dir für das spannende Projekt, die großartige Unterstützung, viele erhellende Diskussionen, den Freiraum bei der Arbeit und die vertrauensvolle Atmosphäre, in der ich arbeiten durfte.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und der Abteilung Immunologie danke ich für die schöne Zeit. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Christiane Steeg bedanken. Liebe Christiane, Deine Hilfsbereitschaft und die Geduld, mit der Du mich von Deiner Erfahrung hast profitieren lassen, waren von unschätzbarem Wert.

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Desoxyadenosin
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BSA	Bovine serum albumin
BTLA	B and T Lymphocyte Attenuator
C	Desoxycytidin
CD	Cluster of differentiation
CRD	Cysteine rich domain
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Associated 4
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Desoxyguanosin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Grb	Growth factor receptor bound protein
HSV	Herpes simplex Virus
HVEM	Herpes virus entry mediator
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICOS	Inducible costimulator
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITIM	Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motive
ITSM	Immunoreceptor tyrosine based switch motive
LAT	Linker for activation of T cells
LIGHT	homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression, competes with HSV glycoprotein D for herpes virus entry mediator, a receptor expressed by T lymphocytes
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic activated cell sorting
MBL	Mannosebindendes Lectin
MHC	Major histocompatibility complex
NL	non lethal
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>

---

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Programmed death
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protoniumionen-Konzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PP	Protein phosphatase
<i>PyNL</i>	<i>Plasmodium yoelii</i> 17 non lethal
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standard error of the mean
SHP	Src homology 2 domain containing phosphatase
SMA	Severe malarial anemia
T	Desoxythymidin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF	Transforming growth factor
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
WHO	World Health Organization
ZAP70	ζ-chain-associated protein kinase of 70 kDa

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Malaria .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Malaria: Pathogenese und Immunantwort.....	4
<b>1.2</b>	<b>Regulation der Immunantwort durch Kostimulation .....</b>	<b>9</b>
1.2.1	CD28 – CD80/CD86 .....	10
1.2.2	ICOS – ICOSL.....	11
1.2.3	CTLA-4 – CD80/CD86.....	11
1.2.4	PD-1 – PD-L1/PD-L2.....	13
1.2.5	BTLA/LIGHT/CD160 – HVEM .....	14
	<b>Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>21</b>
2.1.1	Laborgeräte.....	21
2.1.2	Glas- und Kunststoffverbrauchsmittel .....	22
2.1.3	Chemikalien.....	23
2.1.4	Material für molekularbiologische Arbeiten .....	23
2.1.4.1	Oligonucleotid-Primer .....	23
2.1.4.2	Enzyme .....	23
2.1.4.3	Agenzien .....	23
2.1.4.4	Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen.....	24
2.1.5	Material für proteinchemische Arbeiten .....	24
2.1.5.1	Agenzien .....	24
2.1.5.2	Puffer und verwendete Stammlösungen.....	25
2.1.6	Material für zellbiologische Arbeiten .....	26
2.1.6.1	Agenzien .....	26
2.1.6.2	Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen.....	27
2.1.7	Antikörper .....	28
2.1.8	Malariastämme .....	29
2.1.9	Mausstämme .....	29
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	30
2.2.1.1	Aufreinigung genomischer DNA aus Gewebeproben .....	30
2.2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	30
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.2	Proteinchemische Methoden.....	33
2.2.2.1	Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberstand .....	33
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	33
2.2.2.3	LPS-Konzentrationsbestimmung .....	34
2.2.2.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
2.2.2.5	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen .....	35
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	35
2.2.3.1	Kultur eukaryotischer Hybridomzelllinien zur Antikörperproduktion .....	35
2.2.3.2	Cryokonservierung eukaryotischer Zellen .....	36
2.2.3.3	Präparation muriner Milzzellen .....	36
2.2.3.4	Zellzählung.....	36
2.2.3.5	Durchflusszytometrische Analyse.....	37
2.2.3.6	Messung von Zytokinkonzentrationen durch Cytometric Bead Array (CBA).....	38

---

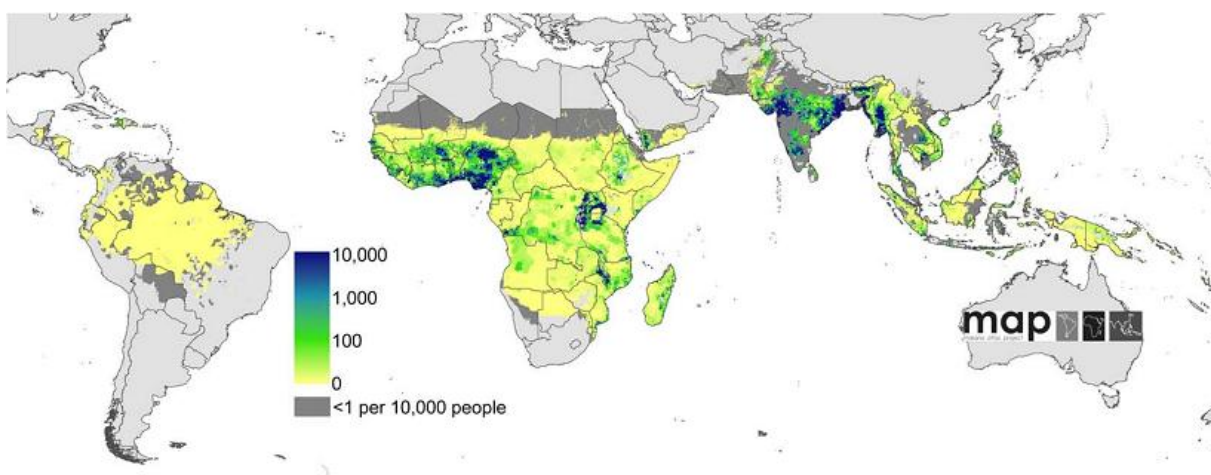
2.2.3.7	Magnetische Aufreinigung parasitierter Erythrozyten .....	38
2.2.3.8	Quantifizierung der Antikörperbindung an parasitierte Erythrozyten .....	38
2.2.4	Tierversuche .....	39
2.2.4.1	Herstellung knochenmarkchimärer Mäuse .....	39
2.2.4.2	Infektion von Mäusen mit unterschiedlichen Plasmodium-Stämmen .....	39
2.2.4.3	Depletion von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und Zytokinen durch Antikörper .....	39
2.2.4.4	Konzentrationsbestimmung von Lebertransaminasen im Blut .....	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
3.1	Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen <i>P. berghei</i> ANKA .....	41
3.2	Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen <i>P. berghei</i> NK65 .....	42
3.3	Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen <i>P. yoelii</i> NL .....	44
3.3.1	BTLA-Defizienz bewirkt Überexpression des Liganden HVEM in T-Zellen. ....	45
3.3.2	Interaktion von HVEM mit anderen Liganden beeinflussen ebenfalls die Immunantwort gegen <i>P. yoelii</i> NL .....	47
3.3.3	Expression von BTLA und HVEM während der <i>P. yoelii</i> NL-Infektion .....	48
3.3.4	Einfluss eines agonistisch wirkenden anti-BTLA-Antikörpers auf die Immunantwort gegen <i>P. yoelii</i> NL .....	49
3.3.5	Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Zytokinantwort während der <i>P. yoelii</i> NL-Infektion .....	51
3.3.6	Beteiligung von IFN- $\gamma$ an der Reduktion der Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen .....	53
3.3.7	Einfluss der BTLA-Defizienz auf die zelluläre Zusammensetzung der Milz während der <i>P. yoelii</i> NL-Infektion .....	55
3.3.8	Einfluss von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen auf die Immunantwort gegen <i>P. yoelii</i> NL .....	58
3.3.9	Einfluss von BTLA, das auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird, auf die Immunantwort gegen <i>P. yoelii</i> NL .....	60
3.3.10	Einfluss von BTLA auf die Effektormechanismen von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen während der <i>P. yoelii</i> NL-Infektion .....	62
3.3.11	Beteiligung von TNF- $\alpha$ an der Reduktion der Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen .....	65
3.3.12	Einfluss von B-Zellen während der <i>P. yoelii</i> NL-Infektion BTLA-defizienter Mäuse .....	66
3.3.13	Einfluss von BTLA auf die Effektormechanismen von B-Zellen während der <i>P. yoelii</i> NL-Infektion ...	67
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
4.1	Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen <i>P. berghei</i> ANKA .....	70
4.2	Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen <i>P. berghei</i> NK65 .....	71
4.3	Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen <i>P. yoelii</i> NL .....	72
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>84</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Malaria

Malaria ist die bedeutendste tropische Infektionserkrankung. Über 40% der Weltbevölkerung sind in den Endemiegebieten in Teilen Afrikas, Asiens und Amerikas dem Risiko einer Malariaerkrankung ausgesetzt. Pro Jahr erkranken über 500 Millionen Menschen an Malaria. Über 800000 Menschen, vor allem Kinder unter fünf Jahren, sterben an der Infektion (WHO 2010). Malaria wird durch einzellige Protisten der Gattung *Plasmodium* verursacht, deren Arten *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. knowlesi* humanpathogen sind. Die einzelnen *Plasmodium*-Arten verursachen unterschiedliche Malariaformen. Die Malaria tropica, verursacht von *P. falciparum*, ist die schwerste Erkrankung und für nahezu alle Todesfälle durch Malaria verantwortlich.

Aufgrund des in den vergangenen Jahren immens gesteigerten Finanzierungsvolumens konnten prophylaktische Maßnahmen wie die Distribution insektizidbehandelter Bettnetze und die Insektizidbehandlung von Wohnräumen zur Vektorkontrolle, aber auch die adäquate Diagnostik und Behandlung der Infektionen stark ausgeweitet werden. Dies hat sowohl zu einer Einengung des Endemiegebiets von *P. falciparum*, als auch zu einem deutlichen Rückgang der Todesfälle geführt (WHO 2008; WHO 2009; WHO 2010). Das Fortbestehen dieser Verbesserungen hängt jedoch entscheidend davon ab, dass sich gegen die zur Vektorkontrolle eingesetzten Pyrethroide sowie die zur Therapie eingesetzten Medikamente



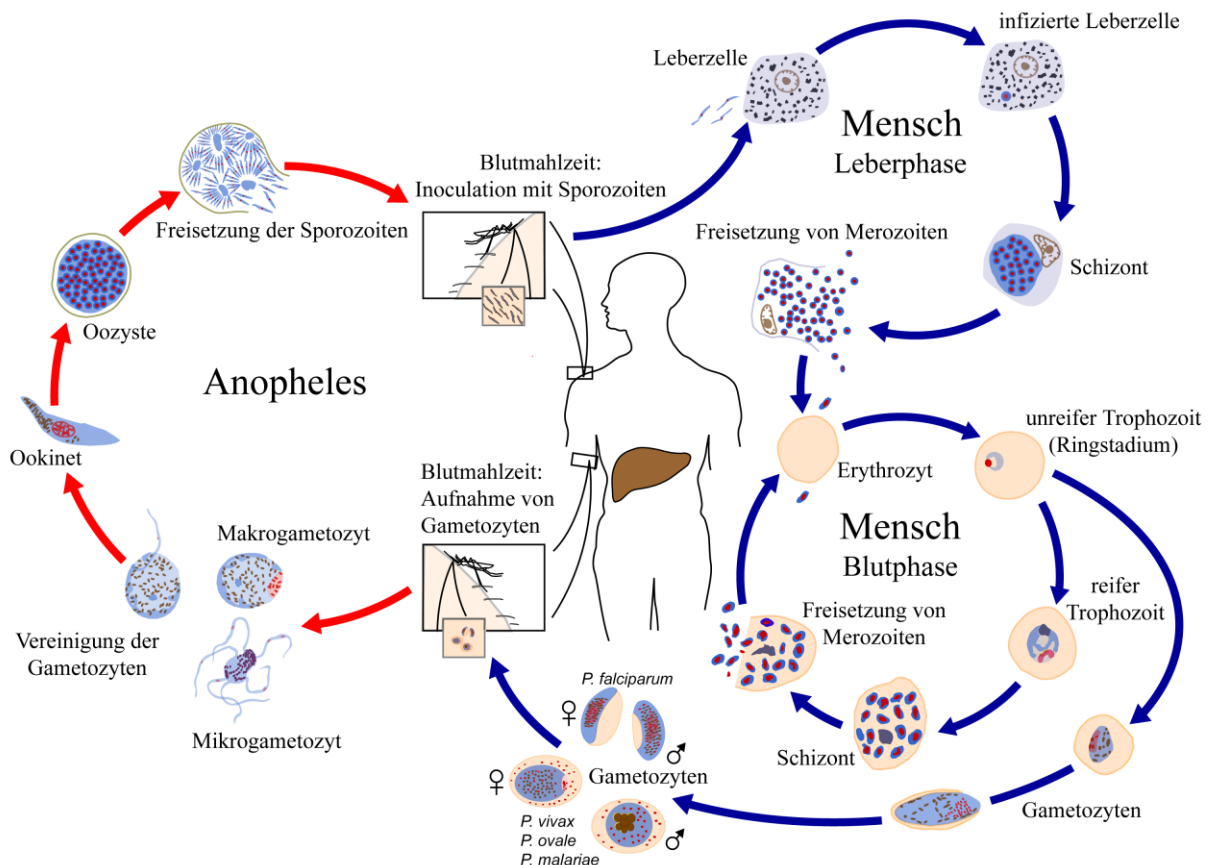
**Abb. 1: Geschätzte Verteilung der klinischen Fälle von *P. falciparum*-Infektionen im Jahr 2007**

(Hay, Okiro et al. 2010)



keine Resistenzen entwickeln. In diesem Zusammenhang ist die kürzlich berichtete Entwicklung von Resistenzen des Erregers gegen Artemisinin und seine Derivate, welche bislang als einzige Wirkstoffe zuverlässig bei der Behandlung auch vielfach medikamentenresistenter *P. falciparum* Infektionen eingesetzt werden, besonders besorgniserregend (WHO 2007; Dondorp, Nosten et al. 2009).

Wie schon aus dem Verhältnis von jährlichen Erkrankungs- und Todesfällen deutlich wird, verläuft ein Großteil der Infektionen verhältnismäßig unkompliziert. Dies basiert auf der Entwicklung einer Semiimmunität, die sich bei Individuen in Endemiegebieten nach etlichen Infektionen entwickelt und zu einem leichteren Krankheitsverlauf führt. Diese partielle Immunität basiert auf der Generierung eines Antikörperarsenals gegen die Epitope des Parasiten. Da diese durch ständige nichthomologe Rekombination der codierenden Gene hochgradig polymorph sind (Bull und Marsh 2002) entwickelt sich ein ausreichender Schutz erst nach Kontakt mit einer Vielzahl dieser Antigene im Verlauf einiger Infektionen mit unterschiedlichen Plasmodienvarianten.



**Abb. 2: Lebenszyklus des Malariaerregers**

Übersetzt nach (Silva 2002)

Die Übertragung kann durch weibliche Stechmücken 40 verschiedener Arten der Gattung *Anopheles* erfolgen. Sie stellen den Endwirt des Erregers dar, in dem seine sexuelle Vermehrung (Sporogonie) stattfindet. Bei einer Blutmahlzeit werden Sporozoiten aus den Speicheldrüsen des Insekts in die menschliche Haut inokuliert (Abb. 2). Im Menschen, der dem Erreger als Zwischenwirt dient, findet die asexuelle Vermehrung (Schizogonie) des Parasiten in zwei Phasen statt. Die Sporozoiten gelangen zuerst über den Blutstrom in die Leber. Dort infizieren sie Hepatozyten, in denen sie sich zu Schizonten entwickeln. Plasmodien der Arten *P. ovale* und *P. vivax* können dabei Hypnozoiten ausbilden. Diese Dauerformen des Parasiten können noch nach Jahren Rezidive der Erkrankung verursachen. Durch vielfache Mitosen und Vereinzelung der entstehenden Zellkerne durch Einstülpung der Schizontenmembran entstehen aus einem Schizonten bis zu 30000 Merozoiten.

Diese werden in Vesikeln aus dem Leberparenchym in den Blutkreislauf geschleust (Sturm, Amino et al. 2006) und infizieren dort unter Ausbildung von parasitophoren Vakuolen Erythrozyten. In diesen differenzieren sie erneut über ein mehrkerniges Schizontenstadium zu 8 – 32 Merozoiten, die nach Ruptur der Wirtszelle weitere Erythrozyten infizieren können. Die Ruptur der infizierten Erythrozyten verläuft im Gegensatz zu Infektionen mit *P. falciparum* bei Infektionen mit *P. ovale*, *P. vivax* und *P. malariae* synchron alle 48 – 72 h, was zu periodisch auftretenden Fieberschüben führt. Durch die wiederholten Vermehrungszyklen während der Blutphase kann besonders *P. falciparum* einen hohen Anteil der zirkulierenden Erythrozyten befallen (periphere Parasitämie).

Während der Blutphase entwickelt sich ein kleiner Teil der Merozoiten zu den männlichen Mikro- und weiblichen Makrogametozyten. Werden diese Geschlechtsformen des Erregers bei weiteren Blutmahlzeiten durch Stechmücken aufgenommen, entwickeln sie sich in deren Gastrointestinaltrakt zu Mikro- bzw. Makrogameten. Nach deren Vereinigung zur Zygote entwickelt sich diese zum beweglichen Ookineten, welcher in die Mitteldarmwand des Parasiten eindringt. Hier entstehen durch asexuelle Vermehrung tausende Sporozoiten, die über die Hämolymphe des Insekts auch zu den Speicheldrüsen gelangen. Von hier aus können sie bei der Blutmahlzeit wiederum in einen Zwischenwirt gelangen, was einen erneuten Vermehrungszyklus einleitet.

### 1.1.1 Malaria: Pathogenese und Immunantwort

Bis zum Eintreten in die Blutphase verläuft die Malariainfektion klinisch unauffällig. Alle Symptome der Erkrankung und begleitender Immunpathologie werden durch die Blutphase der Infektion verursacht. Der klinische Verlauf beginnt mit frühen Malariasymptomen wie Fieber, Mattigkeit, Kopfschmerzen und Übelkeit. Diese unspezifischen Symptome lassen sich durch Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems erklären.

Makrophagen, dendritische Zellen sowie B-Zellen besitzen als antigenpräsentierende Zellen Rezeptoren zur Erkennung konservierter pathogenassoziierter molekularer Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs). Es handelt sich hierbei neben calciumabhängigen C-Typ Lectinen wie dem Mannosebindenden Lectin (MBL) vor allem um Toll-like Rezeptoren (TLR). Es sind mittlerweile 13 verschiedene TLR bekannt, welche unterschiedliche Pathogenmuster erkennen. So ist bekannt, dass das *Plasmodium*-Antigen Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Makrophagen über Bindung an TLR 2 aktiviert (Nebl, De Veer et al. 2005). TLR9 bindet das Malariapigment Hämозoin, welches beim Abbau von Hämoglobin durch den Parasiten entsteht (Coban, Ishii et al. 2005). Neuere Erkenntnisse legen allerdings nahe, dass nicht Hämозoin selbst, sondern an das Pigment gebundene Plasmodien-DNA erkannt wird, was dem normalerweise von TLR9 erkannten PAMP erheblich ähnlicher ist (Parroche, Lauw et al. 2007).

Nach Erkennung der Parasiten werden sie von Makrophagen phagozytiert, welche hierdurch weiter aktiviert werden. Dies führt zu vermehrter Phagozytose und Abbau parasitierter Erythrozyten durch die Makrophagen (Fritsche, Larcher et al. 2001) und zu vermehrter Ausschüttung endogener Pyrogene wie TNF- $\alpha$  und IL-1 (Pichyangkul, Saengkrai et al. 1994), die die genannten Malariasymptome bewirken können. Zusätzlich existieren Rückkopplungsmechanismen, die die Aktivierung der Makrophagen durch IFN- $\gamma$  verstärken. So erhöht IFN- $\gamma$  während der Infektion die TLR-Expression auf phagozytischen Zellen, was eine positive Rückkopplung auf ihre Aktivierbarkeit darstellt (Franklin, Parroche et al. 2009). Durch NKT-Zellen, NK-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen wird bereits 18 - 48 h nach einer Malariainfektion IFN- $\gamma$  gebildet (Artavanis-Tsakonas und Riley 2002; Schofield und Grau 2005).

Neben der Phagozytose parasitierter Erythrozyten werden eine Reihe weiterer finaler Effektormechanismen diskutiert, die den Parasiten töten oder am Wachstum hindern

können. Hierbei handelt es sich um lösliche Faktoren wie reaktive Stickstoff- oder Sauerstoffspezies und Komplement. Experimentelle Studien, u.a. unter Verwendung von Mäusen mit Defizienzen für einzelne dieser Effektormechanismen, erbrachten jedoch keine Hinweise darauf, dass diese Effektormechanismen einzeln essenziell für die Immunantwort gegen die Blutphase der Malaria sind (Favre, Ryffel et al. 1999; Taylor, Seixas et al. 2001; Potter, Mitchell et al. 2005). Das Komplementsystem ist hingegen ursächlich an der Entstehung zerebraler Malaria beteiligt (Patel, Berghout et al. 2008).

Über die aktivierten antigenpräsentierenden Zellen erfolgt die Aktivierung von *Plasmodium*-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind essentiell für die Bekämpfung der Parasiten während der Leberphase. Dies folgt unter anderem aus Untersuchungen zur Wirkungsweise experimenteller Malariavakzine im Mausmodell. Der Infektionsschutz erwies sich hierbei als abhängig von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, IFN- $\gamma$  und NO (Stickstoffmonoxid), welches durch IFN- $\gamma$  in Hepatozyten induziert wird und die Beseitigung des Parasiten ermöglicht (Mellouk, Green et al. 1991; Mellouk, Hoffman et al. 1994; Seguin, Klotz et al. 1994; Doolan, Sedegah et al. 1996). Während der Blutphase sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen zumindest im Mausmodell nicht an einer protektiven Immunantwort beteiligt (Vinetz, Kumar et al. 1990; Miyakoda, Kimura et al. 2008). Da sie jedoch entscheidend an der Entstehung zerebraler Malaria beteiligt sind (Yanez, Manning et al. 1996; Hermsen, van de Wiel et al. 1997; Belnoue, Kayibanda et al. 2002), ist ihnen ein eher schädlicher Einfluss während der Blutphase der Infektion zuzuschreiben.

Antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermitteln zwei unterschiedliche antiplasmodiale Abwehrmechanismen: Humorale sowie zelluläre Immunantworten. Aktivierte T-Zellen exprimieren CD40L, den Liganden für CD40, welches sich auf B-Zellen befindet. Nach Erkennung eines *Plasmodium*-Antigens durch eine B-Zelle erhält sie so von T-Zellen ein kostimulatorisches Signal über die CD40-CD40L-Interaktion, die zur vollständigen Aktivierung der B-Zelle führt. Die so aktivierte B-Zelle sekretiert daraufhin die lösliche Form ihres Antigenrezeptors als Immunglobulin, welches direkt gegen die Oberfläche von *Plasmodium* oder gegen Parasitenantigene auf der Oberfläche der parasitierten Erythrozyten gerichtet sein kann. Die humorale Immunantwort wird dabei von T<sub>H</sub>2-polarisierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Sekretion der entsprechenden Zytokine verstärkt und moduliert. Im Verlauf dieser humoralen Immunantwort werden parasitierte Erythrozyten vermehrt opsonisiert und

beseitigt (Stephens, Albano et al. 2005). Auch die Entwicklung von Gedächtnis-B-Zellen, die für die Ausbildung der Semiimmunität unerlässlich sind, wird durch  $T_H2$ -polarisierte  $CD4^+$  T-Zellen ermöglicht.

Aktiviert *Plasmodium*-spezifische  $T_H1$ -Zellen wirken hingegen stark proinflammatorisch. Sie sekretieren große Mengen von  $IFN-\gamma$ , was zu einer positiven Rückkopplung auf die Aktivität und  $TNF-\alpha$ -Sekretion von Makrophagen führt. Dieser Rückkopplungsmechanismus beinhaltet aber auch die Gefahr einer inflammatorischen Kaskade, die ihrerseits den Wirt schädigen kann.

Diese Effektormechanismen sind—abhängig vom Alter, vorherigem Kontakt mit dem Erreger und genetischer Ausstattung des Wirts (Kwiatkowski 2000)—meistens ausreichend um die Infektion zu kontrollieren. Vielfach nimmt die Malariainfektion jedoch einen schwereren Verlauf. Eine häufige und lebensgefährliche Komplikation der Erkrankung ist die schwere malariabedingte Anämie (Severe Malarial Anaemia, SMA). Nur etwa ein Neuntel des zugrundeliegenden Verlusts von Erythrozyten wird dabei durch Infektion und anschließende Lyse der Zellen durch *Plasmodium*-Merozoiten verursacht (Jakeman, Saul et al. 1999). Nicht parasitierte Erythrozyten zeigen eine Reihe von Veränderungen, die sie für den Abbau durch das reticuloendotheliale System markieren. Hierzu gehören Oxidation, Externalisierung von Phosphatidylserin, reduzierte Deformierbarkeit und die unspezifische Adsorption von *Plasmodium*-Antigenen, die zur Opsonisierung und Phagozytose der Erythrozyten führen kann (Ekvall 2003; Evans, Hansen et al. 2006). Der Ort der Beseitigung von parasitierten Erythrozyten aus dem Blut ist neben der Leber vor allem die Milz (Chotivanich, Udomsangpetch et al. 2002; Engwerda, Beattie et al. 2005), wo die Entfernung durch Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose opsonisierter Erythrozyten stattfindet (Ho, White et al. 1990). Zusätzlich findet in der Milz ein Pitting genannter Vorgang statt, bei dem die Parasiten aus den Erythrozyten entfernt werden (Angus, Chotivanich et al. 1997; Anyona, Schrier et al. 2006). Die Entfernung und Lyse von nicht parasitierten Erythrozyten durch das Immunsystem des Wirtes stellt dabei möglicherweise einen immunpathologischen Mechanismus dar. Zusätzlich ist die Erythropoiese gestört, was die Kompensation des Verlusts durch Erythrozytenneubildung erschwert (Chang und Stevenson 2004).

Im Verlauf der Malariaerkrankung kann es zu Adhärenz fast aller schizontenhaltiger Erythrozyten an mikrovaskuläre Endothelzellen kommen. Die Parasiten werden dadurch im

peripheren Blutgefäßsystem zurückgehalten und ihr Transport in die Milz wird verhindert. Zytoadhärenz könnte somit eine Strategie des Parasiten sein, den Effektormechanismen des Wirtsimmunsystems zu entgehen. Die Zytoadhärenz basiert auf der Expression von Proteinen der pfEMP1-Familie (*P.-falciparum*-infected erythrocyte membrane protein 1) auf der Oberfläche der parasitierten Erythrozyten. Dies führt neben der Aggregation von Erythrozyten (Rosettenbildung) zur Bindung derselben an Zelladhäsionsmoleküle auf aktiviertem Endothel. Bindungspartner von pfEMP1 sind dabei CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM-1), CD36 (GPIIb), CD31 (PECAM-1) und CD62E (E-Selectin) (Berendt, Simmons et al. 1989; Turner, Morrison et al. 1994; Schofield und Grau 2005). Die Expression dieser Moleküle erfolgt im Verlauf der Gefäßaktivierung, die durch die Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems verursacht wird. Insbesondere die Aktivierung von Thrombozyten scheint dabei eine zentrale Rolle zu spielen (Wassmer, Combes et al. 2003).

Neben der Beeinträchtigung der Parasitenbeseitigung besitzt die Zytoadhärenz weiteres pathogenes Potential. Die Sequestration parasitierter Erythrozyten ist ein charakteristisches Merkmal der gefährlichsten Malariakomplikation, der zerebralen Malaria. Die Mortalität der zerebralen Malaria bei Kindern liegt auch bei optimaler antiparasitärer Therapie bei etwa 20% (Newton und Krishna 1998). Die Symptome umfassen gleichzeitige Lähmungserscheinungen, Konvulsionen und Bewusstseinsstörungen bis zu Koma und Tod. Die Überlebenden haben häufig unter neurologischen Folgeschäden zu leiden. Im postkapillaren venösen System des Gehirns von Opfern zerebraler Malaria lässt sich umfangreiche Sequestration parasitierter und nicht parasitierter Erythrozyten, sowie von Leukozyten nachweisen. (Pongponratn, Riganti et al. 1991; Coltel, Combes et al. 2004). Diese Sequestration steht im Verdacht über Obstruktion des kapillaren Systems und nachfolgende Hypoxie im umliegenden Gewebe an der beobachteten Funktionseinschränkung des Gehirns beteiligt zu sein (Warrell, White et al. 1988). Weitere morphologische Merkmale der zerebralen Malaria sind perivaskuläre Blutungen (Ringhämorrhagien) und Hirnödeme. Diese Symptome weisen auf eine mögliche Beeinträchtigung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke hin. Die vaskulären Endothelzellen des Gehirns im gesunden Organismus sind durch tight junctions verbunden, was das Gehirnparenchym gegen den Eintritt zellulärer (z.B. Zellen des Immunsystems) sowie großer molekularer Bestandteile (z.B. Albumin) des Blutes schützt. Welche Mechanismen die Funktion der Blut-Hirn-Schranke während einer Malariainfektion beeinträchtigen ist noch weitgehend unklar. Als unspezifische, schädigende Einflüsse auf die

Endothelzellen des Gehirns kommen z.B. Hypoxie, Konkurrenz um Stoffwechselfaktoren mit metabolisch hoch aktiven Parasiten und Akkumulation toxischer Metaboliten durch eingeschränkte Perfusion in Frage. Auch direkte Schädigung der vaskulären Endothelzellen durch das Immunsystem des Wirts scheint eine Rolle zu spielen. Studien am Mausmodell zur Beteiligung unterschiedlicher Leukozytenpopulationen an der zerebralen Malaria konnten durch Depletionsexperimente eine Beteiligung von NK-Zellen,  $\gamma\delta$  T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen ausschließen (Yanez, Manning et al. 1996; Yanez, Batchelder et al. 1999). Die Depletion von sowohl  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  Lymphozyten verhindert jedoch zerebrale Malaria (Hermsen, van de Wiel et al. 1997), ebenso entwickeln T-Zelldefiziente nude-Mäuse keine zerebrale Malaria. (Finley, Mackey et al. 1982). Allerdings scheint der Einfluss dieser Zellen abhängig zu sein von dem verwendeten Maus- und Pathogenstamm, da nicht alle durchgeführten Studien die Beteiligung von sowohl  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  Zellen an der Genese der zerebralen Malaria zeigen konnten (Grau, Piguet et al. 1986). Der Einfluss von  $CD4^+$  T-Zellen wurde durch weitere Depletionsexperimente auf frühe Phasen der zerebralen Malaria eingeschränkt (früher als 6 Tage nach Infektion), die Hinweise auf eine zentrale Rolle von  $CD8^+$  T-Zellen über die gesamte Dauer der Infektion bestätigten sich (Belnoue, Kayibanda et al. 2002). Die Infektion von genetisch veränderten Mäusen, deren  $CD8^+$  T-Zellen kein Perforin produzieren können, führte nicht zu zerebraler Malaria (Nitcheu, Bonduelle et al. 2003). Dies ist ein Hinweis darauf, dass  $CD8^+$  T-Zellen über diesen zytotoxischen Wirkmechanismus, der der Beseitigung infizierter Körperzellen dient, an der Genese der zerebralen Malaria beteiligt sind. Beobachtungen, dass vaskuläre Endothelzellen des Gehirns parasitierte Erythrozyten phagozytieren (Robert, Peyrol et al. 1996) und dass murine Endothelzellen als semiprofessionelle antigenpräsentierende Zellen fungieren können (Marelli-Berg, Scott et al. 2001), lassen es möglich erscheinen, dass vaskuläre Endothelzellen perforinabhängig von  $CD8^+$  T-Zellen zerstört werden. Dies wäre ein weiterer immunpathologischer Einfluss auf die Genese zerebraler Malaria.

Den Symptomen einer Malariainfektion liegt also nicht nur ein direkter schädigender Einfluss der Parasiten z.B. durch Zerstörung der Erythrozyten, sondern ein komplexes Spektrum an Wirt-Pathogen-Interaktion zugrunde. Die Beseitigung der Infektion erfordert einerseits die ausreichende Initiierung inflammatorischer Mechanismen. Andererseits sind es diese Entzündungsreaktionen, die zu einem Großteil der Symptomatik, besonders der schweren Verlaufsformen führen. Entscheidend für einen günstigen Verlauf der Erkrankung ist daher

die permanente Justierung des Verhältnisses von Aktivierung und Attenuierung der Immunantwort durch immunregulatorische Mechanismen (Lepenius, Pfeffer et al. 2007).

## ***1.2 Regulation der Immunantwort durch Kostimulation***

Da die Effektormechanismen des Immunsystems ein hohes destruktives Potential besitzen, ist es von großer Bedeutung, diese Mechanismen auf eingedrungene Pathogene oder entartete Körperzellen zu begrenzen und Autoimmunpathologie zu verhindern. T-Zellen werden während ihrer Reifung im Thymus negativer Selektion unterworfen, bei der T-Zellen mit hoher Affinität zu dort exprimierten Autoantigenen deletiert werden (zentrale Toleranz)(Kyewski und Klein 2006; von Boehmer 2009). Da diese Selektion jedoch nicht vollständig ist, weil z.B. nicht alle Wirtsantigene im Thymus exprimiert werden können, muss die Aktivität von peripheren autoreaktiven T-Zellen, die der zentralen Selektion entgangen sind, durch weitere Regulationsmechanismen in der Peripherie kontrolliert werden (periphere Toleranz). Die Initiation von Effektormechanismen der adaptiven Immunantwort ist daher so angelegt, dass sie die Erkennung pathogenassoziierter Antigene durch mindestens zwei unterschiedliche Zellpopulationen erfordert. Erhalten naive Lymphozyten lediglich das erste Signal über ihren antigenspezifischen Rezeptor, nicht aber zeitgleich auch ein ausreichendes zweites Signal durch kostimulatorische Rezeptoren, wird in ihnen Anergie oder Apoptose induziert (Jenkins und Johnson 1993). Anergische T-Zellen können fortan auch nach optimaler Stimulation nicht mehr proliferieren und ihnen wird eine aktive Rolle bei der Induktion peripherer Toleranz zugeschrieben (Schwartz 2003). B-Zellen, die Antigene über ihren membranständigen Antigenrezeptor phagozytieren, prozessieren diese und präsentieren die so entstandenen Peptidfragmente über MHCII-Moleküle. Erst wenn T-Zellen die präsentierten Peptide in Kombination mit dem MHCII-Molekül erkennen, erfolgt das zweite aktivierende Signal durch Wechselwirkung der Rezeptoren CD40 auf der B-Zelle und CD40L auf der T-Zelle (Armitage, Fanslow et al. 1992). Erst dann kann die B-Zelle vollständig in die Effektorphase eintreten und hochspezifische Antikörper gegen das phagozytierte Antigen produzieren (Noelle, Ledbetter et al. 1992). Bevor die T-Zelle zu solcher Kostimulation in der Lage ist, muss sie ebenfalls durch zwei Signale aktiviert werden. Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen ihr Antigen, wenn es über MHCII auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) präsentiert wird. Die APZ erkennt das Pathogen dabei über spezifische Rezeptoren gegen pathogenassoziierte molekulare Muster. Erst nach ausreichender Aktivierung der APZ durch diese pathogenassoziierten Moleküle exprimiert



sie kostimulatorische Moleküle, die zusätzlich zur Interaktion von T-Zellrezeptor und MHCII-Peptid-Komplex ein zweites Signal zur T-Zelle übermitteln. Dies geschieht durch Interaktion dieser kostimulatorischen Moleküle mit entsprechenden Liganden auf der T-Zelle. Kostimulation ist somit ein wichtiger Regulationsmechanismus bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz durch Unterdrückung von Autoimmunreaktionen.

Immunantworten gegen eingedrungene Pathogene dürfen nicht unterdrückt werden. Eine zielgerichtete und effiziente Aktivierung antigenspezifischer Lymphozyten wird wie beschrieben durch kostimulatorische Signale während ihrer Aktivierung sicher gestellt. Da eine unkontrollierte Immunreaktion für den Wirt schädlicher sein kann, als die Infektion selbst, muss das Ausmaß der Aktivierung und nachfolgender Effektormechanismen jedoch begrenzt werden. Hieran sind koinhibitorische Moleküle beteiligt, die im Gegensatz zu kostimulatorischen Molekülen einen dämpfenden Einfluss auf die Zellen, die sie exprimieren, ausüben. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die Funktion der wichtigsten kostimulatorischen und koinhibitorischen Moleküle.

### **1.2.1 CD28 – CD80/CD86**

Das wichtigste kostimulatorische Signal für die Aktivierung naiver T-Zellen ist die Interaktion von CD28 auf der T-Zelle mit seinen Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf reifen antigenpräsentierenden Zellen, die diese Moleküle nach Aktivierung hochreguliert haben. Diese Interaktion ist das zentrale Element des 2. Signals, welches gemeinsam mit der Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem MHCII-Peptidkomplex (1. Signal) zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle führt. Die Interaktion von T-Zellen mit unreifen antigenpräsentierenden Zellen, die die Expression von CD80 und CD86 noch nicht hochreguliert haben und CD28 auf der T-Zelle daher nicht ligieren können, löst in den T-Zellen hingegen Anergie aus (Linsley, Brady et al. 1991; Harding, McArthur et al. 1992). CD28 wird von T-Zellen konstitutiv exprimiert. Als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie besitzt CD28 eine einzelne IgV-Domäne (Immunoglobulin variable-like domain), eine Transmembran- sowie eine kurze zytosolische Domäne. Über einen ungepaarten Cysteinrest in der extrazellulären Domäne kommt es zur Ausbildung einer intermolekularen Bindung, so dass CD28—ebenso wie CTLA-4 (siehe 1.2.3) und ICOS (siehe 1.2.2), jedoch im Unterschied zu PD-1 (siehe 1.2.4) und BTLA (siehe 1.2.5)—als Homodimer auf der Zelloberfläche vorliegt (Riley und June 2005). Die zytoplasmatische Domäne enthält das Primärsequenzmotiv

YMNM, das nach Tyrosinphosphorylierung als Bindungsstelle für die Phosphatase SHP-2 (**S**rc **H**omology 2 domain containing **P**hosphatase) sowie das Adapterprotein Grb-2 (**G**rowth factor receptor **b**ound protein **2**) dient. Auch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) scheinen an der Signaltransduktion beteiligt zu sein (Frauwirth und Thompson 2002; Riley und June 2005). Über diese Mediatoren wird das Signal nach Ligation in die Zelle geleitet. Als Konsequenz kommt es zu lang anhaltender IL-2-Sekretion und der Expression des IL-2-Rezeptors, was autokrine Stimulation mit nachfolgender Aktivierung und Proliferation zur Folge hat (Yashiro, Tai et al. 1998).

### 1.2.2 ICOS – ICOSL

Der Rezeptor ICOS (Inducible COStimulator) gehört ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie und ist zu 24% sequenzidentisch mit CD28. Er wird erst nach Aktivierung von T-Zellen über den T-Zellrezeptor exprimiert, besitzt dann aber kostimulatorisches Potential, das mit dem von CD28 vergleichbar ist (Hutloff, Dittrich et al. 1999; Yoshinaga, Whoriskey et al. 1999). Sein Ligand ICOSL (auch LICOS, B7RP-1, B7-H2 oder B7h) besitzt eine 20%ige Sequenzhomologie zu den Rezeptoren CD80 und CD86 und wird ebenso wie diese vorrangig auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (Ling, Wu et al. 2000). Die Kostimulation durch ICOS kann das CD28-abhängige Signal beim Priming von T-Zellen nicht ersetzen, da T-Zellen, die nur durch ICOS kostimuliert werden, kein IL-2 produzieren und nach 3-5 Zellteilungen in Apoptose eintreten. Allerdings erhöht ICOS-Kostimulation die Produktion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 und IL-10, deren Sekretion für Effektorzellen typisch ist (Riley, Mao et al. 2002; Riley und June 2005). Insgesamt deuten diese Ergebnisse eher auf eine Rolle der ICOS-ICOSL-Interaktion bei der Aufrechterhaltung des aktivierten Zustands von T-Effektorzellen als auf eine Beteiligung an der Kostimulation naiver T-Zellen hin. ICOS-defiziente Mäuse weisen Defekte der T<sub>H</sub>2-Antwort und folglich der humoralen Immunantwort auf, was eine besondere Bedeutung der ICOS-ICOSL-Interaktion für diesen Zweig der adaptiven Immunantwort nahe legt (Dong, Temann et al. 2001).

### 1.2.3 CTLA-4 – CD80/CD86

CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4) ist ein Rezeptor auf T-Zellen, der zur Immunglobulin-Superfamilie gehört und eine 75%ige Homologie zum kostimulierenden Rezeptor CD28 aufweist. Wie die ICOS-Expression wird die CTLA-4-Expression erst nach initialer Aktivierung der T-Zellen über CD28 hochreguliert. Im Gegensatz zu CD28 handelt es

sich bei CTLA-4 jedoch um einen potenten Inhibitor der T-Zellaktivierung. So führen agonistisch wirkende anti-CTLA-4-Antikörper zu verminderter T-Zellproliferation und IL-2-Sekretion (Walunas, Bakker et al. 1996). CTLA-4 defiziente Mäuse entwickeln fatale Autoimmunpathologie durch unkontrollierte Lymphozytenproliferation (Tivol, Borriello et al. 1995; Waterhouse, Penninger et al. 1995). Bei transgenen Mäusen, die lediglich die extrazelluläre Domäne des Moleküls exprimieren, ist diese Symptomatik nur in stark abgeschwächter Form vorhanden (Masteller, Chuang et al. 2000). Dies weist auf eine Beteiligung sowohl der extrazellulären als auch der zytosolischen Domäne an der inhibitorischen Wirkung hin. CTLA-4 bindet mit CD80 und CD86 die gleichen Rezeptoren auf antigenpräsentierenden Zellen wie CD28. Allerdings besitzt CTLA-4 dabei eine 20-100fach höhere Affinität als CD28 (Collins, Brodie et al. 2002). Der Einfluss der extrazellulären Domäne auf die koinhibitorische Funktion von CTLA-4 beruht daher zumindest zum Teil auf Konkurrenz um die Bindungspartner von CD28. Der zytosolische Teil von CTLA-4 enthält wie CD28 Bindungsstellen für SHP-2, PP2A und PI3K, wobei die genauen Mechanismen der Perpetuierung des inhibierenden Signals noch unklar sind (Riley und June 2005). Die Kinetik der CTLA-4-Expression und die hohe Affinität zu den Liganden legen nahe, dass eine Funktion von CTLA-4 die Begrenzung der Kostimulation ist, indem es die CD28-CD80 / CD86 Interaktion mit zunehmender Aktivierung durch Verdrängung von CD28 verhindert. CTLA-4 ist darüber hinaus an der inhibitorischen Aktivität von regulatorischen T-Zellen beteiligt. So wurde gezeigt, dass blockierende anti-CTLA-4-Antikörper die Suppression durch regulatorische T-Zellen vermindern (Loser, Scherer et al. 2005). CTLA-4-defiziente regulatorische T-Zellen sind in ihrem suppressorischen Potential stark eingeschränkt (Kataoka, Takahashi et al. 2005; Wing, Onishi et al. 2008). Die Untersuchung des Einflusses von CTLA-4 auf die Immunreaktion und Immunpathologie während einer Malariainfektion bestätigte die zentrale Rolle des Rezeptors bei der Attenuierung von Effektormechanismen des Immunsystems. Die Expression von CTLA-4 wird auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Blutphase der Malaria induziert (Schlotmann, Waase et al. 2000; Lepenies, Gaworski et al. 2007). Während der Infektion mit einem nichtletalen *Plasmodium yoelii*-Stamm verbessert die Blockierung von CTLA-4 durch einen Antikörper zwar die Immunantwort, die gleiche Intervention während einer Infektion mit einem *Plasmodium yoelii*-Stamm höherer Pathogenität induziert jedoch letale Immunpathologie (Lepenies, Gaworski et al. 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen, die an der Entstehung zerebraler

Malaria beteiligt sind, durch CTLA-4 attenuiert werden. Hierzu wurden Mäuse mit *P. berghei* ANKA infiziert, nachdem ihnen ein blockierender anti-CTLA-4-Antikörper gespritzt worden war, was die Inzidenz von zerebraler Malaria erhöhte (Jacobs, Graefe et al. 2002). Auch in der Leber kommt es nach CTLA-4-Blockade zu erhöhter Pathologie durch inflammatorische Vorgänge während der Blutphase einer *P. berghei* ANKA-Infektion (Jacobs, Plate et al. 2004). Diese Ergebnisse belegen die herausragende Bedeutung von CTLA-4 für die Kontrolle der Immunantwort und für die Verhinderung von Immunpathologie im Verlauf einer Infektion.

#### 1.2.4 PD-1 – PD-L1/PD-L2

PD-1 (Programmed Death-1) gehört wie CTLA-4 zur CD28-Familie und seine Liganden PD-L1 und PD-L2 gehören wie die Liganden von CTLA-4 und CD28 zur B7-Familie. PD-1 und CTLA-4 besitzen eine 23%ige Sequenzhomologie. PD-1-Expression wird nach Aktivierung auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NKT-Zellen, B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen induziert. PD-L1 (CD274) ist auf naiven B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen sowie auf einigen nichthämatopoietischen Zellarten exprimiert und wird nach Aktivierung weiter hochreguliert. PD-L2 wird nach Aktivierung von dendritischen Zellen, Makrophagen, peritonealen B1-Zellen und Mastzellen exprimiert (Eppihimer, Gunn et al. 2002; Yamazaki, Akiba et al. 2002; Liang, Latchman et al. 2003; Petrovas, Casazza et al. 2006; Zhong, Tumang et al. 2007; Keir, Butte et al. 2008; Brown, Freeman et al. 2010). Nach Ligation attenuiert PD-1 das Signal durch den antigenspezifischen Rezeptor von T-Zellen und B-Zellen (Okazaki, Maeda et al. 2001; Parry, Chemnitz et al. 2005).

Da PD-1 keinen ungepaarten Cysteinrest in der extrazellulären Domäne besitzt, liegt es als Monomer auf der Zelloberfläche vor (Zhang, Schwartz et al. 2004). Die zytosolische Domäne von PD-1 ist länger als die von CTLA-4 und enthält ein membranproximales ITIM (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motive) sowie ein membrandistales ITSM (Immunoreceptor Tyrosine based Switch Motive). Diese Motive dienen im phosphorylierten Zustand der Rekrutierung der Phosphatasen SHP-2 und eventuell SHP-1, die an der weiteren Signaltransduktion beteiligt sind (Chemnitz, Parry et al. 2004).

PD-1-defiziente C57Bl/6-Mäuse entwickeln eine Lupus-ähnliche proliferative Arthritis und Glomerulonephritis, PD-1-defiziente Balb/c-Mäuse entwickeln dagegen Cardiomyopathien durch autoreaktive Antikörper (Nishimura, Nose et al. 1999; Nishimura, Okazaki et al. 2001).

Die Funktion von PD-1 und seiner Interaktion mit PD-L1 und PD-L2 scheint im homöostatischen Zustand daher in der Induktion und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz zu liegen.

Umfangreich belegt ist der Einfluss von PD-1 auf die Immunantwort gegen chronische Virusinfektionen. Im Verlauf dieser lang anhaltenden Immunantwort wird mit zunehmender Dauer in den antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen Anergie induziert. Dies führt zur Erschöpfung der für die Beseitigung von Virusinfektionen wichtigsten Zellpopulation. Für die Erschöpfung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist eine hohe PD-1 Expression sowohl Kennzeichen als auch verursachender Mechanismus. So führt die Blockierung von PD-1 mittels antagonistischer Antikörper zur Reaktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort und zur Verminderung der Viruslast während einer chronischen LCMV-Infektion in Mäusen (Barber, Wherry et al. 2006) und während der HIV-Infektion von Menschen (Day, Kaufmann et al. 2006; Trautmann, Janbazian et al. 2006).

Über die Beeinflussung der Immunantwort gegen nicht-virale Infektionen durch PD-1 ist weniger bekannt. Die Immunantwort gegen den intrazellulären Pilz *Histoplasma capsulatum* ist in PD-1 defizienten Mäusen erheblich verbessert (Lazar-Molnar, Gacser et al. 2008). Die Untersuchung des Einflusses der PD-1/PD-L1-Interaktion in einer Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* zeigte hingegen eine unerwartet kostimulatorische Wirkung auf die primäre wie auch sekundäre Immunantwort (Rowe, Johans et al. 2008). Ob dieser Einfluss allerdings von anderen PD-L1-Liganden vermittelt wird, ist bislang unklar. Seit 2007 ist zudem bekannt, dass PD-L1 auch an CD80 bindet und so koinhibitorisch auf T-Zellen wirkt (Butte, Keir et al. 2007).

### **1.2.5 BTLA/LIGHT/CD160 – HVEM**

Seit 2003 ist mit BTLA (**B** and **T** Lymphocyte **A**ttenuator) neben CTLA-4 und PD-1 ein dritter koinhibitorisch wirkender Rezeptor bekannt. Das 306 Aminosäuren umfassende murine BTLA-Protein besitzt eine extrazelluläre Ig-Domäne mit sechs N-Glycosylierungsstellen. Röntgenkristallographische Untersuchungen ergaben jedoch, dass es sich bei der Ig-Domäne im Gegensatz zu den übrigen CD28-artigen Rezeptoren CD28, CTLA-4, PD-1 und ICOS nicht um eine V-Typ- sondern um eine I-Typ-Domäne (Intermediate) handelt (Compaan, Gonzalez et al. 2005). In einer verkürzten Variante von BTLA (BTLAs) fehlt diese Domäne, da das Exon 2 während der mRNA-Reifung herausgespleißt wird. Die zytosolische Domäne des

Rezeptors enthält wie PD-1 ein ITIM (Y257) und ein ITSM (Y282), sowie eine Grb-2-Bindungsstelle (Y226), die nach Tyrosinphosphorylierung die Interaktion mit den Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 ermöglichen (Watanabe, Gavrieli et al. 2003). BTLA wird im Menschen und in C57BL/6-Mäusen von dendritischen Zellen, Makrophagen, NK- und NKT-Zellen, vor allem aber von B- und T-Zellen exprimiert. In anderen Mausstämmen finden sich Abweichungen sowohl in der Sequenz, als auch im Expressionsmuster (Hurchla, Sedy et al. 2005). B-Zellen regulieren BTLA im Verlauf ihrer Entwicklung stärker hoch als T-Zellen, so dass die Expression in naiven, reifen B-Zellen etwa zehnmal so hoch ist wie in naiven, reifen T-Zellen. Im Verlauf der Aktivierung regulieren B-Zellen die Expression jedoch herunter, während sie in T-Zellen hochreguliert wird (Han, Goularte et al. 2004; Hurchla, Sedy et al. 2005). Dabei sind die Berichte über differentielle Expression in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen bislang widersprüchlich. So wurde beschrieben, dass die Expression in stimulierten  $T_H1$ -Zellen über zwei Wochen stabil bleibt, in  $T_H2$ -Zellen jedoch bereits früher wieder herunter reguliert wird (Watanabe, Gavrieli et al. 2003). Spätere Studien ergaben im Gegensatz dazu knapp zwei Wochen nach Stimulation eine gleichstarke Expression in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen (Otsuki, Kamimura et al. 2006). Ähnlich wie PD-1 wird auch BTLA auf anergen T-Zellen stark exprimiert, was auf eine Funktion von BTLA in der Induktion von Anergie oder Seneszenz hindeuten könnte (Hurchla, Sedy et al. 2005).

BTLA-defiziente B- und T-Zellen proliferierten stärker als die entsprechenden Wildtypzellen nach Stimulation über die antigenspezifischen Rezeptoren (Watanabe, Gavrieli et al. 2003; Han, Goularte et al. 2004). Die inhibitorische Funktion von BTLA wurde zudem durch Ligation mit einem BTLA-spezifischen Antikörper während der Stimulation von T-Zellen mittels anti-CD3-Antikörper demonstriert. Diese unterband sowohl die Sekretion von IL-2 als auch die Proliferation fast vollständig (Krieg, Han et al. 2005). Bei Stimulation durch die Mitogene Concanavalin A oder LPS konnten hingegen keine wesentlichen Unterschiede in der Proliferation beobachtet werden (Watanabe, Gavrieli et al. 2003).

Diese Ergebnisse deuten auf eine inhibitorische Funktion von BTLA durch Beeinflussung der Signaltransduktion durch den antigenspezifischen Rezeptor hin. Die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 könnten dabei durch Dephosphorylierung der CD3- $\zeta$ -Ketten, LAT (Linker for activation of T cells) und ZAP70 ( $\zeta$ -chain-associated protein kinase of 70 kDa) am koinhibitorischen Mechanismus beteiligt sein. Die Rekrutierung von SHP-1 und SHP-2 an die zytosolischen

ITIM/ITSM-Motive nach Ligation wurde bereits gezeigt (Gavrieli, Watanabe et al. 2003; Sedy, Gavrieli et al. 2005; Chemnitz, Lanfranco et al. 2006). Auch eine verminderte Phosphorylierung der CD3- $\zeta$ -Ketten nach BTLA-Ligation konnte nachgewiesen werden (Wu, Zhen et al. 2007). Dies wurde in ähnlicher Form für CTLA-4 gezeigt. Nach CTLA-4-Ligation ist die Phosphorylierung von ZAP70 beeinträchtigt, was mit der weiteren TCR-Signaltransduktion interferiert (Guntermann und Alexander 2002).

*In vitro*-Bindungsstudien ergaben darüber hinaus Hinweise auf eine Interaktion der intrazellulären Domäne von BTLA mit dem Adapterprotein Grb2 und der p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (Gavrieli und Murphy 2006). Hieraus ergibt sich eine mögliche Modulation z.B. der RAS/MAPK- bzw. AKT/mTOR-Signaltransduktionswege, die unter anderem die Proliferation und das Überleben von Lymphozyten beeinflussen.

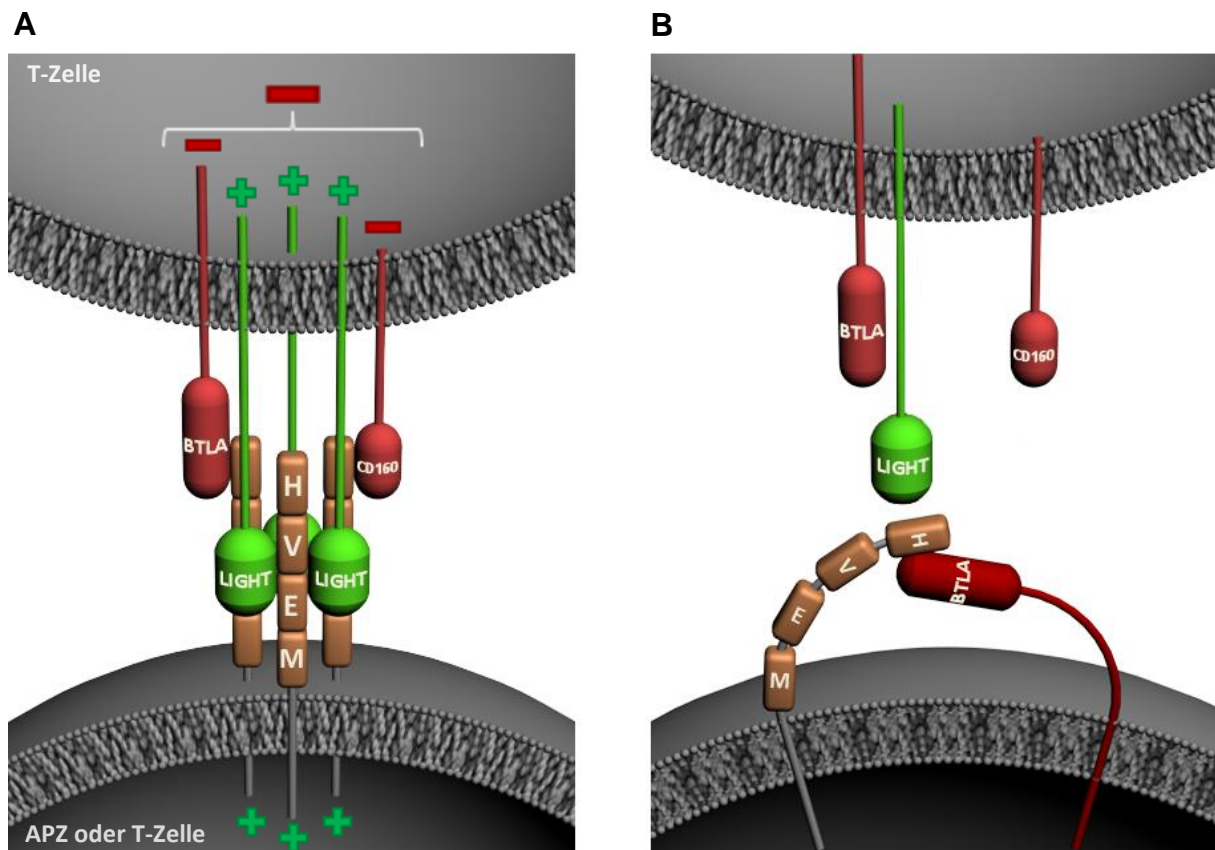
Der einzige bekannte Ligand für BTLA ist HVEM (**H**erpes **V**irus **E**ntry **M**ediator) (Gonzalez, Loyet et al. 2005; Sedy, Gavrieli et al. 2005). Als einziges Mitglied der CD28-Familie bindet BTLA somit anstatt eines Mitglieds der eigenen Rezeptorfamilie ein Mitglied der TNFR-Superfamilie (**T**umor **N**ecrosis **F**actor **R**eceptor). Diese Familie umfasst neben HVEM andere Rezeptoren wie 4-1BB, CD27, CD30 und OX40, die bei der Aktivierung von T-Zellen kostimulatorisch wirken (Murphy, Nelson et al. 2006). TNF-Rezeptoren liegen nach Bindung Ihrer TNF-Liganden in homotrimerer Form vor. Ob HVEM *in vivo* nach Bindung an BTLA trimerisiert, ist zwar bislang ungeklärt, *in vitro* liegen die Komplexe allerdings in monomerer Form vor (Compaan, Gonzalez et al. 2005).

Murines HVEM besteht aus 275 Aminosäuren und besitzt eine extrazelluläre Domäne, die vier CRDs (**C**ysteine **R**ich **D**omains) enthält, sowie eine Transmembran- und eine mit ca. 40 Aminosäuren recht kurze zytoplasmatische Domäne. Diese enthält Bindungsmotive für die TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren (TRAF) 1,2,3 und 5. Über diese kann die Signaltransduktion erfolgen, die in HVEM-transfizierten Zellen zu erhöhter Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 führt (Marsters, Ayres et al. 1997). Für TRAF2 konnte eine Beteiligung an der Signaltransduktion von HVEM bereits gezeigt werden (Cheung, Steinberg et al. 2009). Strukturuntersuchungen von Cokristallen der extrazellulären Domänen von BTLA und HVEM zeigten, dass die Interaktion über die membrandistalste CRD1 von HVEM stattfindet.

Kürzlich wurde mit CD160 ein weiterer HVEM-Ligand gefunden. Bis dahin war nur bekannt, dass CD160 durch eine schwachaffine Interaktion mit MHCI-Molekülen die Aktivierung von NK-Zellen reguliert (Maeda, Carpenito et al. 2005). Die Ligation von CD160, welches in geringem Maße von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird, durch HVEM oder anti-CD160-Antikörper führt *in vitro* zu einer starken Attenuierung der Proliferation und Zytokinsekretion (Cai, Anumanthan et al. 2008). Auswirkungen dieser Interaktion *in vivo* wurden bislang allerdings noch nicht gezeigt. Murines CD160 besitzt eine extrazelluläre V-Typ Ig-Domäne, in keiner der bekannten Spleißformen jedoch eine Transmembrandomäne. Es liegt entweder gelöst, oder über GPI-Anker (**Glycosylphosphatidylinositolanker**) an die Zellmembran gekoppelt vor. Wie CD160 ohne direkten Kontakt in das Zellinnere ein koinhibitorisches Signal in die Zelle transduzieren kann, ist bislang unklar. Da andere GPI-verankerte Proteine wie CD59, CD90 und CD48 jedoch die Aktivität von Tyrosinkinasen in Lipid Rafts regulieren, die an der Signaltransduktion während der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt sind, ist ein solcher Mechanismus auch für CD160 denkbar (Stefanova, Horejsi et al. 1991; Morgan, van den Berg et al. 1993; Cai, Anumanthan et al. 2008).

Vor Entdeckung der BTLA-HVEM-Interaktion war bekannt, dass HVEM ein kostimulatorisch wirkender Rezeptor ist. Diese Funktion basiert auf der Bindung von HVEM an einen weiteren Liganden namens LIGHT („homologous to Lymphotoxins, Inducible expression, competes with herpes simplex virus Glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed on T-lymphocytes“). So führt die Blockade der HVEM-LIGHT-Interaktion durch anti-HVEM-Antikörper während der Aktivierung von T-Zellen zu einer Verringerung der Proliferation und Zytokinsekretion der T-Zellen (Harrop, McDonnell et al. 1998). CD8<sup>+</sup> T-Zellen LIGHT-defizienter Mäuse sind schlechter stimulierbar als Wildtypzellen (Liu, Schmidt et al. 2003). Zudem weisen transgene Mäuse, die LIGHT auf T-Zellen überexprimieren, lymphoproliferative Autoimmunität auf, die durch Blockierung der LIGHT-HVEM-Interaktion durch HVEM-Ig gedämpft wird (Wang, Lo et al. 2001). Während dieser Interaktion kann das kostimulatorische Signal allerdings sowohl über LIGHT, als auch über HVEM oder gleichzeitig über beide Rezeptoren in die T-Zellen gelangen (Murphy, Nelson et al. 2006) (Abb. 3 A). So ist seit kurzem bekannt, dass HVEM nach Bindung aller bekannter Liganden *in trans* ein kostimulatorisches Signal in die HVEM-exprimierende Zelle transduzieren kann (Cheung, Osborne et al. 2009). Diese *trans*-Interaktionen können dabei durch *cis*-Interaktionen von





**Abb. 3 Schematische Darstellung der Interaktionen des Rezeptors HVEM mit seinen Liganden**

Koinhibitorische und kostimulatorische Signale nach Interaktion von HVEM mit seinen Liganden sind als Minus- bzw. Pluszeichen dargestellt (**A**). Die *cis*-Interaktion von HVEM mit BTLA löst keine Signale über HVEM aus und inhibiert Wechselwirkungen von HVEM mit seinen Liganden in *trans* (**B**).

HVEM und BTLA auf derselben Zelle inhibiert werden, was eine zusätzliche Kontrollebene der Signaltransduktion von HVEM darstellt (Abb. 3 **B**).

Röntgenkristallographische Untersuchungen sowie Mutagenesestudien ergaben, dass die Bindungsstellen von HVEM für LIGHT und BTLA verschieden sind. Somit ist eine gleichzeitige Interaktion von HVEM mit LIGHT und BTLA unter Ausbildung eines ternären Komplexes möglich (Compaan, Gonzalez et al. 2005). Aus *in vitro* Kompetitionsstudien geht hervor, dass die Bindungsstellen von BTLA und CD160 an HVEM überlappen. Daher erscheint ein ternärer Komplex auch für die HVEM-LIGHT-CD160-Interaktion möglich (Cai, Anumanthan et al. 2008). Bei gleichzeitiger Interaktion von HVEM mit LIGHT und den Koinhibitoren BTLA oder CD160 scheint dabei die koinhibitorische Wirkung zu überwiegen (Cai, Anumanthan et al. 2008; Kaye 2008) (Abb. 3 **A**). Dies könnte allerdings von der relativen Expressionsstärke der einzelnen Liganden abhängen und damit im Verlauf einer Immunantwort variieren.

Es ist bereits bekannt, dass die Interaktion von BTLA mit seinem Liganden HVEM eine Vielzahl unterschiedlicher Immunantworten beeinflusst. Dies gilt allerdings hauptsächlich für Immunantworten in experimentellen Modellen von Organtransplantationen oder Autoimmunerkrankungen. So sind BTLA-defiziente Mäuse anfälliger für experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, einem Modell für die Multiple Sklerose im Menschen (Watanabe, Gavrieli et al. 2003), sowie für Concanavalin A-induzierte Hepatitis, die ein Modell für autoimmune Hepatitis des Menschen darstellt (Miller, Sun et al. 2009). BTLA-defiziente Mäuse weisen außerdem eine verlängerte Lungenentzündung im Modell der akuten allergischen Entzündung der Atemwege auf (Deppong, Juehne et al. 2006). Hierbei handelt es sich um ein experimentelles Asthma-Modell. Nach Transplantation partiell allogener Herzen in Mäusen verhindert BTLA langfristig die Abstoßung des Organs (Tao, Wang et al. 2005). Auch ein gegen BTLA gerichteter Antikörper, der in diesem Modell pathogene Zellen mit hoher BTLA-Expression depletiert (Klon 6F7), trug zur Toleranz gegen allogene Transplantate bei (Truong, Plester et al. 2007). Der gleiche Antikörper bewirkt einen milderen Verlauf der Erkrankung in einem experimentellen Diabetes-Modell (Truong, Hancock et al. 2009) und einem experimentellen Transfer-Colitis-Modell für entzündliche Darmerkrankungen des Menschen (Steinberg, Turovskaya et al. 2008). Die Anwendung eines anderen gegen BTLA gerichteten Antikörpers (Klon 6A6), der nach Bindung Signaltransduktion durch BTLA auslöst, also agonistisch wirkt, verhindert nach Knochenmarktransplantation langfristig die Transplantat-Wirt-Reaktion (Graft versus Host disease), einer gefährlichen immunpathologischen Komplikation nach Knochenmarktransplantationen (Albring, Sandau et al. 2010).

Über den Einfluss von BTLA auf Immunantworten gegen Infektionen ist im Gegensatz dazu relativ wenig bekannt. Es konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass BTLA-defiziente sowie HVEM-defiziente Mäuse resistenter gegen die Infektion mit *Listeria monocytogenes* sind (Sun, Brown et al. 2009). Dass BTLA einen Einfluss auf den Verlauf einer Malariainfektion besitzt, wurde durch Administration des agonistisch wirkenden anti-BTLA-Antikörpers (Klon 6A6) während der Infektion von Mäusen mit *P. berghei* ANKA gezeigt. Diese führte zu einer reduzierten Inzidenz von zerebraler Malaria (Lepencies, Pfeffer et al. 2007). Inwieweit BTLA die protektive Immunantwort gegen Malaria beeinflusst, ist jedoch bislang unbekannt.

## ***Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit***

Die koinhibitorische Funktion von BTLA bei der Modulation von Immunantworten gegen Autoantigene, Allergene und Transplantate wurde seit der Erstbeschreibung 2003 umfangreich belegt. Die hierzu gewonnenen Erkenntnisse deuten bereits therapeutisches Potential der pharmakologischen Beeinflussung dieses Signalwegs an. Für die Sicherheit einer solchen therapeutischen Intervention ist jedoch ein umfassendes Verständnis der Funktionen von BTLA bei der Regulation von Immunantworten unerlässlich. Über den Einfluss von BTLA auf die protektiven Immunantworten gegen Infektionen und die Funktion von BTLA auf nicht-T-Zellen ist jedoch bislang nur wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Auswirkung von BTLA auf die protektive Immunantwort gegen eine akute Infektion. Um dabei auch den Einfluss der BTLA-Expression von nicht-T-Zellen untersuchen zu können, wurde die *Plasmodium yoelii* NL-Infektion von C57BL/6-Mäusen als Infektionsmodell gewählt. An der Immunantwort gegen die Blutphase sind hier eine Vielzahl von Zellpopulationen beteiligt, was die Untersuchung des Einflusses der BTLA-Expression jeder dieser Zellpopulationen ermöglicht. Nach der Identifizierung von Zellpopulationen, die während der Infektion durch BTLA reguliert werden, sollte die Wirkung von BTLA auf die Effektormechanismen dieser Populationen untersucht werden. Hierbei sollten insbesondere die Zytokinantwort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Antikörperantwort untersucht werden, weil diese für die protektive Immunantwort gegen die Blutphase von zentraler Bedeutung sind. Da hierbei jeweils der zellintrinsic Einfluss von BTLA untersucht werden sollte, musste der Einfluss von BTLA, welches auf anderen Zellpopulationen exprimiert wird, durch Verwendung knochenmarkchimärer Mäuse abgegrenzt werden.

Parallel zur Untersuchung des Einflusses von BTLA auf protektive Mechanismen sollte die Beteiligung von BTLA an der Kontrolle von Immunpathologie während der Blutphase analysiert werden. Diese Untersuchungen sollten unter Verwendung der Plasmodienstämme *Plasmodium berghei* ANKA und *Plasmodium berghei* NK65 zur Infektion von C57BL/6-Mäusen erfolgen, da die Immunantwort hier stärker als bei Verwendung von *Plasmodium yoelii* NL durch immunpathologische Mechanismen gekennzeichnet ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelelektrophoresekammer	<i>BioRAD</i> , München
Analysenwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen
Biophotometer	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Brutschrank	<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator	<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau
Cytospin-Zentrifuge Cytospin 3	<i>Shandon Scientific</i> , Runcorn, UK
Durchflusszytometer FACSscan	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCalibur	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
Durchflusszytometer LSRII	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
Durchflusszytometer C6	<i>Accuri Cytometers</i> , Ann Arbor, USA
ELISA-Photometer MRX-II	<i>Dynex Technologies</i> , Berlin
γ-Bestrahlungsgerät	<i>STS</i> , Braunschweig
Invers-Mikroskop Nikon TMS	<i>Nikon Instruments</i> , Badhoevedorp
Kamera für DNA-Gelfotos RT1	<i>Kaiser Fototechnik</i> , Buchen
Magnetrührer IKAMAG RCT	<i>IKA Labortechnik</i> , Staufen
MidiMACS-Zellseparationssystem	<i>Miltenyi Biotec</i> , Bergisch Gladbach
Mikroskop Olympus CK2	<i>Olympus</i> , Hamburg
Mikroskop Axiostar plus	<i>Zeiss</i> , Oberkochen
Mikrowellengerät	<i>Panasonic</i> , Wiesbaden
Netzgerät für Agarose-Gelelektrophorese	<i>BioRAD</i> , München
Netzgerät PAA-Gelelektrophorese E143	<i>Consort</i> , Turnhout, Belgien
Netzgerät Protein-Blot PHERO-stab.200	<i>Biotec-Fischer</i> , Reiskirchen
PAA-Gelelektrophoresekammer H10-220.000	<i>Harnischmacher Labortechnik</i> , Kassel
pH-Meter (WTW pH537)	<i>Labotec</i> , Wiesbaden
Pipetten	<i>Eppendorf</i> , Hamburg u. <i>Gilson</i> , Middleton,
Protein-Blotkammer	<i>peqLab Biotechnologie</i> , Erlangen
Rollgerät für Zellkulturflaschen CELLROLL	<i>Tecnomara</i> , Fernwald
Schüttelinkubator CertomatBS-T	<i>B.Braun Biotech International</i> , Melsungen
Schüttler Duomax 2030	<i>Heidolph Instruments</i> , Schwalbach
Schüttler Thermomixer comfort	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Sterile Arbeitsbank Biowizard	<i>Kojair</i> , Vilppula, Finnland
Sterile Arbeitsbank LaminAir HB 2448	<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau
Thermocycler Px2	<i>Thermo Scientific</i> , Waltham, USA

**Bezeichnung**

Tischzentrifuge Centrifuge 5415C  
 Thermomixer 5436  
 UV-Flächenstrahler N-90 L  
 Vortexer Vortex Genie 2  
 Vortexer MS1 Minishaker  
 Wasserbad Thermomix MM  
 Wasserdeionisierungsanlage  
 Zentrifuge 3-16K  
 Zentrifuge Biofuge fresco  
 Zentrifuge Megafuge 1.0R

**Hersteller**

*Eppendorf, Hamburg*  
*Eppendorf, Hamburg*  
*Benda Laborgeräte, Wiesloch*  
*Bender & Hobein, Zürich, Schweiz*  
*IKA Labortechnik, Staufen*  
*B. Braun, Melsungen*  
*SG Clear, Barsbüttel*  
*Sigma Laborzentrifugen, Osterode*  
*Heraeus Instruments, Hanau*  
*Heraeus Instruments, Hanau*

**2.1.2 Glas- und Kunststoffverbrauchsmittel****Bezeichnung**

Chirurgische Einmal-Skalpelle  
 Dialyseschlauch Membra-Cel MD34-14x100  
 Einfrierröhrchen für Zellen (1,8 ml)  
 Einmal-Injektionskanülen (0,4 × 20 mm)  
 Einwegpipetten (5, 10 und 25 ml)  
 ELISA-Microplatte 96-Well microlon  
 Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)  
 FACS-Röhrchen  
 Glaspipetten  
 MACS-Separationssäulen LS  
 Neubauer Zählkammer (0,1 × 0,0025 mm<sup>2</sup>)  
 Objektträger (76 × 26 mm)  
 Petrischalen für Zellkultur (100 × 20 mm)  
 Photometrie Kunststoffkuvetten UVette  
 Pipettenspitzen  
 Spritzen (5, 10 und 20 ml)  
 Sterilfilter (0,2 µm)  
 Zellfilter Filcon  
 Zellkulturflasche CELLSTAR  
 Zellkulturplatten 6- / 24- / 96-Well  
 Zellsiebe Cell strainer (70 µm)  
 Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)

**Hersteller**

*Braun, Melsungen*  
*Roth, Karlsruhe*  
*Nunc, Roskilde, Dänemark*  
*Braun, Melsungen*  
*Becton Dickinson, Heidelberg*  
*Greiner bio-one, Frickenhausen*  
*Sarstedt, Nümbrecht*  
*Sarstedt, Nümbrecht*  
*Brand, Wertheim*  
*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*  
*Hecht-Assistent, Sondheim*  
*Engelbrecht, Edermünde*  
*Sarstedt, Nümbrecht*  
*Eppendorf, Hamburg*  
*Greiner bio-one, Frickenhausen*  
*Braun, Melsungen*  
*Sarstedt, Nümbrecht*  
*BD Biosciences, Bedford, USA*  
*Greiner bio-one, Frickenhausen*  
*Greiner bio-one, Frickenhausen*  
*BD Biosciences, Bedford, USA*  
*Greiner bio-one, Frickenhausen*

### 2.1.3 Chemikalien

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

### 2.1.4 Material für molekularbiologische Arbeiten

#### 2.1.4.1 Oligonucleotid-Primer

Alle PCR-Primer wurden von *MWG Biotech* (Ebersberg) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz
BTLA_Exon1_fw.	5'-ACAGTCCCTGCCATGCTT-3'
BTLA_Exon1_rv.	5'-CATTCTCTTAGTAGCTTTCTCACAA-3'
BTLA_Exon4_fw.	5'-ACATCCCAGATGCCACCAAT-3'
BTLA_Exon4_rv.	5'-CTTGGATCCTTTTCAGAAAGC-3'

#### 2.1.4.2 Enzyme

*Taq* DNA-Polymerase (5 U /  $\mu$ l) *MBI Fermentas*, St. Leon-Roth

#### 2.1.4.3 Agenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	<i>Biomol</i> , Hamburg
Ampicillin	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Bromphenolblau	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Desoxyribonukleosidtriphosphate	<i>MBI Fermentas</i> , St. Leon-Roth
Dithiothreitol (DTT)	<i>Gibco BRL</i> , Eggesheim
DNA-Beladungspuffer	<i>MBI Fermentas</i> , St. Leon-Roth
DNA-Gelextraktions-Kit QIAEX <sup>®</sup> II	<i>QIAGEN</i> , Hilden
DNA-Längenstandard 100 bp DNA Ladder plus	<i>MBI Fermentas</i> , St. Leon-Roth
Ethidiumbromid	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
H <sub>2</sub> O für Molekularbiologie	<i>Eppendorf</i> , Hamburg

### 2.1.4.4 Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen

#### Ampicillin-Stammlösung

25 mg / ml, sterilfiltriert

#### Desoxyribonukleotid-Gemisch (dNTPs)

je 2 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP

#### Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg / ml

#### TBE-Puffer (10x)

0,89 M Tris-Base

0,89 M Borsäure (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)

20 mM EDTA

pH 8,0

### 2.1.5 Material für proteinchemische Arbeiten

#### 2.1.5.1 Agenzien

##### **Bezeichnung**

β-Mercaptoethanol

Dithiothreitol

LPS-Test Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000

PAA-SDS-Tris-Glycin-Elektrophoreseigel (10 – 20%)

Proteaseinhibitor Complete

Protein-Längenstandard Benchmark Protein Ladder

Rinderserumalbumin (BSA)

Tween 20

Whatman-Filterpapier

##### **Hersteller**

*Sigma*, Deisenhofen

*Sigma*, Deisenhofen

*Cambrex*, East Rutherford, USA

*Anamed*, Darmstadt-Arheilgen

*Roche*, Mannheim

*Invitrogen*, Karlsruhe

*Serva Feinbiochemika*, Heidelberg

*Sigma*, Deisenhofen

*Schleicher & Schuell*, Dassel

### 2.1.5.2 Puffer und verwendete Stammlösungen

#### SDS-PAGE: 10x Laufpuffer

31 g Tris

140 g Glycin

10 g SDS

Ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

#### SDS-PAGE: 5x Ladepuffer

50 mM Tris

2% SDS

5% Glycerin

10% Dithiothreitol

einige Tropfen Bromphenolblau

pH 6,8

#### Silberfärbung: Entwickler

6 g Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

5 µl Natriumthiosulfat-Stammlösung

50 µl Formaldehyd (37%)

120 ml dH<sub>2</sub>O

#### Silberfärbung: Fixierer

50 ml Methanol

12 ml Eisessig

38 ml dH<sub>2</sub>O

#### Silberfärbung: Imprägnierlösung

200 mg Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>)

75 µl Formaldehyd (37%)

100 ml dH<sub>2</sub>O



Silberfärbung: Natriumthiosulfat-Stammlösung430 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )5 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ Silberfärbung: Sensibilisierungslösung150  $\mu\text{l}$  Natriumthiosulfat-Stammlösungad 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ Silberfärbung: Waschpuffer

50% Ethanol

50%  $\text{dH}_2\text{O}$ 10x PBS (Phosphate Buffered Saline)80 g Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )2 g Kaliumchlorid ( $\text{KCl}$ )14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )ad 1 l  $\text{dH}_2\text{O}$ 

pH 7,4

Sterilisation im Autoklav

**2.1.6 Material für zellbiologische Arbeiten****2.1.6.1 Agenzien****Bezeichnung**

Dimethylsulfoxid

Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium)

Fötale Kälberserum (FCS)

Gentamicin-Lösung

Gewebelysepuffer DirectPCR Lysis (Tail)

Incidin Liquid

L-Glutamin

**Hersteller***Sigma*, Deisenhofen*PAN Biotech GmbH*, Frankfurt*Sigma*, Deisenhofen*PAA*, Pasching, Österreich*peqLab*, Erlangen*Ecolab*, Düsseldorf*PAA*, Pasching, Österreich

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Mausserum	<i>DAKO</i> , Glostrup, Dänemark
Proteinfreies Zellkulturmedium PFHM-II	<i>Invitrogen</i> , Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	<i>Serva Feinbiochemika</i> , Heidelberg
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	<i>PAA</i> , Pasching, Österreich
Trypanblau	<i>Sigma</i> , Deisenhofen
Zellpermeabilisierungs- und Fixierungsagens BD Cytotfix / Cytoperm	<i>BD Biosciences Pharmingen</i> , San Diego, USA

### 2.1.6.2 Kulturmedien, Puffer und verwendete Stammlösungen

#### Cohn-II-Stammlösung

10 mg / ml in PBS

#### Einfriermedium (RPMI)

- 50% FCS
- 40% RPMI mit 10% FCS
- 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

#### Erythrozytenlyse-Puffer

- 10% 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)
- 90% 0,16 M Ammoniumchlorid

#### FACS-Puffer

- 1% FCS
- 0,1% Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) in PBS

#### Fötale Kälberserum

Inkubation bei 56°C für 45 min. zur Komplementinaktivierung

MACS-Puffer

2 mM EDTA

0,5% BSA in 1x PBS

pH 7,2 (sterilfiltriert und entgast)

RPMI 10% FCS (Vollmedium)

500 ml RPMI 1640

50 ml FCS

5 ml Glutamin (200 mM)

2,5 ml Gentamicin (10 mg / ml)

Trypanblau-Lösung

2 mg in 100 ml PBS

**2.1.7 Antikörper**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>
anti-CD4-APC	RM4-5	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-CD4-V500	RM4-5	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-CD8-PerCP-Cy5.5	53-6.7	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-B220-APC	RA3-6B2	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-CD11b-PerCP-Cy5.5	M1/70	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-CD25-PE	3C7	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-CD62L-PE	MEL-14	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-CD69-PE	H1.2F3	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-BTLA-PE	6F7	<i>eBioscience (Natutec)</i> , Frankfurt
anti-HVEM-PE	LH1	<i>eBioscience (Natutec)</i> , Frankfurt
anti-CD45.1-PerCP	A20	<i>Biolegend</i> , Fell
anti-IL-2-APC	JES6-5H4	<i>eBioscience (Natutec)</i> , Frankfurt
anti-IL-4-APC	11B11	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-IFN- $\gamma$ -APC	XMG1.2	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg
anti-TNF- $\alpha$ -APC	MP6-XT22	<i>Becton Dickinson</i> , Heidelberg

### 2.1.8 Malariastämme

**Bezeichnung***Plasmodium berghei* ANKA*Plasmodium berghei* NK65*Plasmodium yoelii* 17NL**Herkunft**

BNI, Hamburg

BNI, Hamburg

BNI, Hamburg

### 2.1.9 Mausstämme

**Bezeichnung***Mus musculus* C57Bl/6*Mus musculus* C57Bl/6 BTLA-KO*Mus musculus* C57Bl/6 HVEM-KO*Mus musculus* C57Bl/6 RAG1-KO*Mus musculus* C57Bl/6 J<sub>H</sub>T**Herkunft**

Charles River, Sulzfeld

JAX<sup>®</sup> Mice and Services, Bar Harbor, USA

Prof. Klaus Pfeffer, Düsseldorf

UKE, Hamburg

PD Dr. Minka Breloer, BNI, Hamburg

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Aufreinigung genomischer DNA aus Gewebeproben**

Um nach der Generierung von RAG1-BTLA-KO Mäusen die Abwesenheit des wildtyp-BTLA-Allels auf genomischer Ebene nachzuweisen, musste genomische DNA der Mäuse gewonnen werden. Hierzu wurde ein etwa 5 mm langes Gewebestück vom Schwanz einer Maus in 200 µl des DirectPCR® Lysis Reagent (Tail), dem zuvor 0,3 mg / ml Proteinase K hinzugegeben wurde, über Nacht bei 55°C inkubiert. In einer nachfolgenden PCR kann 1 µl dieser DNA-haltigen Lösung direkt eingesetzt werden.

#### **2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine enzymatische Methode, die es erlaubt, DNA sequenzspezifisch in wiederholten Zyklen zu replizieren und so definierte Sequenzen exponentiell zu vermehren (Mullis, Faloona et al. 1986).

Als Matrize dient ein DNA-Strang, der als Bestandteil eines DNA-Doppelstranges oder DNA-RNA-Hybrides aus reverser Transkription vorliegen kann. Im ersten Schritt werden doppelsträngige Matrizen durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Nach Abkühlung auf eine primersequenzabhängige Annealing-Temperatur kann sich ein komplementärer Oligonukleotid-Primer an die Matrize anlagern, woraufhin bei einer Elongationstemperatur von zumeist 72°C eine hitzestabile DNA-Polymerase die restlichen Nukleotide des neu zu synthetisierenden Stranges in 5'→3'-Richtung auffüllt, womit der erste Zyklus abgeschlossen ist. Nach erneuter Denaturierung kann die Synthese beider Stränge unter Verwendung des jeweils komplementären Stranges als Matrize und des jeweils geeigneten Primers erfolgen. Mit jedem Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation kann so die Anzahl der gewünschten DNA-Stränge verdoppelt werden. Als DNA-Polymerase kam die Taq-DNA-Polymerase (*MBI Fermentas*) zum Einsatz. Da es sich bei der PCR um eine äußerst sensitive Methode handelt, wurden zur Vermeidung von Kontaminationen ausschließlich kontaminationsfreie Einmal-Reaktionsgefäße sowie gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Um etwaige Kontaminationen zu erkennen, wurden außerdem als Negativkontrolle immer auch PCR-Reaktionen ohne Zugabe von Template-DNA durchgeführt. Die PCR wurde

eingesetzt, um nach der Generierung von RAG1-BTLA-KO Mäusen die Abwesenheit des wildtyp-BTLA-Allels auf genomischer Ebene nachzuweisen. In der BTLA-defizienten Maus ist das Exon 4 von BTLA durch eine nichtfunktionelle Sequenz ersetzt. Ein Nachweis der Abwesenheit von Exon 4 belegt daher die Abwesenheit funktionellen BTLAs. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich Exon 1 von BTLA, das sowohl in der BTLA-defizienten, als auch -suffizienten Maus vorhanden ist, durch PCR amplifiziert. Dies geschah in getrennten Reaktionsansätzen, wurde probeweise jedoch auch erfolgreich mit beiden Primerpaaren in einem Reaktionsansatz durchgeführt (Tab. 1). Hierbei sollten die Primer allerdings wie im getrennten Ansatz in Endkonzentrationen von 1  $\mu$ M eingesetzt werden.

Ansatz mit einem Primerpaar		Ansatz mit zwei Primerpaaren (Duplex)	
Template-DNA-Lösung:	1 $\mu$ l	Template-DNA-Lösung:	1 $\mu$ l
forward-Primer (10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l	forward-Primer 1 (10 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l
reverse-Primer (10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l	reverse-Primer 1 (10 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l
10x Taq-Puffer	2,5 $\mu$ l	forward-Primer 2 (10 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 $\mu$ l	reverse-Primer 2 (10 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l
dNTP-Lösung (2 mM)	2,5 $\mu$ l	10x Taq-Puffer	2,5 $\mu$ l
Taq-DNA-Polymerase (5 U / $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	11,3 $\mu$ l	dNTP-Lösung (2 mM)	2,5 $\mu$ l
		Taq-DNA-Polymerase (5 U / $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
		ddH <sub>2</sub> O	11,3 $\mu$ l

**Tab. 1: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die PCR zum Nachweis des wildtyp-Allels von BTLA**

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler Px2 (*Thermo Scientific*) in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Tab. 2).

initiale Denaturierung	180 s	95°C	1x
Denaturierung	30 s	95°C	33x
Primer-Annealing	60 s	55°C	
Elongation	60 s	72°C	
Vervollständigung unvollständiger Amplifikate	600 s	72°C	1x

**Tab. 2: PCR-Programm zum Nachweis des wildtyp-Allels von BTLA**

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im Anschluss durch Agarose-Gelelektrophorese.

### 2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Separation von DNA-Fragmenten entsprechend ihres Molekulargewichts. Die DNA-Fragmente werden aufgrund ihrer negativen Ladung entlang einer angelegten Spannung in Richtung der Anode beschleunigt. Dadurch, dass die Wanderung der Moleküle in einer Agarose-Matrix erfolgt, die die DNA-Fragmente abhängig von ihrer Länge unterschiedlich schnell durchqueren können, kommt es zu der gewünschten Auftrennung. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum negativen dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts der DNA-Fragmente. Um die Länge der aufgetrennten DNA-Fragmente quantifizieren zu können, erfolgt parallel die Auftrennung eines Längenstandards mit DNA-Fragmenten bekannter Länge („DNA-Längenstandard 100 bp DNA Ladder plus“, *MBI Fermentas*). Die Porengröße der Agarose-Matrix ist ausschlaggebend für Wanderungseigenschaften der DNA-Fragmente und kann durch Variation des Masseanteils der Agarose am Agarosegel beeinflusst werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Agarosegele mit einem Agarose-Masseanteil von 1% verwendet. Als Gel- sowie Laufpuffer kam TBE-Puffer, welcher höhere Spannungen und somit kürzere Laufzeiten als TAE-Puffer ermöglicht, zum Einsatz. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg / ml), einem UV-aktiven Farbstoff, der in die DNA-

Doppelhelix interkaliert, kann die DNA im Agarosegel durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Agarosegele wurden zur Dokumentation fotografiert.

## 2.2.2 Proteinchemische Methoden

### 2.2.2.1 Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberstand

Die Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberstand erfolgte durch Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Dialyse. Hierbei wurde dem Zellkulturüberstand bei 4°C solange unter Rühren Ammoniumsulfat zugesetzt, bis dieser zu etwa 65% gesättigt war (390 g / l). Die Zugabe erfolgte langsam innerhalb einer bis zwei Stunden, um Konzentrationsmaxima im Fällungsansatz zu vermeiden. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C gerührt, das Präzipitat für 30 min. bei 4°C mit 7000 G abzentrifugiert, in wenigen Milliliter PBS aufgenommen und anschließend dialysiert. Hierzu wurde die Lösung in gewässertem Dialyseschlauch eingeschlossen und so mindestens dreimal über 4 Stunden in jeweils 5 l frischem PBS gerührt. Anschließend wurde die Reinheit der Antikörperlösung durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung überprüft, LPS-Kontamination ausgeschlossen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### 2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration einer Proteinlösung kann durch direkte photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 280 nm Wellenlänge, bei der die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, in geringerem Maße auch Phenylalanin absorbieren, bestimmt werden. Hierbei gilt die durch Warburg und Christian empirisch ermittelte Beziehung

$$\text{Proteinkonzentration [mg / ml]} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260} \text{ (Warburg 1941)}$$

Die Absorption bei 260 nm Wellenlänge ist dabei ein Maß für die Verunreinigung der Proteinlösung durch Nukleinsäuren. Der unterschiedliche Gehalt absorbierender Aminosäuren mit aromatischem Rest in verschiedenen Proteinen muss bei der Berechnung berücksichtigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konzentration von Immunglobulinlösungen bestimmt. Da bei Immunglobulinen der Anteil absorbierender Aminosäuren relativ gering ist, muss das Ergebnis der Berechnung durch Multiplikation mit dem Faktor 0,7 korrigiert werden.



### 2.2.2.3 LPS-Konzentrationsbestimmung

Trotz antibiotikahaltiger Zellkulturmedien kann eine Kontamination antikörperproduzierender Hybridomzelllinien mit Bakterien nie ganz ausgeschlossen werden, so dass sich nach der Aufreinigung der Antikörper bakterielle Lipopolysaccharide in der Lösung befinden können. Da LPS bereits in Konzentrationen ab 100 pg/ml starke inflammatorische Wirkung besitzt, könnte es beim Einsatz der Antikörperlösungen in nachfolgenden Experimenten eine LPS-bedingte Aktivierung der untersuchten Zellen verursachen, was die Validität der Versuchsergebnisse beeinträchtigen würde. Die LPS-Konzentration der Proteinlösungen wurde daher unter Verwendung des Limulus-Amöbozytenlysat-Tests „QCL-1000“ (Cambrex) nach Angaben des Herstellers bestimmt. LPS bewirkt dabei konzentrationsabhängig die Aktivierung eines Proenzym aus dem Lysat der Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus*. Die Aktivität des Enzyms als Maß der LPS-Konzentration führt durch Umsatz eines chromogenen Substrats zu erhöhter Absorption bei 405 nm Wellenlänge, die photometrisch bestimmt wird. Durch Vergleich mit LPS-Lösungen bekannter Konzentration wird die LPS-Konzentration der untersuchten Lösungen berechnet.

### 2.2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Identifikation der Proteinbestandteile einer Proteinlösung wurden diese durch SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies erfordert die Denaturierung der Proteine durch Bindung von SDS, welches gleichzeitig zu einer molekulargewichtsabhängigen negativen Ladung des Komplexes führt, so dass die Proteine durch das angelegte elektrische Feld zur Anode beschleunigt werden. Die Auftrennung erfolgt dabei durch den molekulargewichtsabhängigen Widerstand beim Durchqueren der Polyacrylamidmatrix. Es wurden SDS-Tris-Glycin-Gradientengele von 10-20% Acrylamidanteil (Anamed) verwendet. Um die dimeren Immunglobuline durch Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücken zu vereinzeln, wurden sie 10 min. in DTT-haltigem Beladungspuffer auf 95°C erhitzt und nach dem Abkühlen in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandards dienten für die anschließende Silberfärbung 1,5 µl „Benchmark Protein Ladder“ (Invitrogen). Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V über 120 min. in Tris-Glycin-Laufpuffer.

### 2.2.2.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Nach SDS-PAGE können die aufgetrennten Proteine im PAA-Gel durch Färbung mit metallischem Silber als schwarzbraun gefärbte Banden sichtbar gemacht werden. Der Färbeprozess beruht auf der Komplexbildung von Silberionen durch Aminosäureseitenketten der Proteine unter Reduktion zu metallischem Silber im Imprägnierungsschritt der Färbung. Diese Silberatome dienen im Entwicklungsschritt als Keime für die schnelle Reduktion weiterer Silberionen zu metallischem Silber, was zur ortsselektiven Färbung der Proteinbanden führt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei ca. 50 pg Protein. Die Proteine wurden nach der Elektrophorese durch 60-minütige Inkubation in Fixierlösung im Gel immobilisiert und nach drei 30-minütigen Waschschritten in Waschpuffer eine Minute in Sensibilisierungslösung gelegt. Nach drei Waschschritten in ddH<sub>2</sub>O für jeweils 20 s wurde das Gel 20 min. in Imprägnierlösung gelegt und erneut zweimal je 20 s in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Gel ca. 3 min. bis zur gewünschten Färbungsintensität in Entwicklerlösung inkubiert. Der Entwicklungsvorgang wurde nach zweimaligem je 20-sekündigem Waschen in ddH<sub>2</sub>O durch Überführung des Gels in Fixierlösung beendet. Anschließend wurde das Gel in ddH<sub>2</sub>O gewässert und durch Scannen digitalisiert.

## 2.2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Kultur eukaryotischer Hybridomzelllinien zur Antikörperproduktion

Zur spezifischen Zeldepletion bzw. Ligation von Rezeptoren *in vivo* war die Produktion von Antikörpern im Milligramm-Maßstab erforderlich. Dies geschieht durch Kultur von Hybridomzelllinien, die einen monoklonalen Antikörper einer bestimmten Spezifität in das Zellkulturmedium sezernieren. Aus dem Zellkulturüberstand kann der Antikörper anschließend affinitätschromatographisch aufgereinigt oder ausgefällt werden. Da die Ausbeute bei der Aufreinigung durch Fällung deutlich höher ist, wurde diese Methode verwendet. Die Fällung ist jedoch nur bedingt proteinspezifisch, so dass bei Verwendung von serumhaltigem Zellkulturmedium eine Kontamination der Antikörperlösung mit Serumproteinen zu erwarten ist. Aus diesem Grund erfolgte die Zellkultur unter Verwendung proteinfreien Zellkulturmediums (PFHM-II). Die Hybridomzellen wurden in diesem Medium durch regelmäßige Passage auf 1 l Endvolumen expandiert und in einer Rollerflasche unter

oszillierendem Rollen kultiviert, solange die Zellen mikroskopisch vital erschienen. Nachdem der Zellkulturüberstand durch Zentrifugation von Zellen und Zellresten getrennt worden war, wurden die enthaltenen Antikörper durch Ammoniumsulfatfällung aufgereinigt.

### **2.2.3.2 Cryokonservierung eukaryotischer Zellen**

Zur Konservierung eukaryotischer Zellen über längere Zeit wurden sie bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen pelletiert, in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann 24 h bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Bei Bedarf wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, bei Raumtemperatur aufgetaut und in 10 ml Zellkulturmedium gewaschen. Danach wurden die Zellen in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturplatte überführt. Nach 12 Stunden wurden die Zellen 1:1 mit frischem Zellkulturmedium passagiert.

### **2.2.3.3 Präparation muriner Milzzellen**

Zur Isolation muriner Milzzellen wurden die Tiere durch Asphyxiation in  $\text{CO}_2$  getötet und äußerlich desinfiziert. Unter der Sterilbank wurde die Milz entnommen und zu 10 ml Zellkulturmedium in eine sterile Petrischale überführt. Die Milz wurde mit einem Spitzenstempel durch ein Zellsieb ( $0,2 \mu\text{m}$ ) gerieben. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen. Die Erythrozytenlyse wurde nach 5 min. durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium beendet. Nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml Zellkulturmedium wurde die Zellkonzentration bestimmt.

### **2.2.3.4 Zellzählung**

Die Bestimmung der Zellkonzentration einer Zellsuspension erfolgte nach entsprechender Verdünnung durch Auszählen der in einer Neubauer-Zählkammer befindlichen Zellen unter dem Mikroskop. Ein optisch markiertes Großquadrat beinhaltet dabei  $0,1 \mu\text{l}$  Zellsuspension, so dass die Anzahl der in vier Großquadraten befindlichen Zellen mit 2500 multipliziert wurde, um die Zellzahl pro ml der Zellsuspension zu erhalten. Sollte zudem der Anteil an vitalen Zellen ermittelt werden, wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Dieser Farbstoff kann die Zellmembran toter Zellen, nicht jedoch die vitaler Zellen durchdringen und färbt dadurch selektiv tote Zellen blau.

### 2.2.3.5 Durchflusszytometrische Analyse

Bei durchflusszytometrischen Messungen wird eine Zellsuspension langsam in den laminaren Strom eines Transportmediums injiziert, wodurch die Zellen vereinzelt in eine Detektionskammer geleitet werden. Dort wird die von ihrer Größe und Granularität abhängige Streuung und Reflektion eines Laserstrahls gemessen, was eine Zuordnung einzelner Zellen zu einer Zellpopulation anhand dieser Parameter zulässt. Zusätzlich können die Zellen vor der Messung mittels fluorochromgekoppelten, oberflächenproteinspezifischen Antikörpern gefärbt werden, so dass durch Messung der Fluoreszenz die Expression der betreffenden Oberflächenmarker auf der jeweils untersuchten Zelle festgestellt werden kann. Vor der Färbung von Zelloberflächenproteinen erfolgte eine mindestens 20minütige Vorinkubation der Zellen in 50 µl Fc-Block. Hierbei handelt es sich um den Zellkulturüberstand einer Hybridomzelllinie, die monoklonale Antikörper gegen Ketten des murinen Fcγ-Rezeptors produziert. So wird eine oberflächenproteinunspezifische Bindung der zur anschließenden Färbung verwendeten Antikörper an Fcγ-Rezeptor-exprimierende Zellen verhindert. Anschließend wurden die in 50 µl Fc-Block gelösten fluorochromgekoppelten Antikörper hinzugegeben und der Ansatz mindestens 45 min. auf Eis inkubiert. Nach Abschluss der Färbung wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen und dann durchflusszytometrisch analysiert. Unspezifische Bindung fluorochromgekoppelter Antikörper an die untersuchten Zellen wurde durch Untersuchung von Zellen, die mit einem fluorochromgekoppelten Antikörper gleichen Isotyps aber irrelevanter Spezifität gefärbt wurden, ausgeschlossen.

Zur Färbung intrazellulärer Moleküle müssen die Zellen zuvor permeabilisiert werden. Dies geschah durch zehnminütige Inkubation der Zellen im Zellpermeabilisierungsgens BD Cytifix / Cytoperm (*BD Biosciences Pharmingen*) auf Eis. Anschließend wurden die Zellen einmal in 1x Cytoperm / Wash-Puffer gewaschen, 15 min. im selben Puffer auf Eis inkubiert, pelletiert und dann mindestens 60 min. auf Eis mit in 100 µl Cytoperm / Wash-Puffer gelöstem fluorochromgekoppeltem Antikörper gefärbt. Nach einmaligem Waschen in Cytoperm / Wash-Puffer und einmaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

### **2.2.3.6 Messung von Zytokinkonzentrationen durch Cytometric Bead Array (CBA)**

Das Prinzip der Cytometric Bead Array-Analyse basiert auf der spezifischen Immobilisierung des Analyten auf Beads, die mit einem für den Analyten spezifischen Antikörper beschichtet sind. Nach Inkubation mit einem zweiten analytspezifischen, fluorophorgekoppelten Detektionsantikörper kann die Menge des immobilisierten Analyten auf den Beads durch Messung der Fluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert und durch Vergleich mit Messansätzen bekannter Analytenkonzentration quantifiziert werden. Dadurch, dass Beadpopulationen unterschiedlicher Analytenspezifität durchflusszytometrisch abgegrenzt werden können, kann der Nachweis unterschiedlicher Analyten gleichzeitig in einem Ansatz durchgeführt werden. Die Verwendung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in jeweils 50 µl unverdünntem Mausserum.

### **2.2.3.7 Magnetische Aufreinigung parasitierter Erythrozyten**

Zur Quantifizierung von *Plasmodium*-spezifischen Antikörpern in Mausseren mussten *Plasmodium yoelii*-parasitierte Erythrozyten aus dem Blut infizierter J<sub>H</sub>T-Mäuse aufgereinigt werden. Im Verlauf der erythrozytären Entwicklung des Parasiten kommt es zur Akkumulation des Malariapigments Hämozoin. Da dieses paramagnetisch ist, werden parasitierte Erythrozyten, die bereits genügend Hämozoin enthalten (späte Trophoziten und Schizonten), beim Fluß durch ein magnetisches Feld zurückgehalten, während Erythrozyten, die Ringstadien oder keine Parasiten enthalten, das Feld passieren können (Paul, Roath et al. 1981; Ribaut, Berry et al. 2008). 500 µl Blut einer infizierten J<sub>H</sub>T-Maus mit 20% Parasitämie wurde mit 1500 µl MACS-Puffer verdünnt und über eine MACS-Säule (LS) im magnetischen Feld gegeben. Nach dreimaligem Spülen der Säule mit jeweils 3 ml MACS-Puffer wurden die parasitierten Erythrozyten mit 5 ml MACS-Puffer außerhalb des magnetischen Feldes eluiert.

### **2.2.3.8 Quantifizierung der Antikörperbindung an parasitierte Erythrozyten**

$6 \cdot 10^4$  Antikörper-naive parasitierte Erythrozyten wurden für 2 Stunden bei 4°C in FACS-Röhrchen mit 30 µl Serum *P. yoelii* NL-infizierter Mäuse inkubiert. Nach Waschen mit 2 ml MACS-Puffer wurden sie für 90 min. mit 1:100 verdünntem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Nach erneutem Waschen mit 2 ml MACS-Puffer wurden die

Erythrozyten für eine Stunde mit APC-konjugiertem Streptavidin (1:500) und FITC-konjugiertem anti-CD45-Antikörper (1:500) in 100 µl MACS-Puffer inkubiert und nach abschließendem Waschen durchflusszytometrisch analysiert.

## 2.2.4 Tierversuche

### 2.2.4.1 Herstellung knochenmarkchimärer Mäuse

Durch  $\gamma$ -Bestrahlung von Mäusen mit einer ausreichenden Strahlendosis wird ihr blutbildendes System zerstört. Dieses kann durch Transfer von Knochenmark unbestrahlter Mäuse rekonstituiert werden. Je nach Wahl des Spendermausgenotyps bilden die Empfängermause anschließend Leukozyten des gewünschten Genotyps. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Technik verwendet, um gemischt knochenmarkchimäre Mäuse zu generieren, deren B- oder T-Zellen jeweils zur Hälfte BTLA-defizient und –suffizient sind. Die 6 Wochen alten Empfängermause erhielten hierzu eine Dosis von 9 Gray aus einer Cäsiumquelle ( $^{137}\text{C}$ ). Einen Tag vor der Bestrahlung wurde das Futter aus den Käfigen entfernt. Einen Tag nach der Bestrahlung wurden  $6 \cdot 10^6$  aus den Spendermäusen präparierte und gemischte Knochenmarkzellen i.v. transferiert und das Futter zurück gegeben. Den Mäusen wurde 1 Woche vor der Bestrahlung bis 7 Wochen nach Transfer das Antibiotikum Baytril (0,5 % v/v) im Trinkwasser verabreicht, um Infektionen zu vermeiden. Die Mäuse wurden 10 Wochen nach dem Transfer für Versuche verwendet.

### 2.2.4.2 Infektion von Mäusen mit unterschiedlichen Plasmodium-Stämmen

Die Infektion erfolgte durch intraperitoneale Injektion von  $2 \cdot 10^6$  *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten, welche als Stabilat bei  $-196^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff konserviert waren und vor der Injektion in 200 µl sterilem PBS aufgenommen wurden. Die Parasitämie wurde nach Giemsa-Färbung von Blutaussstrichen mikroskopisch bestimmt.

### 2.2.4.3 Depletion von $\text{CD4}^+$ T-Zellen und Zytokinen durch Antikörper

Die Depletion von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen erfolgte durch intraperitoneale Applikation von jeweils 300 µg des anti-CD4-Antikörpers (Klon GK1.5) an den Tagen -3, 0, 3, 9 und 15 relativ zum Zeitpunkt der Infektion. Der Erfolg der Depletion wurde alle 3 Tage nach Infektion verifiziert, indem Blutlymphozyten mit 0,25 µg FITC-konjugiertem anti-CD4-Antikörper (Klon RM4-5)

inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert wurden. TNF- $\alpha$  wurde durch intraperitoneale Injektion von jeweils 500  $\mu\text{g}$  anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper (Klon V1Q) an den Tagen 0, 6 und 12 nach Infektion depletiert. IFN- $\gamma$  wurde durch intraperitoneale Injektion von jeweils 200  $\mu\text{g}$  anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper (Klon XMG1.2) an den Tagen -1, 3, 6, 9, 12 und 15 nach Infektion depletiert.

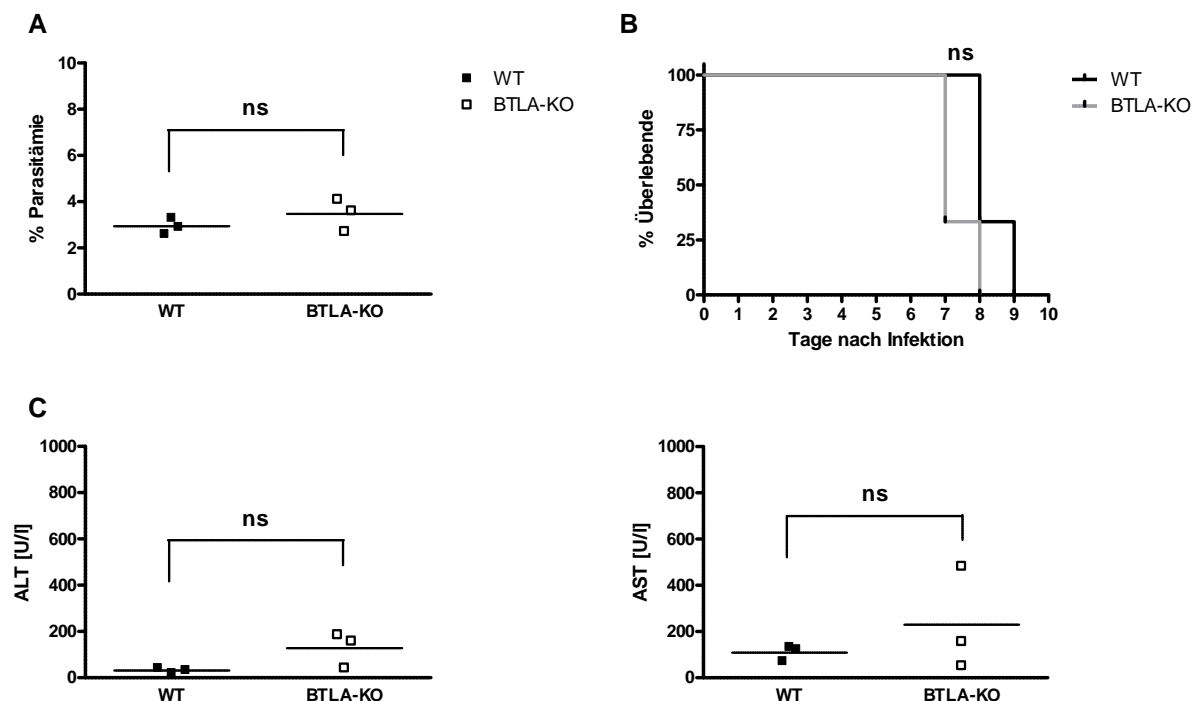
#### **2.2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Lebertransaminasen im Blut**

Blut wurde mittels Lithium-Heparinat-beschichteter Kapillaren aus der Schwanzspitze entnommen. Anschließend wurde es unverdünnt oder in PBS verdünnt auf die Messstreifen des Reflotron Plus Analysesystems (*Roche*) gegeben und den Herstellerangaben gemäß gemessen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen *P. berghei* ANKA

Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *Plasmodium berghei* ANKA dient als experimentelles Modell zur Untersuchung der zerebralen Malaria (de Souza, Hafalla et al. 2010). Vorangegangene Untersuchungen zur Beteiligung von BTLA an der Regulation der Immunantwort gegen *P. berghei* ANKA ergaben, dass eine Ligandierung des Moleküls während der Infektion durch den monoklonalen anti-BTLA-Antikörper 6A6 die Inzidenz zerebraler Malaria bei gleichbleibender Parasitämie von etwa 80% auf 15% reduziert (Lepeniev, Pfeffer et al. 2007). Dieser Effekt ist auf eine verminderte Sequestration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn zurückzuführen. Die Auswirkung fehlender Signale über BTLA auf die Immunantwort gegen *P. berghei* ANKA und die einhergehende Immunpathologie sollten durch Infektion von BTLA-defizienten C57BL/6-Mäusen untersucht werden. Da es sich bei BTLA um ein koinhibitorisches Molekül handelt, sollte überprüft werden, ob seine Abwesenheit die



**Abb. 4: Keine Anzeichen von Beeinflussung einer *P. berghei* ANKA-Infektion durch BTLA-Defizienz**

Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. berghei* ANKA infizierten Erythrozyten infiziert und über den Verlauf der Infektion auf neurologische Symptome untersucht. An Tag 7 n.i. wurde die Parasitämie bestimmt (A). Beim Auftreten zerebraler Malaria wurden die Mäuse getötet (B) und die Konzentration von Lebertransaminasen im Blut bestimmt (C). Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-test (unpaired, two-tailed) analysiert.



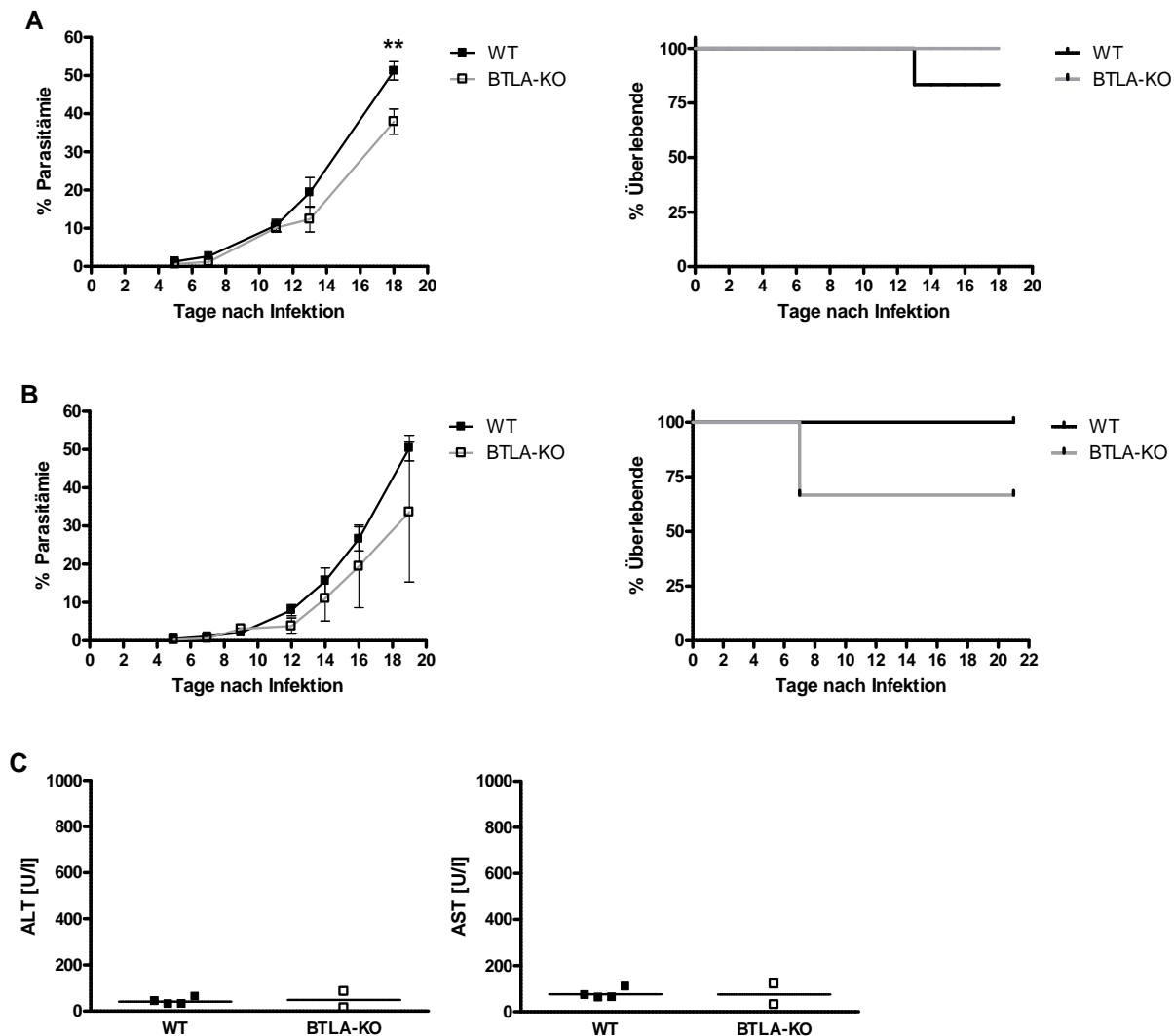
Immunantwort verbessert bzw. die Immunpathologie verschlimmert. Es zeigte sich, dass die Parasitämie durch Abwesenheit von BTLA nicht verändert wurde (Abb. 4 **A**). Es fanden sich demnach keine Anzeichen für eine Beeinflussung antiplasmodialer Mechanismen durch Signale, die über BTLA vermittelt werden. Alle infizierten Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse starben im für zerebrale Malaria charakteristischen Zeitfenster zwischen Tag 7 und Tag 9 nach der Infektion mit neurologischen Symptomen (Abb. 4 **B**). Der Nachweis einer erhöhten Inzidenz zerebraler Malaria durch Abwesenheit von BTLA ist in diesem Modell somit nicht möglich, da selbst in Anwesenheit von BTLA alle Mäuse an zerebraler Malaria versterben. Da die Abwesenheit eines koinhibitorischen Moleküls jedoch auch die Entwicklung von Immunpathologie in anderen Organen begünstigen kann, wurde 7 Tage nach Infektion die Konzentration der Transaminasen ALT und AST im Blut bestimmt. Überreaktive Immunzellen migrieren präferentiell in die Leber und beschädigen dort das Leberparenchym (Jacobs, Plate et al. 2004). Bei Beschädigung dieses Gewebes werden die weitgehend leberspezifischen Transaminasen freigesetzt und geben daher Aufschluss über Existenz und Ausmaß eventueller Immunpathologie in der Leber. Signifikant erhöhte Blutkonzentrationen der Transaminasen wurden während der Infektion nicht gefunden (Abb. 4 **C**). Es fanden sich somit keinerlei Anzeichen für immunpathologische Auswirkungen der BTLA-Defizienz.

### ***3.2 Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen P. berghei NK65***

Da es im *P. berghei* ANKA-Modell bei Verwendung von C57BL/6-Mäusen bereits nach wenigen Tagen zu zerebraler Malaria kommt, ist es für Untersuchungen der Regulation der Immunantwort über einen längeren Zeitraum ungeeignet. Der Erreger *Plasmodium berghei* NK65 verursacht trotz seiner engen Verwandtschaft mit *P. berghei* ANKA keine zerebrale Malaria. Die Parasitämie steigt langsam und kontinuierlich an, bis sie nach etwa 3 Wochen ein letales Ausmaß erreicht.

Während der Infektion von BTLA-defizienten Mäusen mit diesem Plasmodienstamm zeigte sich eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verringerte Parasitämie in der Endphase der Infektion (Abb. 5 **A** und **B**). Aufgrund der geringen Anzahl von BTLA-defizienten Mäusen im zweiten Versuch konnte der Unterschied nur im ersten Versuch statistisch signifikant belegt werden. Es fanden sich hingegen keine Unterschiede bezüglich der sporadisch auftretenden

frühen Letalität der Infektion. Die an Tag 7 nach Infektion durchgeführte Analyse der Lebertransaminasen-Konzentration im Blut ergab keine erhöhten Werte in der Gruppe der BTLA-defizienten Mäuse, so dass systemische Immunpathologie durch Abwesenheit von BTLA auch während einer *P. berghei* NK65-Infektion ausgeschlossen werden kann (Abb. 5 C).



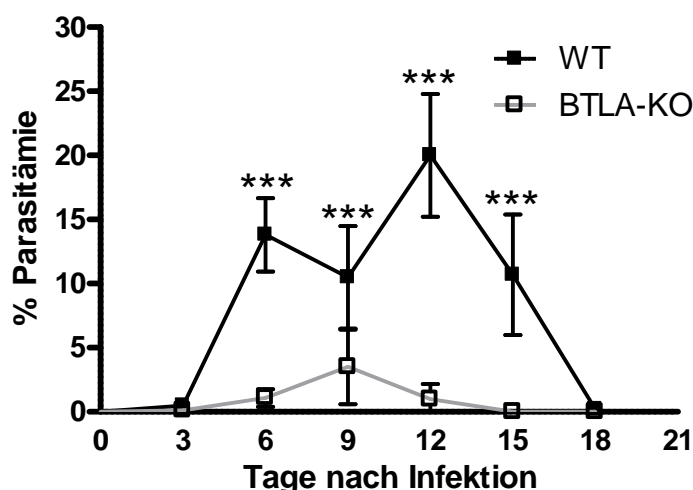
**Abb. 5: BTLA-Defizienz bewirkt verringerte Parasitämie in der Endphase der Infektion mit *P. berghei* NK65**

Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. berghei* NK65 infizierten Erythrozyten infiziert. Während des Verlaufs der Infektion wurde die Parasitämie bestimmt sowie das Überleben kontrolliert. Es sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente dargestellt (**A** und **B**). Beim zweiten Experiment wurde an Tag 7 n.I. zusätzlich die Konzentration von Lebertransaminasen im Blut bestimmt (**C**). Die statistische Signifikanz wurde mittels two-way ANOVA (repeated measures, mit Bonferroni post test) analysiert (BTLA-KO: n=5 / n=2, WT: n=4 / n=4). Mäuse, die während der Infektion starben, wurden bezüglich der Parasitämie und Enzymkonzentration nicht berücksichtigt.

### 3.3 Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL

In dieser Arbeit sollte die Beteiligung des Rezeptors BTLA an der Regulation der Immunantwort gegen die Blutphase der Malaria untersucht werden. BTLA wird von fast allen Leukozytenpopulationen exprimiert und kann daher prinzipiell alle Immunmechanismen, die von diesen Zellpopulationen ausgehen, modulieren. Um ein möglichst vollständiges Bild der immunmodulierenden Wirkung von BTLA während der Blutphase zu erhalten, ist daher ein Mausmodell ideal, in dem möglichst viele der im Menschen wirkenden antiplasmodialen Mechanismen an der Immunantwort beteiligt sind. Weiterhin sollte das Modellsystem Untersuchungen über die volle Dauer der Infektion bis zur vollständigen Beseitigung ermöglichen. Das Modellsystem der Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *P. yoelii* NL erfüllt diese Anforderungen vollständig und wurde daher für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *P. yoelii* NL verursacht eine zweiphasige Parasitämie. Etwa 5 Tage nach Infektion sind Parasiten im Blutausstrich detektierbar, ein bis zwei Tage später wird der erste Höhepunkt der Parasitämie erreicht. Nach einem zwischenzeitlichen Rückgang wird der Maximalwert der Parasitämie um den 12. Tag nach Infektion erreicht.



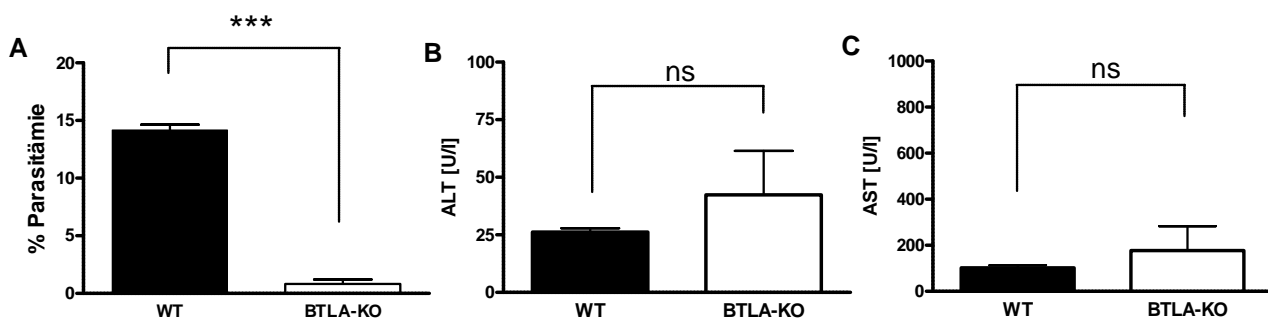
**Abb. 6: Verringerte Parasitämie und schnellere Beseitigung einer *P. yoelii* NL-Infektion in Abwesenheit von BTLA**

Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Während des Verlaufs der Infektion wurde die Parasitämie bestimmt und mittels two-way ANOVA (repeated measures, mit Bonferroni post test) auf statistische Signifikanz überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (n=5).

Anschließend wird die Parasitämie innerhalb von 6 bis 9 Tagen beseitigt.

Die Untersuchung von *P. yoelii* NL-infizierten BTLA-defizienten Mäusen ergab, dass die Parasitämie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen über den gesamten Verlauf der Infektion stark erniedrigt war. Damit einhergehend wurde die Infektion in BTLA-defizienten Mäusen etwa 3 bis 6 Tage früher vollständig beseitigt (Abb. 6).

Um zu untersuchen, ob die BTLA-Defizienz neben einer Verbesserung der Immunantwort auch das Auftreten von Immunpathologie bewirkt, wurden die Blutkonzentrationen der Lebertransaminasen ALT und AST 6 Tage nach Infektion bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt zeigen sich bereits deutliche Unterschiede in der Parasitämie, die vorteilhaften Auswirkungen der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort kommen bis zu diesem Zeitpunkt also bereits zum Tragen (Abb. 7 A). Dennoch waren keine erhöhten Konzentrationen der Transaminasen im Blut der BTLA-defizienten Mäuse messbar (Abb. 7 B und C). Die verbesserte Immunantwort wurde also nicht von deutlich sichtbaren immunpathologischen Prozessen begleitet.



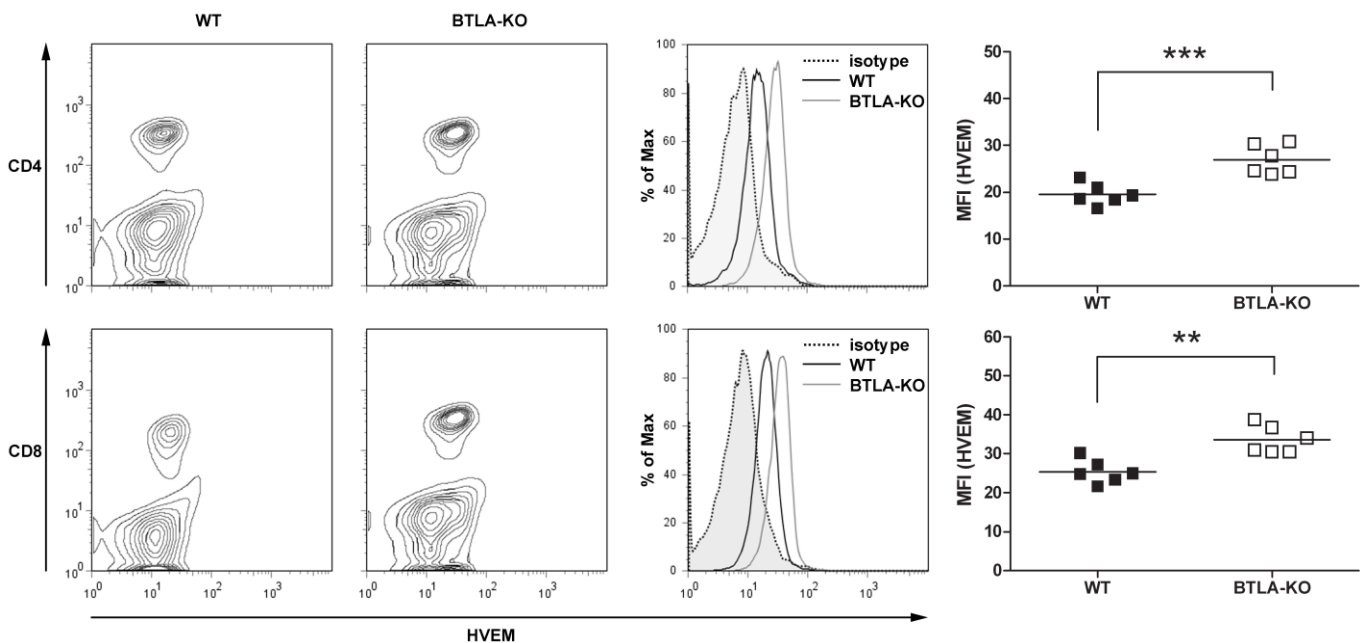
**Abb. 7: Keine Anzeichen von Immunpathologie in BTLA-defizienten Mäusen während einer *P. yoelii* NL-Infektion**

Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. An Tag 6 nach Infektion wurde die Parasitämie (A), sowie die Serumkonzentrationen der Lebertransaminasen ALT (B) und AST (C) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Signifikanz wurde unter Anwendung des Student's t-test (unpaired, two-tailed) analysiert (n=3).

### 3.3.1 BTLA-Defizienz bewirkt Überexpression des Liganden HVEM in T-Zellen.

BTLA ist Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerks von Zelloberflächenrezeptoren (Murphy und Murphy 2010). Zwar ist HVEM der einzige bekannte Ligand von BTLA, HVEM

selbst besitzt jedoch weitere Bindungspartner. Interaktion von HVEM mit diesen Molekülen kann ebenfalls koinhibitorische Signale auslösen, wie es nach Bindung an den Rezeptor CD160 der Fall ist (Cai, Anumanthan et al. 2008). Bindung von HVEM an den Rezeptor LIGHT hat jedoch kostimulatorische Signale zur Folge. Diese Interaktion bewirkt einerseits kostimulatorische Signale in Richtung der LIGHT-exprimierenden Zelle, andererseits erhält auch die HVEM-exprimierende Zelle nach Interaktion mit LIGHT ein kostimulatorisches Signal. Bei einer veränderten HVEM-Expression in BTLA-defizienten Mäusen wäre daher mit einer zusätzlichen Beeinflussung des regulatorischen Systems zu rechnen, die von einem direkten Einfluss der BTLA-Defizienz abzugrenzen wäre. Um eine Abweichung der HVEM-Expression in BTLA-defizienten Mäusen zu untersuchen, wurden Milzzellen von Wildtyp- und BTLA-KO-Mäusen mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 sowie HVEM gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich, dass in BTLA-defizienten Mäusen die HVEM-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen um 38% und die der CD8<sup>+</sup> T-Zellen um 32% erhöht ist (Abb. 8).

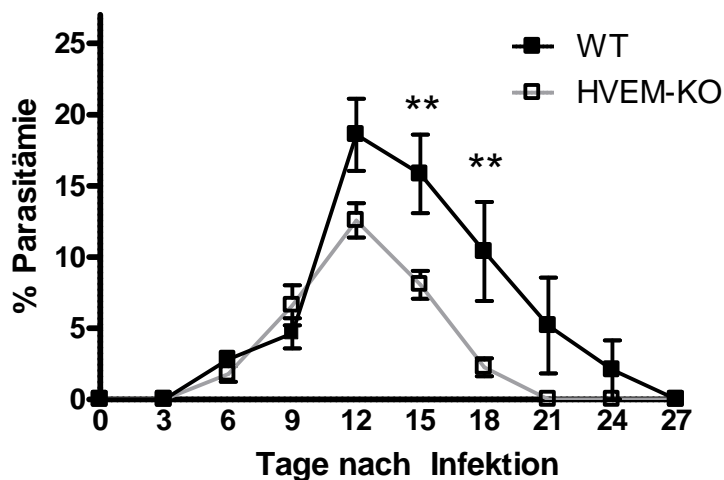


**Abb. 8: Die HVEM-Expression BTLA-defizienter T-Zellen ist erhöht**

Milzzellen nicht infizierter BTLA-KO und Wildtyp-Mäuse wurden mit PerCP-konjugiertem anti-CD8-, APC-konjugiertem anti-CD4-, und PE-konjugiertem anti-HVEM- bzw. Isotypkontrollantikörper inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Repräsentative Messergebnisse sind als Konturdiagramme (links) und Histogramme (mitte) dargestellt. Die Expression von HVEM auf T-Zellen von jeweils 6 Mäusen ist als Mittelwert der Fluoreszenzintensität dargestellt (rechts). Die statistische Signifikanz wurde unter Anwendung des Student's t-test (unpaired, two-tailed) analysiert.

### 3.3.2 Interaktion von HVEM mit anderen Liganden beeinflussen ebenfalls die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL

Die erhöhte HVEM-Expression von T-Zellen in Abwesenheit von BTLA könnte für die verbesserte Immunantwort in BTLA-defizienten Mäusen mitverantwortlich sein, wenn HVEM durch Interaktion mit anderen Liganden an der Regulation der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL beteiligt ist. Um eine Beteiligung anderer HVEM-Liganden an der



**Abb. 9: HVEM moduliert die Parasitämie durch Interaktion mit mehreren Liganden**

Wildtyp- und HVEM-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Während des Verlaufs der Infektion wurde die Parasitämie bestimmt und mittels two-way ANOVA (repeated measures, mit Bonferroni post test) auf statistische Signifikanz überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der kumulierten Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche ( $n=15$ ).

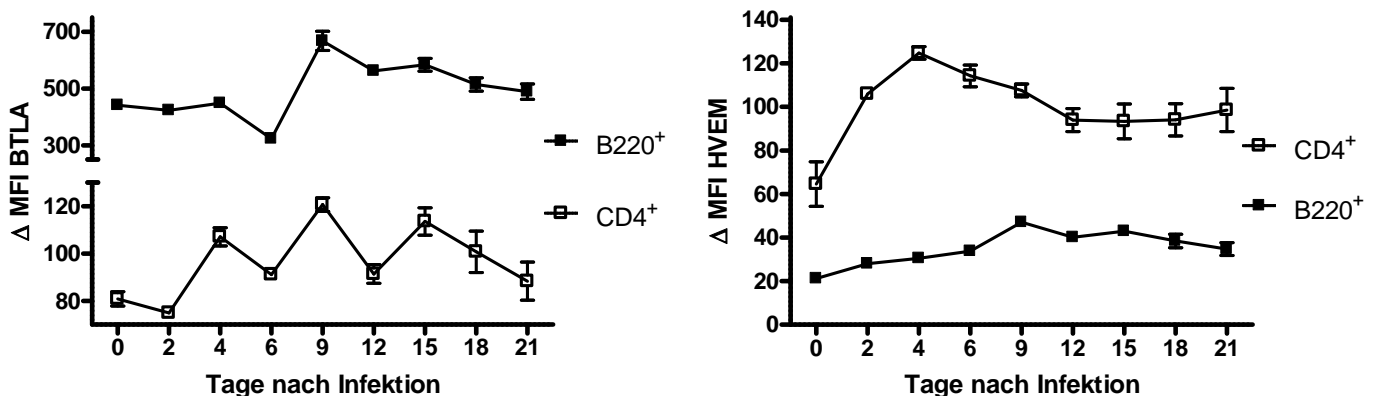
Immunregulation zu untersuchen, wurden HVEM-defiziente sowie Wildtyp-Mäuse mit *P. yoelii* NL infiziert und die Parasitämie über den gesamten Verlauf der Infektion analysiert. Es zeigte sich, dass die Parasitämie der HVEM-defizienten Mäuse in den ersten 12 Tagen des Infektionsverlaufs nicht von der Parasitämie von Wildtyp-Mäusen abwich (Abb. 9). Im Gegensatz zu BTLA-defizienten Mäusen war in dieser Phase der Infektion also keine Erniedrigung der Parasitämie festzustellen. In der zweiten Hälfte des Infektionsverlaufs war die Parasitämie HVEM-defizienter Mäuse jedoch signifikant niedriger als in Wildtyp-Mäusen und wurde 6 Tage früher vollständig beseitigt. In dieser Phase des Infektionsverlaufs hat die HVEM-Defizienz also vergleichbare Auswirkungen wie die Abwesenheit von BTLA in den vorangegangenen Versuchen.

### 3.3.3 Expression von BTLA und HVEM während der *P. yoelii* NL-Infektion

Sowohl BTLA als auch HVEM sind an der Regulation der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL beteiligt. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass BTLA nach Aktivierung von T-Zellen innerhalb kurzer Zeit hochreguliert wird. B-Zellen regulieren die BTLA-Expression im Gegensatz dazu in den ersten 48h nach Aktivierung herunter (Han, Goularte et al. 2004; Hurchla, Sedy et al. 2005).

T-Zellen der Maus sowie des Menschen regulieren HVEM einige Tage nach Aktivierung herunter, wobei die Ausgangsmenge nach der Aktivierungsphase wiederhergestellt wird (Morel, Schiano de Colella et al. 2000; Sedy, Gavrieli et al. 2005). Eine Studie, die die HVEM-Expression bereits am ersten Tag nach Aktivierung untersuchte, zeigte allerdings eine frühe Erhöhung der HVEM-Expression, bevor die Expression herunter reguliert wurde (Sedy, Gavrieli et al. 2005). Murine B-Zellen exprimieren im Gegensatz zu menschlichen B-Zellen nur geringe Mengen an HVEM, wobei menschliche B-Zellen HVEM in den ersten Tagen nach Aktivierung herunter regulieren. (Harrop, Reddy et al. 1998; Duhon, Pasero et al. 2004; Wang, Subudhi et al. 2005).

Über einen längeren Zeitraum als 3 Tage nach Aktivierung wurde der Verlauf der Expression von BTLA und HVEM auf T- und B-Zellen jedoch noch nicht untersucht. Für die Untersuchung



**Abb. 10: Induktion von BTLA und HVEM auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen während der *P. yoelii*-Infektion**

Wildtyp-Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut entnommen und die enthaltenen Leukozyten mit APC-konjugiertem anti-CD4- oder anti-B220- sowie mit PE-konjugiertem anti-BTLA- bzw. anti-HVEM-Antikörper inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der Fluoreszenzintensität (n=6).

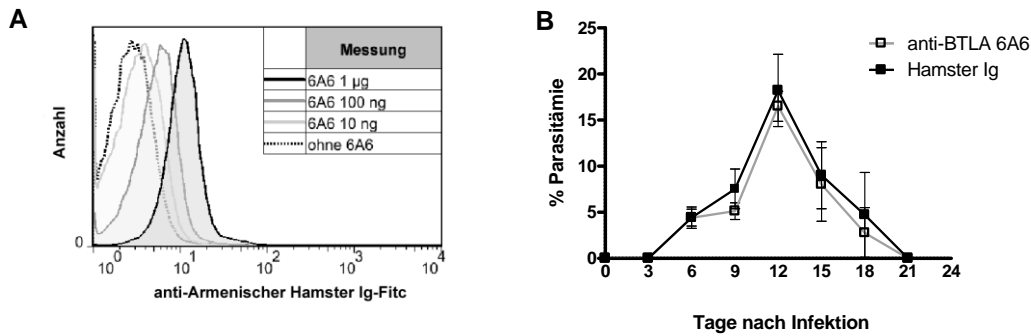
des Einflusses dieser Rezeptoren auf die Immunantwort gegen eine über 3 Wochen andauernde Infektion ist es jedoch wichtig, die Expression der Rezeptoren über den gesamten Zeitraum zu kennen. Daher wurde die Expression der Moleküle durch Färbung auf Blutlymphozyten und durchflusszytometrische Untersuchung von Beginn der Infektion bis zur vollständigen Beseitigung der Parasitämie analysiert (Abb. 10).

Es bestätigte sich, dass  $CD4^+$  T-Zellen BTLA früh nach der Infektion hoch regulieren. So war 4 Tage nach Infektion ein Anstieg um 32% zu beobachten. Die BTLA-Expression fluktuierte während der Infektion, um dann mit abnehmender Parasitämie in der Endphase der Infektion wieder auf den Ursprungswert abzusinken. Auf B-Zellen sank zu Beginn der Infektion in Übereinstimmung mit der Literatur die BTLA-Expression um 26%. Allerdings stieg die BTLA-Expression nach dem sechsten Tag der Infektion auf Werte, die 51% über dem Ausgangswert lagen. Anschließend sank die Expression bis zum Ende der Infektion fast auf den Ausgangswert ab. Die Expression von HVEM auf B-Zellen war sehr niedrig und erhöhte sich über den gesamten Verlauf der Infektion nur geringfügig. Auf  $CD4^+$  T-Zellen erhöhte sich die HVEM-Expression jedoch bereits 2 Tage nach der Infektion um 64%, nach 4 Tagen sogar um 93% gegenüber dem Ausgangswert. Die Werte blieben bis über die vollständige Beseitigung der Parasitämie hinaus erhöht.

### **3.3.4 Einfluss eines agonistisch wirkenden anti-BTLA-Antikörpers auf die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL**

Die Abwesenheit von BTLA hat einen starken Einfluss auf die Parasitämie während einer *P. yoelii* NL-Infektion und die Expression von BTLA auf  $CD4^+$  T-Zellen sowie B-Zellen ist während der Infektion in Wildtyp-Mäusen sogar erhöht. Daher sollte untersucht werden, ob sich die Parasitämie während der Infektion von Wildtyp-Mäusen weiter erhöht, wenn BTLA-vermittelte Signale in diesen Mäusen experimentell über das Normalmaß hinaus gesteigert werden. Hierzu wurde ein gegen BTLA gerichteter monoklonaler Antikörperklon verwendet, von dem bekannt ist, dass er Immunantworten beeinflusst, indem er agonistisch an BTLA bindet, nach Bindung den Rezeptor also nicht blockiert, sondern selbst Signale initiiert (Lepenius, Pfeffer et al. 2007; Albring, Sandau et al. 2010).



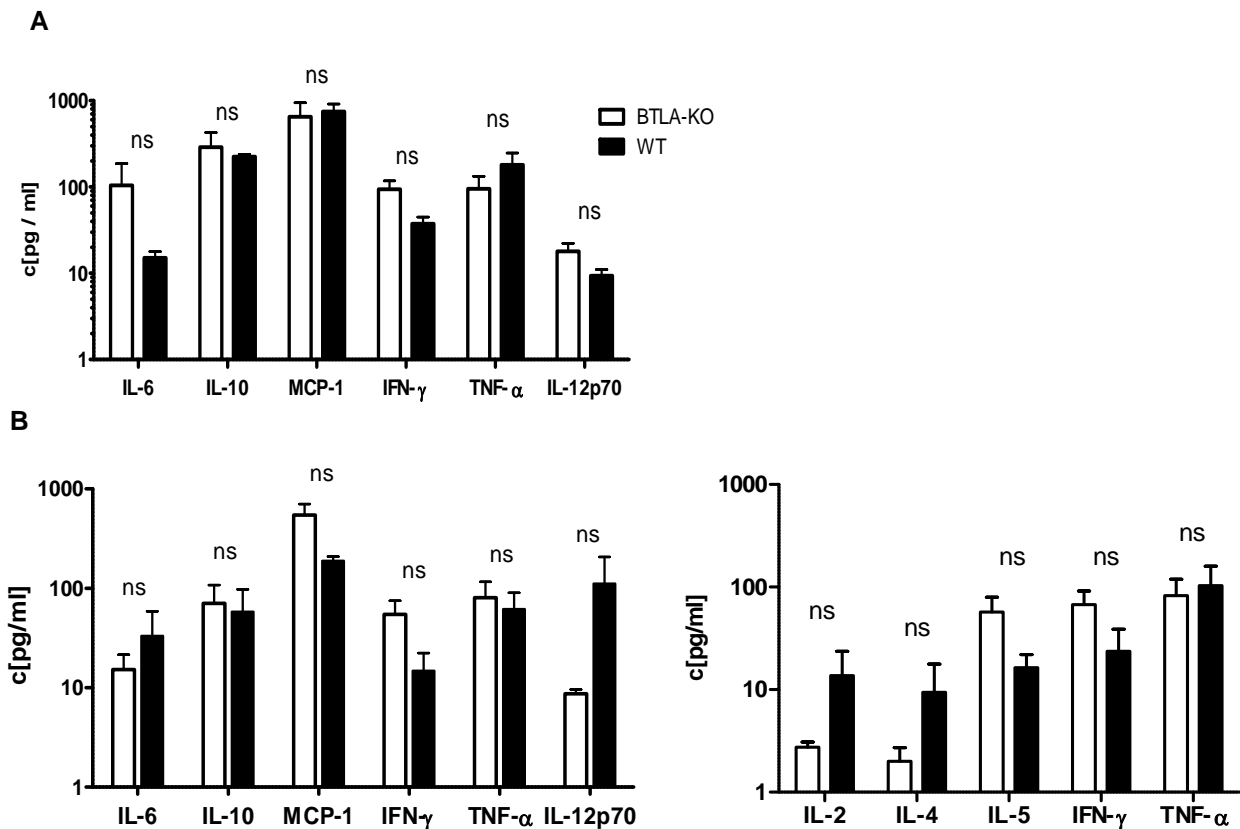


**Abb. 11: Kein Einfluss von anti-BTLA 6A6 auf den Verlauf einer *P. yoelii* NL-Infektion**

Aus dem Zellkulturüberstand einer Hybridomkultur aufgereinigter anti-BTLA 6A6 Antikörper wurde auf Bindungsfähigkeit an BTLA untersucht, indem Milzzellen einer Wildtyp-Maus mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antikörpers inkubiert und gebundener anti-BTLA-Antikörper nach Färbung mit einem FITC-konjugierten Sekundär-Antikörper durchflusszytometrisch detektiert wurde (A). Wildtyp-Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. 0, 3 und 6 Tage nach der Infektion wurden 500 µg anti-BTLA 6A6- oder unspezifischer Hamster-Antikörper intraperitoneal injiziert. Während der Infektion wurde alle 3 Tage die Parasitämie bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. (6A6: n=6, Hamster Ig: n=5) (B).

Die Fähigkeit des aus dem Zellkulturüberstand einer Hybridomkultur aufgereinigten Antikörpers, an BTLA zu binden, wurde vor dem Experiment überprüft. Dazu wurden Milzzellen mit APC-konjugiertem anti-CD4-Antikörper und verschiedenen Mengen des aufgereinigten anti-BTLA-Antikörpers inkubiert und die Bindung des anti-BTLA-Antikörpers an BTLA exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Färbung mit einem Sekundärantikörper und anschließender durchflusszytometrischer Untersuchung nachgewiesen (Abb. 11 A).

Wildtyp-Mäuse wurden mit *P. yoelii* NL infiziert und erhielten am Tag der Infektion, sowie 3 und 6 Tage nach der Infektion entweder 500 µg anti-BTLA- oder unspezifischen Hamster-Kontrollantikörper durch intraperitoneale Injektion. Die Parasitämie wurde zu keinem untersuchten Zeitpunkt während der Infektion von der Applikation des anti-BTLA-Antikörpers beeinflusst (Abb. 11 B). Eine weitere Erhöhung der Parasitämie durch exogene Steigerung der BTLA-vermittelten Signale war demnach nicht möglich.



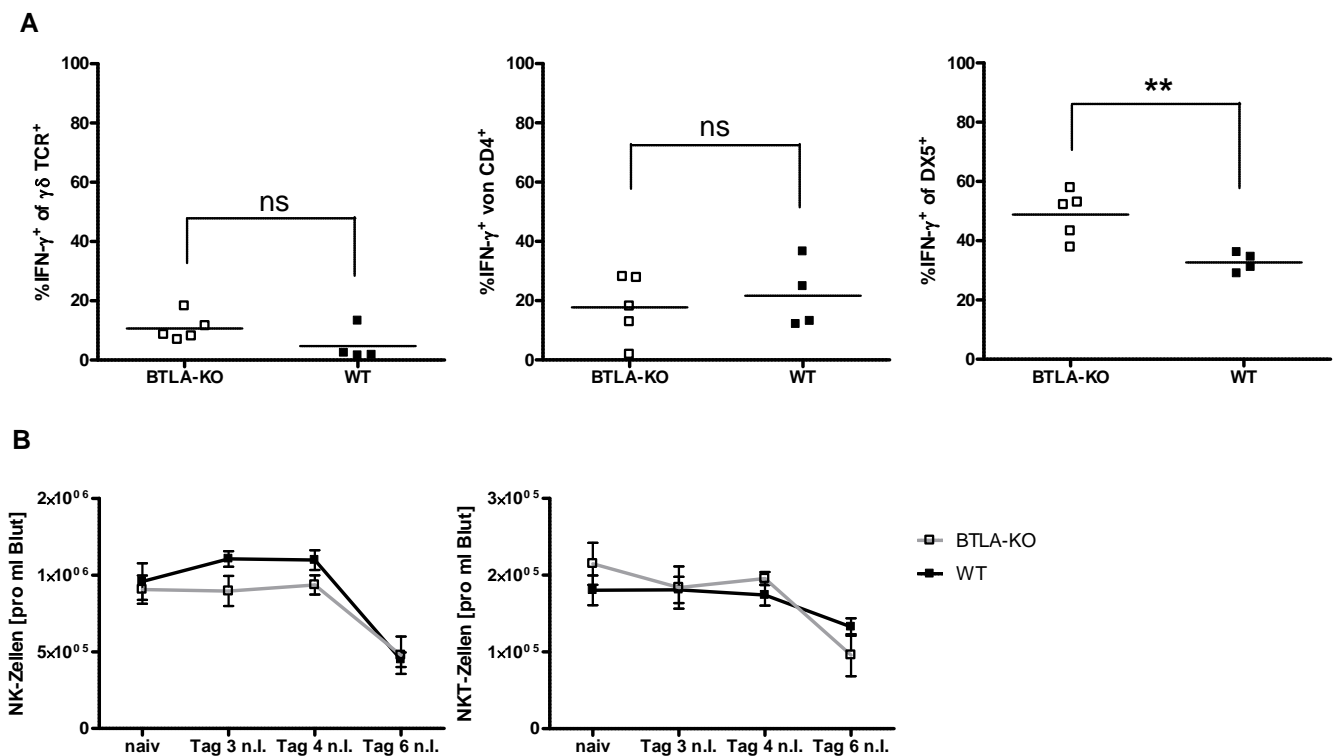
**Abb. 12: Einfluss der BTLA-Defizienz auf die Zytokinantwort während der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL**

Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. 6 Tage (**A**) bzw. 9 Tage (**B**) nach der Infektion wurde Serum gewonnen, in dem mittels CBA die Konzentration der angegebenen Zytokine ermittelt wurde. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-test (unpaired, two-tailed) analysiert (Tag 6: n=3, Tag 9: n=6).

### 3.3.5 Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Zytokinantwort während der *P. yoelii* NL-Infektion

Unterschiede in der Immunantwort BTLA-defizienter und -suffizienter Mäuse könnten Rückschlüsse auf die immunologischen Mechanismen zulassen, die die verringerte Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen verursachen. Da Zytokine eine zentrale Rolle bei der Initiierung und Koordinierung der Immunantwort spielen, wurde mit der Untersuchung der Zytokinantwort begonnen. Entzündliche Prozesse wie die Produktion und Freisetzung von IL-12p70, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen die Blutphase der Malaria (Clark, Hunt et al. 1987; Stevenson, Tam et al. 1995). Die Serumkonzentrationen von u.a. IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und IL-12p70 sind während der Blutphase einer *P. falciparum*-Infektion im Menschen erhöht (Lyke, Burges et al. 2004). Die

Untersuchung der Serumkonzentrationen der Zytokine IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-12p70 6 und 9 Tage nach Infektion sowie der Zytokine IL-2, IL-4, IL-5 9 Tage nach Infektion ergab jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen BTLA-defizienten und Wildtyp-Mäusen (Abb. 13). Allerdings war sowohl 6 Tage, als auch 9 Tage nach der Infektion eine tendenziell höhere Konzentration von IFN- $\gamma$  in BTLA-defizienten Mäusen erkennbar. Die alpha-Werte der statistischen Analyse betragen für IFN- $\gamma$  0,083 (Tag 6) und 0,097 bzw. 0,155 (Tag 9, Doppelbestimmung).



**Abb. 13: Einfluss der BTLA-Defizienz auf die Produktion von IFN- $\gamma$  während der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL**

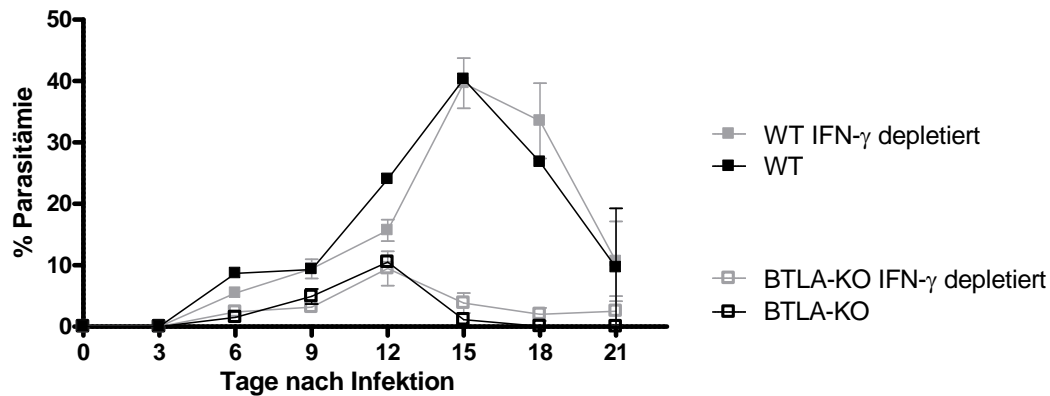
Die intrazelluläre Produktion von IFN- $\gamma$  verschiedener Zellpopulationen im Blut wurde 6 Tage nach Infektion durch intrazelluläre Färbung untersucht. Leukozyten aus dem Blut wurden hierzu 6 Stunden mit PMA/Ionomycin unter Einwirkung von Monensin restimuliert, mit FITC-konjugierten anti- $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor, anti-CD4 oder anti-DX5-Antikörpern inkubiert, permeabilisiert, mit APC-konjugiertem anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-test (unpaired, two-tailed) analysiert (**A**). Die Anzahl von NK- sowie NKT-Zellen im Blut wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt, indem Blutlymphozyten mit PE-konjugiertem anti-DX5, APC-konjugiertem anti-CD3 und PerCP-konjugiertem anti-CD45 Antikörper inkubiert, und anschließend ein durch Zugabe einer bekannten Anzahl von Beads definierter Teil des Färbearbeitungssatzes durchflusszytometrisch untersucht wurde. Die Anzahl der angegebenen Zellpopulationen ergibt sich rechnerisch aus der Multiplikation ihres gemessenen Anteils an den Lymphozyten im Blut, des Anteils des gemessenen Ansatzvolumens am gesamten Ansatzvolumen und des in den Färbearbeitungssatz eingegangenen Blutvolumens. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (BTLA-KO: n=5, WT: n=4) (**B**).

Aus diesem Grund wurde die Produktion von IFN- $\gamma$  6 Tage nach Infektion auf zellulärer Ebene untersucht. Die Analyse auf Zellebene ist sensitiver als die Quantifizierung der Zytokine im Serum, da aufgrund der Restimulation mehr Zytokine produziert und diese nicht im Blut verdünnt werden. Lymphozyten wurden hierzu isoliert und 6 Stunden mit PMA und Ionomycin unter Einwirkung von Monensin restimuliert.  $\gamma\delta$  T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie NK/NKT-Zellen, die alle als IFN- $\gamma$ -Produzenten in Frage kommen, da sie große Mengen von IFN- $\gamma$  produzieren können, wurden dann durch Färbung mit entsprechenden Antikörpern identifiziert. IFN- $\gamma$  wurde nach Permeabilisierung der Zellen mit einem IFN- $\gamma$ -spezifischen Antikörper gefärbt und die Zellen anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Da  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Milz nur in geringer Zahl vorkommen, wurden die Lymphozyten aus dem Blut verwendet.

Im Vergleich der IFN- $\gamma$ -Produktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus BTLA-defizienten und -suffizienten Mäusen fanden sich keine Unterschiede (Abb. 13). Die DX5<sup>+</sup> Zellpopulation im Blut von BTLA-defizienten Mäusen, die sowohl NK-, also auch NKT-Zellen umfasst, beinhaltete im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen jedoch 50% mehr Zellen, die IFN- $\gamma$  produzierten. Um zu überprüfen, ob dieser erhöhte Anteil einer größeren Anzahl von IFN- $\gamma$  produzierenden NK- oder NKT-Zellen entspricht, wurde die Gesamtzahl der NK- und NKT-Zellen im Blut bestimmt. Die Anzahl beider Zellarten verringerte sich im Verlauf der Infektion, so dass während des untersuchten Zeitraums an Tag 6 nach Infektion die geringste Anzahl im Blut vorhanden war. Es wurden jedoch an keinem Zeitpunkt unterschiedliche Anzahlen von NK- bzw. NKT-Zellen im Blut BTLA-defizienter und -suffizienter Mäuse gefunden. Der 6 Tage nach Infektion gefundene erhöhte Anteil IFN- $\gamma$  produzierender DX5<sup>+</sup> Zellen entspricht daher einer erhöhten Anzahl dieser Zellen im Blut BTLA-defizienter Mäuse.

### **3.3.6 Beteiligung von IFN- $\gamma$ an der Reduktion der Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen**

Aufgrund der Hinweise für eine erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  in BTLA-defizienten Mäusen während der *P. yoelii* NL-Infektion sollte untersucht werden, ob IFN- $\gamma$  die verringerte Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen vermittelt. Hierzu wurde IFN- $\gamma$  im Zeitraum von kurz



**Abb. 14: IFN- $\gamma$  ist nicht ursächlich für die verringerte Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen**

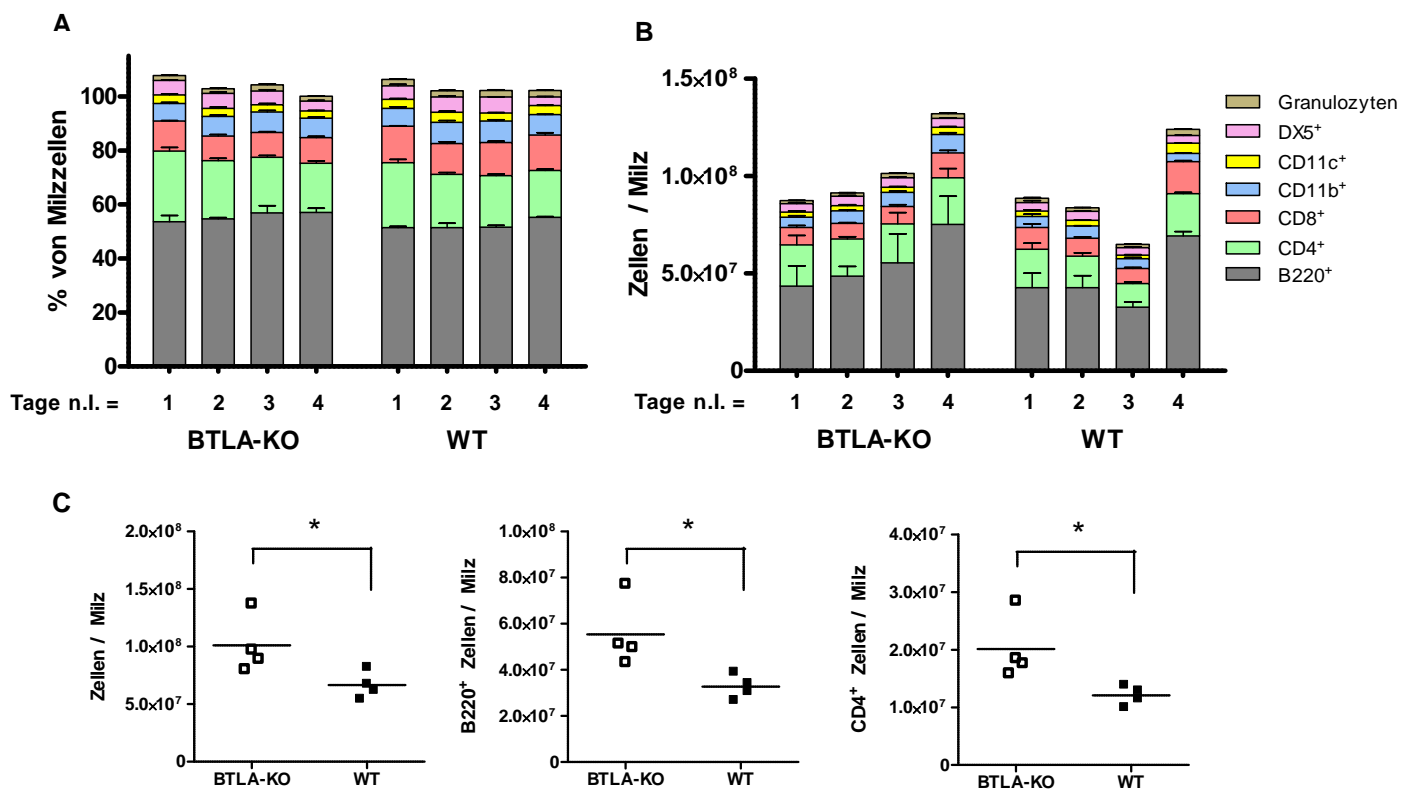
Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Durch intraperitoneale Injektion von jeweils 200  $\mu\text{g}$  anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper (Klon XMG1.2) bzw. Isotypkontroll-Antikörper an den Tagen -1, 3, 6, 9, 12 und 15 nach Infektion wurde IFN- $\gamma$  depletiert. Während des Verlaufs der Infektion wurde alle 3 Tage die Parasitämie bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (BTLA-KO undepletiert: n=4, BTLA-KO depletiert: n=5, WT undepletiert: n=1, WT depletiert: n=5).

vor der Infektion bis über den Zeitpunkt der maximalen Parasitämie hinaus durch intraperitoneale Injektion eines gegen IFN- $\gamma$  gerichteten monoklonalen Antikörpers depletiert. Es wurde dabei eine Dosis gewählt, die im Modell der stark IFN- $\gamma$ -abhängigen Immunantwort gegen die experimentelle Infektion von Mäusen mit dem Erreger *Trypanosoma cruzi*, zu einer deutlich erhöhten Parasitämie führt (Cardillo, Voltarelli et al. 1996), so dass die Depletion von IFN- $\gamma$  sicher gestellt war.

Die unterschiedliche Parasitämie zwischen nicht depletierten BTLA-defizienten und -suffizienten Mäusen wurde abermals gefunden (Abb. 14). Die Depletion von IFN- $\gamma$  hatte jedoch in keiner der Mausgruppen einen Einfluss auf die Parasitämie. Da der BTLA-vermittelte Unterschied der Parasitämie trotz IFN- $\gamma$  Depletion bestehen blieb, kann IFN- $\gamma$  als Effektormechanismus, über den dieser Unterschied vermittelt wird, ausgeschlossen werden.

### 3.3.7 Einfluss der BTLA-Defizienz auf die zelluläre Zusammensetzung der Milz während der *P. yoelii* NL-Infektion

In der Milz werden parasitierte Erythrozyten aus dem Blut filtriert und von phagozytischen Zellen abgebaut. Dies verringert nicht nur direkt die Parasitämie, sondern ermöglicht auch die Präsentation antigenen Materials für Zellen des adaptiven Immunsystems, die hierdurch ihrerseits antiparasitäre Eigenschaften erhalten. Die Milz ist daher ein zentrales Organ für die Immunantwort gegen die Blutphase der Malaria. Die Milz beherbergt eine Vielzahl von Zellpopulationen, von denen alle, mit Ausnahme der Granulozyten, BTLA exprimieren. BTLA kann als koinhibitorisches Molekül die Aktivierung von Zellen vermindern. Verminderte Aktivierung hätte nicht nur Einfluss auf die Initiierung von Effektormechanismen wie der Zytokinsekretion, sondern würde auch die Proliferation beeinträchtigen. Daher sollte



**Abb. 15: BTLA-Defizienz verhindert eine Kontraktion der Milz in der Frühphase der *P. yoelii*-Infektion**

Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. 1, 2, 3 und 4 Tage nach der Infektion wurden die Milzzellen isoliert und der Anteil (A) sowie die Größe (B) der verschiedenen Milzzellpopulationen nach Färbung der entsprechenden Oberflächenproteine durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Anzahl der Gesamtzellen der Milz sowie der B- und CD4<sup>+</sup> T-Zellen 3 Tage nach Infektion ist gesondert dargestellt (C). Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-test (unpaired, two-tailed) analysiert (Tag 1,2,3 und Tag 4 Wildtyp: n=4; Tag 4 BTLA-KO: n=5).

untersucht werden, ob die Abwesenheit von BTLA eine schnellere oder stärkere Vermehrung der Milzzellen während der *P. yoelii* NL-Infektion verursacht, was die beobachtete Verringerung der Parasitämie erklären könnte.

Da die Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen von Anfang an niedriger ist als in Wildtyp-Mäusen, müssen Unterschiede in der Immunantwort, die diesen Unterschied vermitteln, bereits sehr früh zum Tragen kommen. Die Analyse der Zellzusammensetzung der Milz während der Infektion wurde daher auf die ersten 4 Tage der Infektion beschränkt. Hierzu wurden die Milzzellen nach Präparation an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion gezählt, die unterschiedlichen Zellpopulationen durch Färbung mit entsprechenden Antikörpern identifiziert und der Anteil der einzelnen Zellpopulationen an den Gesamtlymphozyten durchflusszytometrisch analysiert. An keinem der untersuchten Zeitpunkte wurde zwischen BTLA-defizienten und -suffizienten Mäusen ein Unterschied im Anteil der einzelnen Zellpopulationen an den Gesamtlymphozyten gefunden (Abb. 15 A). Das Verhältnis der einzelnen Zellpopulationen zueinander veränderte sich weder in BTLA-defizienten, noch in -suffizienten Mäusen wesentlich.

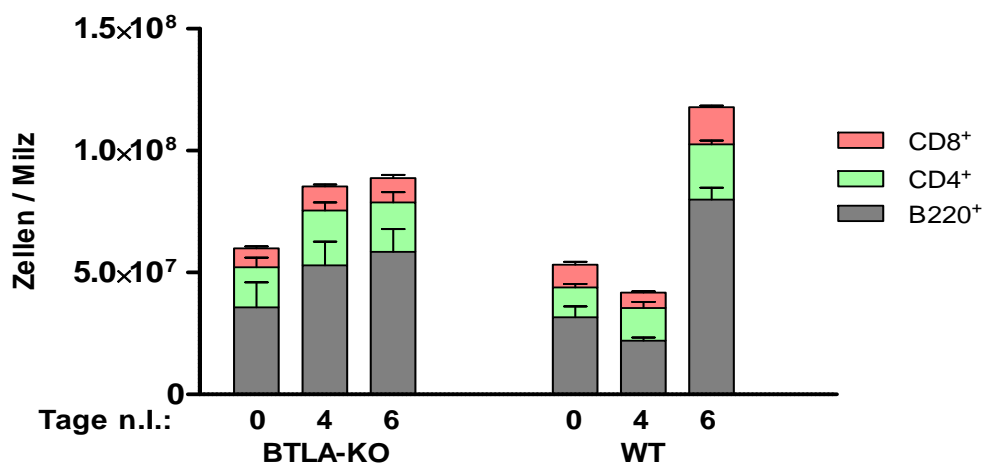
Im Verlauf einer Infektion mit *P. yoelii* NL kommt es jedoch zu einer Zunahme der Zellzahlen in der Milz, die mit einer starken Splenomegalie einhergeht. Unter Berücksichtigung der absoluten Zellzahlen in der Milz während der Frühphase der Infektion ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den Mausgruppen (Abb. 15 B). So kam es in den ersten 3 Tagen nach Infektion zu einer Abnahme der Zellzahlen in der Milz von BTLA-suffizienten Mäusen um 24%. In der gleichen Zeit stieg jedoch die Zahl der Milzzellen in BTLA-defizienten Mäusen kontinuierlich an, so dass 3 Tage nach Infektion 20% mehr Zellen vorhanden waren, als zu Beginn. Die Zahl von Milzzellen war daher in BTLA-defizienten Mäusen 3 Tage nach der Infektion 52% höher als in Wildtyp-Mäusen. Es zeigte sich, dass nicht nur die Gesamtzahl der Milzzellen zu diesem Zeitpunkt in BTLA-defizienten Mäusen signifikant höher war, sondern auch die Zahl der B220<sup>+</sup> B-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 15 C). Für alle anderen untersuchten Zellpopulationen wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede an Tag 3 nach Infektion gefunden.

Am 4. Tag nach Infektion kam es auch in BTLA-suffizienten Mäusen zu einem starken Anstieg der Zellzahlen, der den initialen Zellverlust überkompensierte, so dass die Zellzahlen fast die Höhe der Zellzahlen in BTLA-defizienten Mäusen zu diesem Zeitpunkt erreichten. Zu diesem

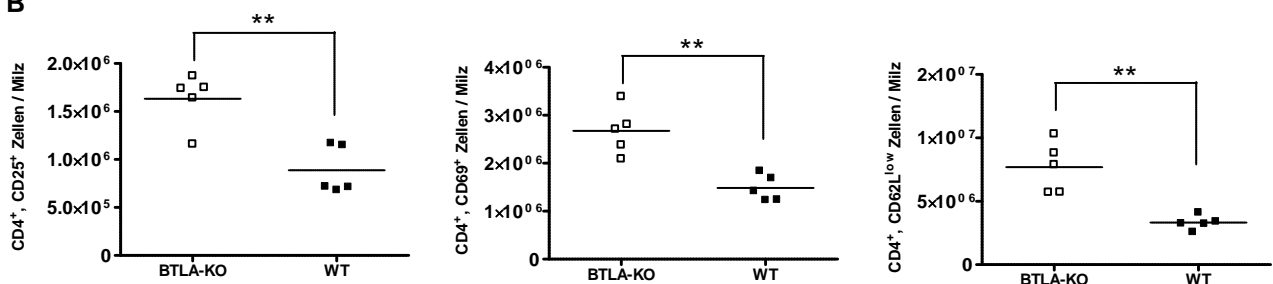
Zeitpunkt ist die Parasitämie in Wildtyp-Mäusen jedoch bereits sehr viel höher, als in BTLA-defizienten Mäusen, so dass die Vergleichbarkeit der Immunantworten nicht mehr gegeben ist. Zu späteren Zeitpunkten als 6 Tage nach Infektion wird eine derartige Analyse zudem stark durch die infektionsbedingt eintretende Organ- und Zellschädigung erschwert, aufgrund derer sich die Zellpopulationen nicht mehr zuverlässig differenzieren lassen.

In weiteren Experimenten zeigte sich, dass der zeitliche Verlauf der Milzkontraktion und anschließenden Expansion zeitlich variabel ist. So wurde die Kontraktion 4 Tage nach Infektion beobachtet, die anschließende Expansion war bis Tag 6 nach Infektion erfolgt (Abb. 16 A). Die signifikant erhöhte Anzahl von B-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen BTLA-

A



B



**Abb. 16: BTLA-Defizienz ermöglicht eine frühe Akkumulation von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz**

Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. 4 und 6 Tage nach der Infektion, sowie bei naiven Mäusen wurde die Größe der verschiedenen Milzzellpopulationen nach Färbung der entsprechenden Oberflächenproteine durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM (A). Die Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen 4 Tage nach der Infektion wurde nach Färbung der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD62L durchflusszytometrisch analysiert (B). Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-test (unpaired, two-tailed) analysiert.



defizienter Mäuse in der Frühphase der Infektion wurde in diesem Experiment bestätigt.

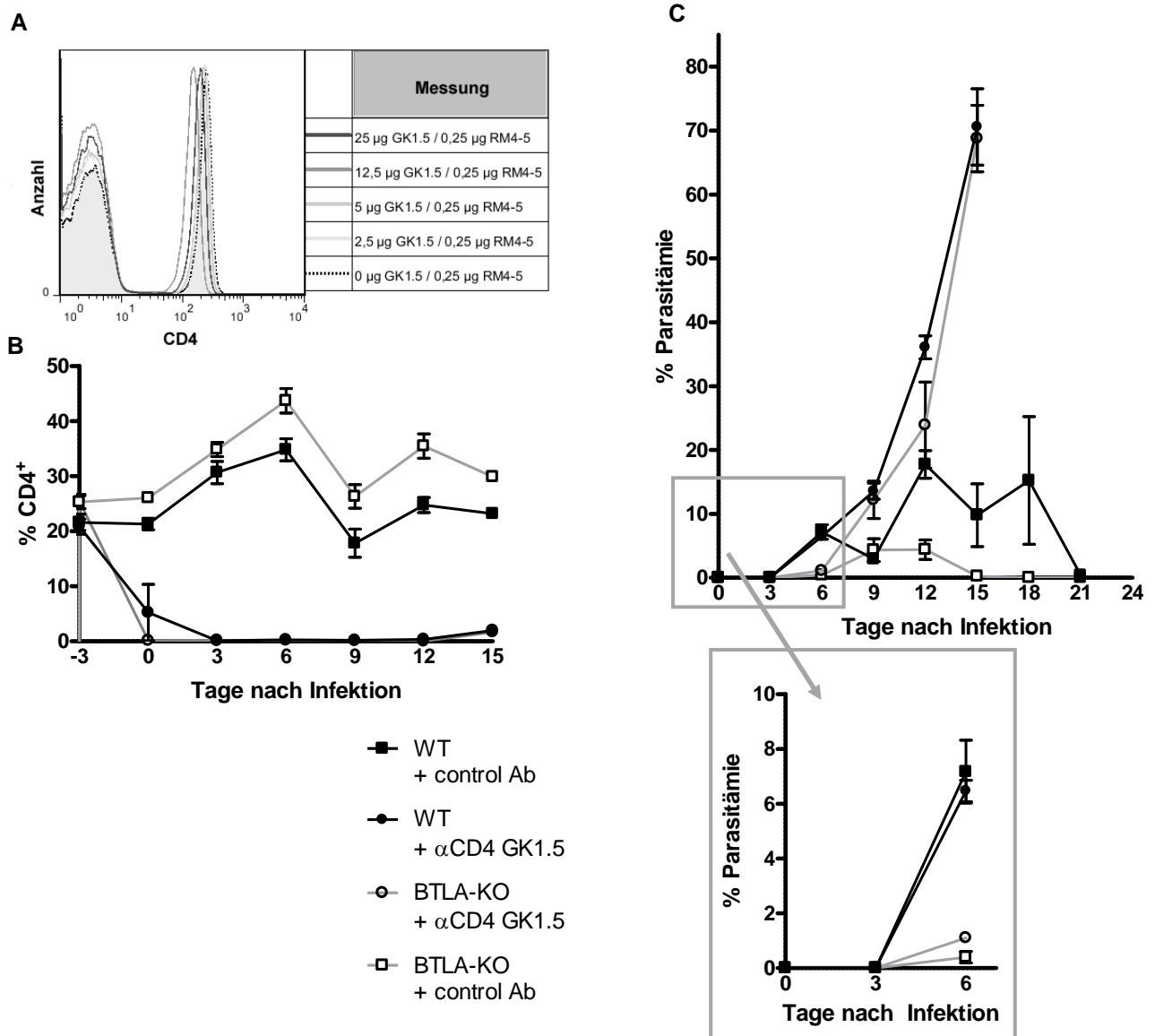
CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind zentrale Mediatoren der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL (Zhang, Hisaeda et al. 2001). Um zu untersuchen, inwiefern die erhöhte Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Frühphase der Infektion die Immunantwort beeinflussen kann, wurde der Aktivierungszustand der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu dem Zeitpunkt untersucht, an dem die unterschiedlichen Zellzahlen zwischen BTLA-defizienten und -suffizienten Mäusen beobachtet wurden. Es zeigte sich, dass der Anteil von CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> und CD62L<sup>niedrig</sup> Zellen an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BTLA-defizienten Mäusen nicht geringer war, als in BTLA-suffizienten Mäusen. Somit war die Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen BTLA-defizienter Mäuse in der Frühphase der Infektion signifikant erhöht (Abb. 16 B).

### 3.3.8 Einfluss von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL

Da die Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen *P. yoelii* NL-infizierter BTLA-defizienter Mäuse signifikant erhöht war, sollte untersucht werden, ob CD4<sup>+</sup> T-Zellen essentiell für die verbesserte Immunantwort in BTLA-defizienten Mäusen sind. Hierzu wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Infektion durch Behandlung der Mäuse mit einem gegen CD4 gerichteten monoklonalen Antikörper depletiert. Der Erfolg der Depletion sollte durch Färbung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut mit einem anderen Antikörperklon überprüft werden. Dabei musste sichergestellt werden, dass der Depletionsantikörper die Detektion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels des zur Färbung eingesetzten Antikörperklons nicht behindert.

Um dies zu überprüfen wurden zunächst Milzzellen von C57BL/6-Mäusen mit unterschiedlichen Mengen des zur Depletion verwendeten Antikörpers vorinkubiert und anschließend mit dem FITC-konjugierten Antikörper in den Mengen inkubiert, wie sie auch zur Detektion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Depletion eingesetzt wurden. Es zeigte sich auch bei hundertfachem Überschuss des Depletionsantikörpers keine nennenswerte Beeinträchtigung der CD4-Färbung durch den Detektionsantikörper (Abb. 17 A). Die Identifikation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde also nicht beeinträchtigt.

Die Untersuchung der Blutlymphozyten nach Depletion ergab, dass bis Tag 12 nach Infektion nicht mehr als 1% der Blutlymphozyten  $CD4^+$  waren. An Tag 15 nach Infektion betrug der Anteil immer noch nicht mehr als 3,2% (Abb. 17 B). Mäuse, bei denen der Anteil über diesen Werten lag, wurden aus dem Experiment ausgeschlossen. Während der Infektion  $CD4^+$



**Abb. 17:** Die verbesserte Immunität wird in der frühen Phase der Infektion von Mechanismen der angeborenen Immunität, in späteren Phasen von  $CD4^+$  T-Zellen vermittelt

Um auszuschließen, dass der zur Depletion verwendete anti- $CD4$ -Antikörper (GK1.5) die Detektion von  $CD4^+$ -Zellen durch einen anderen anti- $CD4$ -Antikörper (RM4-5) behindert, wurden Milzzellen mit GK1.5 im Überschuss vorinkubiert und anschließend mit FITC-konjugiertem RM4-5 inkubiert, dessen Bindung anschließend durchflusszytometrisch analysiert wurde (A). Die Abwesenheit von  $CD4^+$  Zellen im Blut von  $CD4$ -depletieren Mäusen während der Infektion wurde durch Inkubation von Blutleukozyten mit FITC-konjugiertem RM4-5 und anschließende durchflusszytometrische Detektion verifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (B).  $CD4^+$  T-Zelldepletierte und nicht-depletierte Wildtyp- und BTLA-KO-Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Während des Verlaufs der Infektion wurde die Parasitämie bestimmt und mittels two-way ANOVA (repeated measures, mit Bonferroni post test) auf statistische Signifikanz überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (n=3) (C).

T-Zelldepletierter und nicht depletierter BTLA-defizienter sowie -suffizienter Mäuse zeigte sich, dass die Parasitämie der nicht depletierten BTLA-defizienten Mäuse wiederum erheblich niedriger war als in den nicht depletierten BTLA-suffizienten Mäusen und die Parasitämie abermals 6 Tage früher vollständig beseitigt wurde (Abb. 17 C). Die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen hatte während der ersten 6 Tage der Infektion keinen Einfluss auf die Parasitämie, da sich die Parasitämie der BTLA-defizienten bzw. -suffizienten Mäuse nicht von der jeweiligen nicht depletierten Kontrolle unterschied (Abb. 17 C, Ausschnitt). Der frühe Unterschied in der Parasitämie BTLA-defizienter sowie -suffizienter Mäuse wird also nicht von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verursacht, sondern muss von anderen Zellpopulationen vermittelt werden, die in der Lage sein müssen, sehr schnell auf die Infektion zu reagieren.

Ab dem 6. Tag nach Infektion entwickelte sich in CD4<sup>+</sup> T-Zelldepletierten BTLA-defizienten sowie -suffizienten Mäusen jedoch eine gleichermaßen fulminante Parasitämie, so dass die Mäuse nach dem 15. Tag der Infektion getötet werden mussten. Die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beseitigte also nach Ablauf der Frühphase der Infektion den BTLA-abhängigen Unterschied in der Parasitämie, was ein starkes Indiz für eine Beteiligung von CD4<sup>+</sup>-T-Zell-exprimiertem BTLA an der Vermittlung dieses Unterschieds ist.

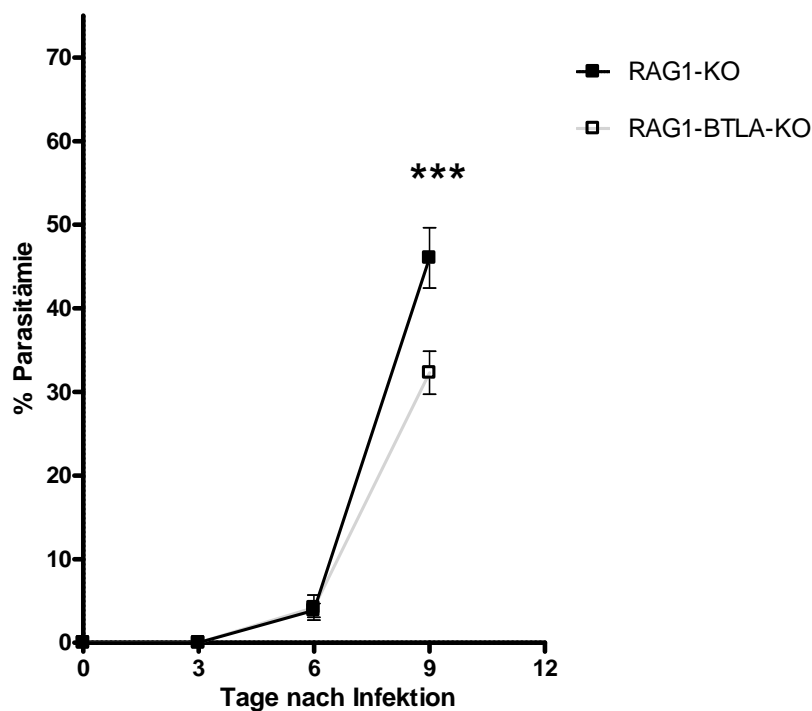
### **3.3.9 Einfluss von BTLA, das auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird, auf die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL**

Die Depletion von CD4<sup>+</sup> während der Infektion hatte gezeigt, dass zu Beginn der Infektion eine Zellpopulation den BTLA-vermittelten Unterschied der Parasitämie verursachte, die kein CD4 exprimiert und sehr früh antiplasmodiale Mechanismen initiieren kann. Das frühe Einsetzen dieser Mechanismen ist ein starkes Indiz für die Beteiligung von Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems, da Effektormechanismen, die von Zellen des adaptiven Immunsystems vermittelt werden, einer weitaus längeren Aktivierungsphase bedürfen. Um die Beteiligung von Zellen des angeborenen Immunsystems an der BTLA-vermittelten Beeinflussung der Parasitämie zu untersuchen, musste der Einfluss von BTLA auf Zellen des adaptiven Immunsystems während der Infektion ausgeschlossen werden. Dies ist durch Verwendung von RAG1-defizienten Mäusen möglich, die keine reifen B- und T-Zellen besitzen. Für die entsprechenden Experimente mussten Mäuse generiert werden, die sowohl RAG1-, als auch BTLA-defizient sind. Diese Mauslinie wurde im Rahmen dieser Arbeit

durch Verpaarung der RAG1- bzw. BTLA-defizienten Mauslinien hergestellt. Die Abwesenheit von B- und T-Zellen in diesen Mäusen wurde durch durchflusszytometrische Analyse von Blutlymphozyten sichergestellt. BTLA-Defizienz wurde sowohl durchflusszytometrisch als auch auf genetischer Ebene durch PCR verifiziert.

Nach Infektion von RAG1-BTLA-defizienten Mäusen sowie RAG1-defizienten Kontrollmäusen stieg die Parasitämie bis zum 6. Tag nach Infektion zunächst gleichermaßen langsam an. Nach dieser Phase kam es jedoch zu einer fulminanten Entwicklung der Parasitämie, aufgrund derer das Experiment nach dem 9. Tag nach Infektion beendet werden musste.

Der Anstieg der Parasitämie war in RAG1-BTLA-defizienten Mäusen jedoch weniger schnell, als in den BTLA-suffizienten Kontrollmäusen. Die Parasitämie war daher 9 Tage nach Infektion in RAG1-BTLA-defizienten Mäusen 30% niedriger als in den Kontrollmäusen. Somit konnte belegt werden, dass BTLA, welches auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird, die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL inhibiert.



**Abb. 18: BTLA inhibiert die angeborene Immunantwort gegen *P. yoelii* NL**

RAG1-KO und RAG1-BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Während des Verlaufs der Infektion wurde die Parasitämie bestimmt und mittels two-way ANOVA (repeated measures, mit Bonferroni post test) auf statistische Signifikanz überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der kumulierten Ergebnisse zweier unabhängiger Versuche ( $n=13$ ).

### **3.3.10 Einfluss von BTLA auf die Effektormechanismen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der *P. yoelii* NL-Infektion**

Die Untersuchung der Milzzellpopulationen sowie die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der *P. yoelii* NL-Infektion erbrachten Hinweise auf eine Beteiligung von CD4<sup>+</sup> T-Zell-exprimiertem BTLA an der Vermittlung der unterschiedlichen Parasitämie zwischen BTLA-defizienten und –suffizienten Mäusen. Eine zentrale Funktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist die Koordinierung der Effektormechanismen, die von anderen Zellpopulationen ausgehen. Hierbei spielt die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine eine entscheidende Rolle. Um Hinweise auf die Effektormechanismen zu finden, die für die BTLA-vermittelten Unterschiede in der Parasitämie verantwortlich sind, sollte die Zytokinantwort der CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL untersucht werden.

Die Herangehensweise, durch vergleichende Analyse der Immunantworten von BTLA-defizienten und –suffizienten Mäusen Unterschiede zu finden, die dann Rückschlüsse auf die Ursachen für die unterschiedliche Parasitämie zulassen, hat bei der Untersuchung einer patenten Infektion einen entscheidenden Nachteil. Rückschlüsse aus einem solchen Vergleich werden dadurch erschwert, dass die Infektion sich während der Immunantwort von Anfang an stark unterschiedlich entwickelt. Die untersuchten immunologischen Parameter beruhen also auf der Antwort gegen stark unterschiedliche Infektionslasten, was den Vergleich verzerrt.

Sollte die verbesserte Immunantwort auf einem einzelnen, stark gesteigerten Effektormechanismus beruhen, wäre dieser eventuell trotz der unterschiedlichen Infektionslast zu erkennen. Da aber einerseits die Immunantwort gegen die Blutphase der Malaria von vielen Effektormechanismen vermittelt wird und andererseits BTLA auf fast allen Leukozytenpopulationen exprimiert wird, ist ein einzelner Effektormechanismus als Ursache für die verbesserte Immunantwort in BTLA-defizienten Mäusen unwahrscheinlich. Moderat verbesserte Effektormechanismen, die erst im Zusammenwirken den BTLA-vermittelten Unterschied der Parasitämie verursachen, würden in der Analyse von der unterschiedlichen Parasitämie überdeckt.

Um trotz dieses prinzipiellen Problems einen aussagekräftigen Vergleich der Immunantworten BTLA-defizienter und –suffizienter Mäuse während der Infektion zu ermöglichen, mussten diese in Antwort auf identische Parasitenlasten untersucht werden.

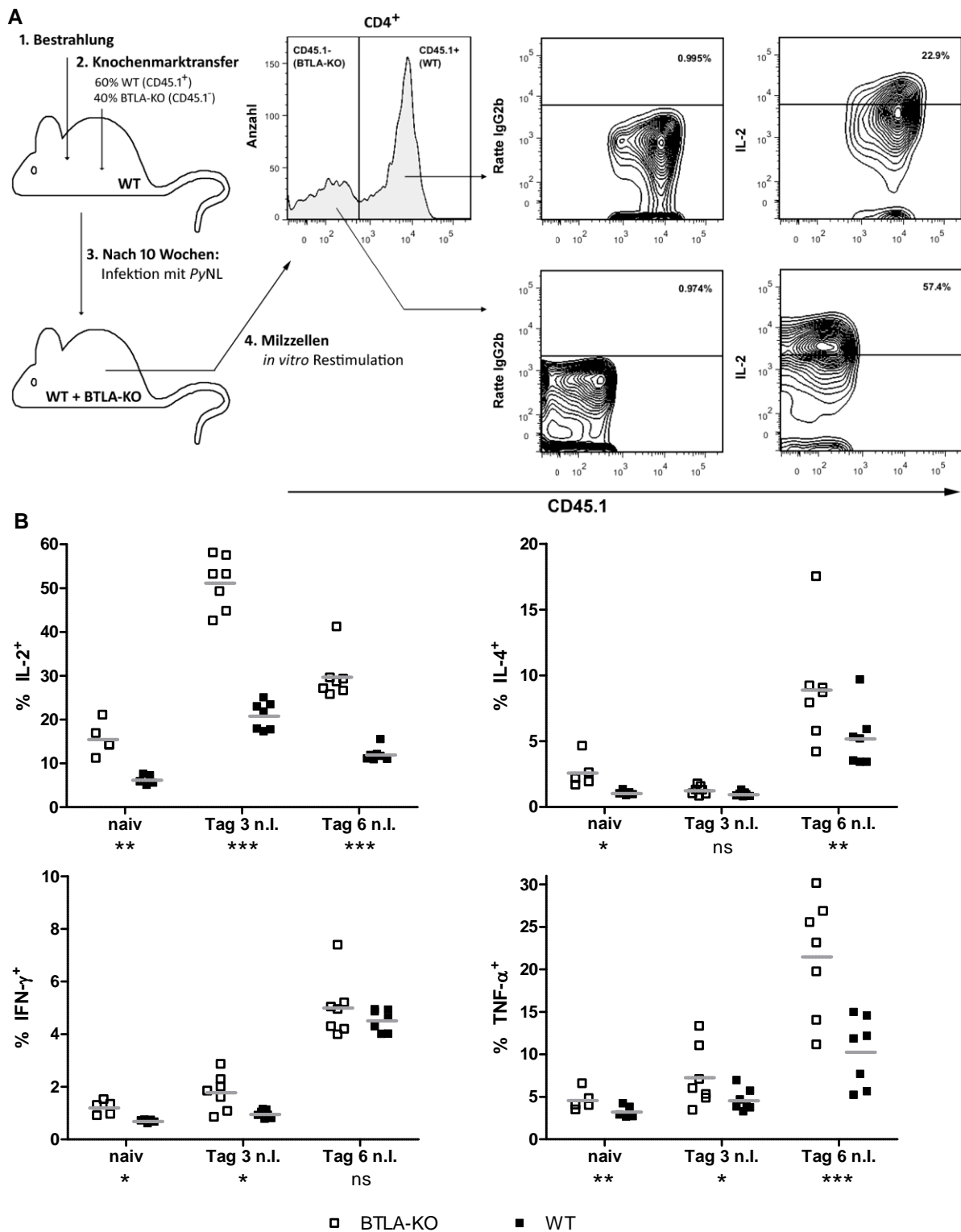
Zu diesem Zweck wurden knochenmarkchimäre Mäuse generiert, die sowohl BTLA-defiziente, als auch –suffiziente Lymphozyten in ähnlichen Anteilen beherbergten (Abb. 19 A). Da bei der Infektion dieser Mäuse die Infektionslast auf alle Zellen gleich wirkt, ist die Vergleichbarkeit der immunologischen Parameter gegeben. Außerdem wird jede CD4<sup>+</sup> T-Zelle in diesen Mäusen gleichermaßen von dem gemischt BTLA-defizienten und –suffizienten Umfeld beeinflusst. Unterschiede in ihrer Immunantwort lassen sich daher auf die vorhandene oder abwesende Expression von BTLA auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein- und von dem Einfluss von BTLA, das von anderen Zellpopulationen exprimiert wird, abgrenzen.

Die Zytokinproduktion BTLA-defizienter und –suffizienter CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde am 3. und am 6. Tag nach Infektion sowie bei nicht infizierten Mäusen auf Einzelzellebene untersucht. Hierzu wurden Milzzellen *ex vivo* mit PMA und Ionomycin unter Einwirkung von Monensin restimuliert. Nach Färbung von CD4 sowie Permeabilisierung wurden die Zytokine IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$  intrazellulär mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

Es zeigte sich, dass die Zytokinproduktion bereits vor der Infektion verstärkt war (Abb. 19 B). Zwar war der Anteil Zytokin-produzierender Zellen insgesamt niedrig, allerdings war der Anteil IL-2 produzierender Zellen im BTLA-defizienten Kompartiment um 150% erhöht. Auch die übrigen Zytokine wurden von BTLA-defizienten Zellen vermehrt exprimiert.

3 Tage nach der Infektion produzierte bereits über die Hälfte der BTLA-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen IL-2, bei den BTLA-exprimierenden Zellen waren es nur 21%. Am 6. Tag nach Infektion nahm der Anteil IL-2 produzierender Zellen wieder ab, der Anteil im BTLA-defizienten Kompartiment war jedoch weiterhin über 140% höher. BTLA-Defizienz führt also zu einer sehr schnellen und robusten IL-2-Produktion.

Der Anteil IFN- $\gamma$  produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen stieg deutlich langsamer an. Zwar war ihr Anteil am 3. Tag nach Infektion im BTLA-defizienten Kompartiment erhöht, dies jedoch auf niedrigem Niveau. 6 Tage nach Infektion fanden sich keine Unterschiede mehr. Dies stimmt mit den vorangegangenen Untersuchungsergebnissen, dass die Depletion von IFN- $\gamma$  keinen Einfluss auf die Parasitämie hat, überein.



**Abb. 19: BTLA-Defizienz bewirkt eine verstärkte Zytokinantwort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der *P. yoelii* NL-Infektion**

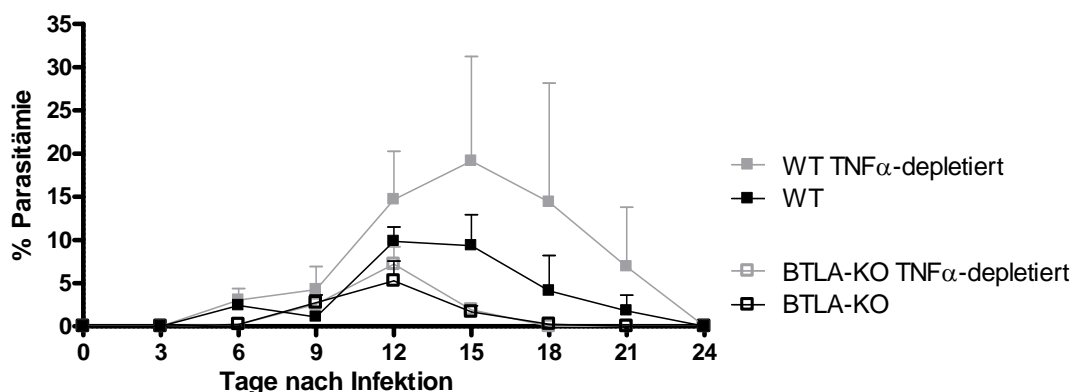
Gemischt knochenmarkchimäre Mäuse, die durch Transfer von 40% BTLA-KO- und 60% Wildtyp-Knochenmark generiert wurden, wurden an Tag 0 (10 Wochen nach Transfer) intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Milzzellen entnommen und mit PE-konjugiertem anti-BTLA, PerCP-konjugiertem anti-CD45.1 und V500-konjugiertem anti-CD4-Antikörper inkubiert. Nach anschließender Permeabilisierung wurden die Zellen mit APC-konjugiertem anti-Zytokin- oder Isotypkontrollantikörper inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse ist schematisch dargestellt (A). Der Anteil der zytokinproduzierenden Zellen an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist für jedes Zytokin zusammengefasst als Mittelwert dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde unter Anwendung des Student's t-test (paired, two-tailed) analysiert (naiv: n=3, Tag 3 und Tag 6: n=7) (B). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Versuche (außer IL-2).

Nach Infektion zeigte sich zunächst keine unterschiedliche Produktion von IL-4 zwischen den BTLA-defizienten und –suffizienten T-Zellen. Am 6. Tag nach Infektion war der Anteil IL-4 produzierender Zellen im BTLA-defizienten Kompartiment jedoch über 70% erhöht. Da IL-4 eine zentrale Rolle bei der Initiierung humoraler Immunantworten spielt und die humorale Immunantwort entscheidend an der Beseitigung einer *P. yoelii* NL-Infektion beteiligt ist, deutet die erhöhte IL-4-Produktion auf einen weiteren möglichen Effektormechanismus hin, über den BTLA-Defizienz eine verminderte Parasitämie vermitteln könnte.

Eine Zunahme der TNF- $\alpha$  Expression war bereits am 3. Tag nach Infektion festzustellen. Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt war ihr Anteil im BTLA-defizienten Kompartiment erhöht. Dieser Unterschied verstärkte sich bis zum 6. Tag nach Infektion. Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil TNF- $\alpha$  produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen 120% höher als im BTLA-exprimierenden Kompartiment.

### 3.3.11 Beteiligung von TNF- $\alpha$ an der Reduktion der Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen

Da beim Vergleich der Zytokinantwort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine gesteigerte TNF- $\alpha$  Produktion in Abwesenheit von BTLA gefunden wurde (Abb. 19 B), sollte untersucht werden, ob die verringerte Parasitämie BTLA-defizienter Mäuse durch TNF- $\alpha$  vermittelt wird. Hierzu wurde



**Abb. 20: TNF- $\alpha$  ist nicht ursächlich für die verringerte Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen**

Wildtyp- und BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Durch intraperitoneale Injektion von jeweils 500  $\mu$ g anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper (Klon V1Q) an den Tagen 0, 6 und 12 nach Infektion wurden TNF- $\alpha$  depletiert. Während des Verlaufs der Infektion wurde alle 3 Tage die Parasitämie bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (BTLA-KO: n=3, WT TNF- $\alpha$  depletiert: n=4, WT undepletiert: n=5).



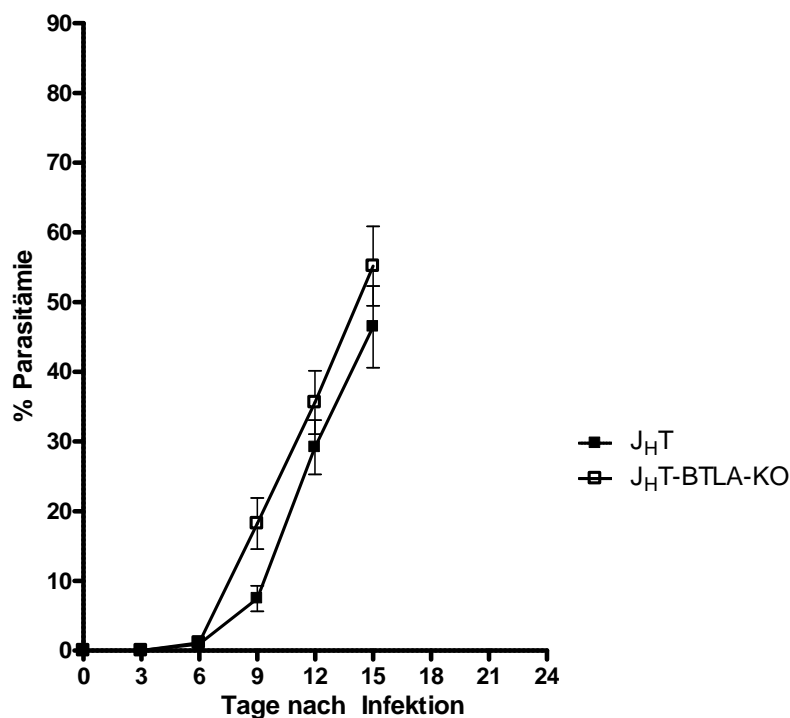
TNF- $\alpha$  mittels eines monoklonalen Antikörpers während der *P. yoelii* NL-Infektion depletiert. Die Depletionskapazität des verwendeten Antikörpers war in einem *in vitro*-Test überprüft worden. Hierbei hatte sich gezeigt, dass der Antikörper die biologische Wirkung von TNF- $\alpha$  bereits in Konzentrationen von 14 ng / ml zur Hälfte inhibierte (persönliche Mitteilung Dr. Susanne Tartz). Bei kommerziell erhältlichen Antikörpern, die wie z.B. Klon MP6-XT3 für die Depletion von TNF- $\alpha$  eingesetzt werden, lag dieser Wert erheblich höher (625ng / ml). Da außerdem vergleichsweise hohe Dosen von 500  $\mu$ g Antikörper pro Injektion verabreicht wurden, war die Depletion von TNF- $\alpha$  sicher gestellt. Im Vergleich mit jeweils undepletierten Mäusen wurden keine signifikant unterschiedlichen Parasitenlasten während der Infektion festgestellt (Abb. 20). Da der BTLA-vermittelte Unterschied der Parasitämie trotz der Depletion von TNF- $\alpha$  bestehen blieb, kann TNF- $\alpha$  als alleiniger Effektormechanismus, über den dieser Unterschied vermittelt wird, ausgeschlossen werden.

### **3.3.12 Einfluss von B-Zellen während der *P. yoelii* NL-Infektion BTLA-defizienter Mäuse**

B-Zellen sind entscheidend an der Beseitigung der Parasitämie *P. yoelii* NL-infizierter Mäuse beteiligt (Burns, Dunn et al. 1997). Da die vorangegangenen Versuche Hinweise auf verbesserte nicht-humorale Effektormechanismen BTLA-defizienter Mäuse geliefert hatten, sollte untersucht werden, ob B-Zellen auch dann unverzichtbar sind, wenn die restlichen Leukozytenpopulationen BTLA-defizient und somit potentiell reaktiver sind.

Dies ist möglich durch Verwendung von  $J_H$ T-Mäusen, die keine reifen B-Zellen besitzen (Gu, Zou et al. 1993). Für die entsprechenden Experimente mussten Mäuse generiert werden, die weder reife B-Zellen besitzen noch BTLA exprimieren. Diese Mauslinie wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Verpaarung von  $J_H$ T-Mäusen mit BTLA-defizienten Mäusen hergestellt. Die Abwesenheit von B-Zellen sowie BTLA in diesen Mäusen wurde durch durchflusszytometrische Analyse von Blutlymphozyten sichergestellt.

Nach Infektion entwickelte sich sowohl in B-Zell defizienten  $J_H$ T-Mäusen als auch in BTLA- und B-Zell-defizienten  $J_H$ T-BTLA-KO Mäusen eine fulminante Parasitämie, so dass die Mäuse nach dem 15. Tag nach Infektion getötet werden mussten. Während des Verlaufs der Infektion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Parasitämie (Abb. 21). B-Zellen bleiben also auch dann essentiell für die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL, wenn alle anderen Zellpopulationen BTLA-defizient sind.

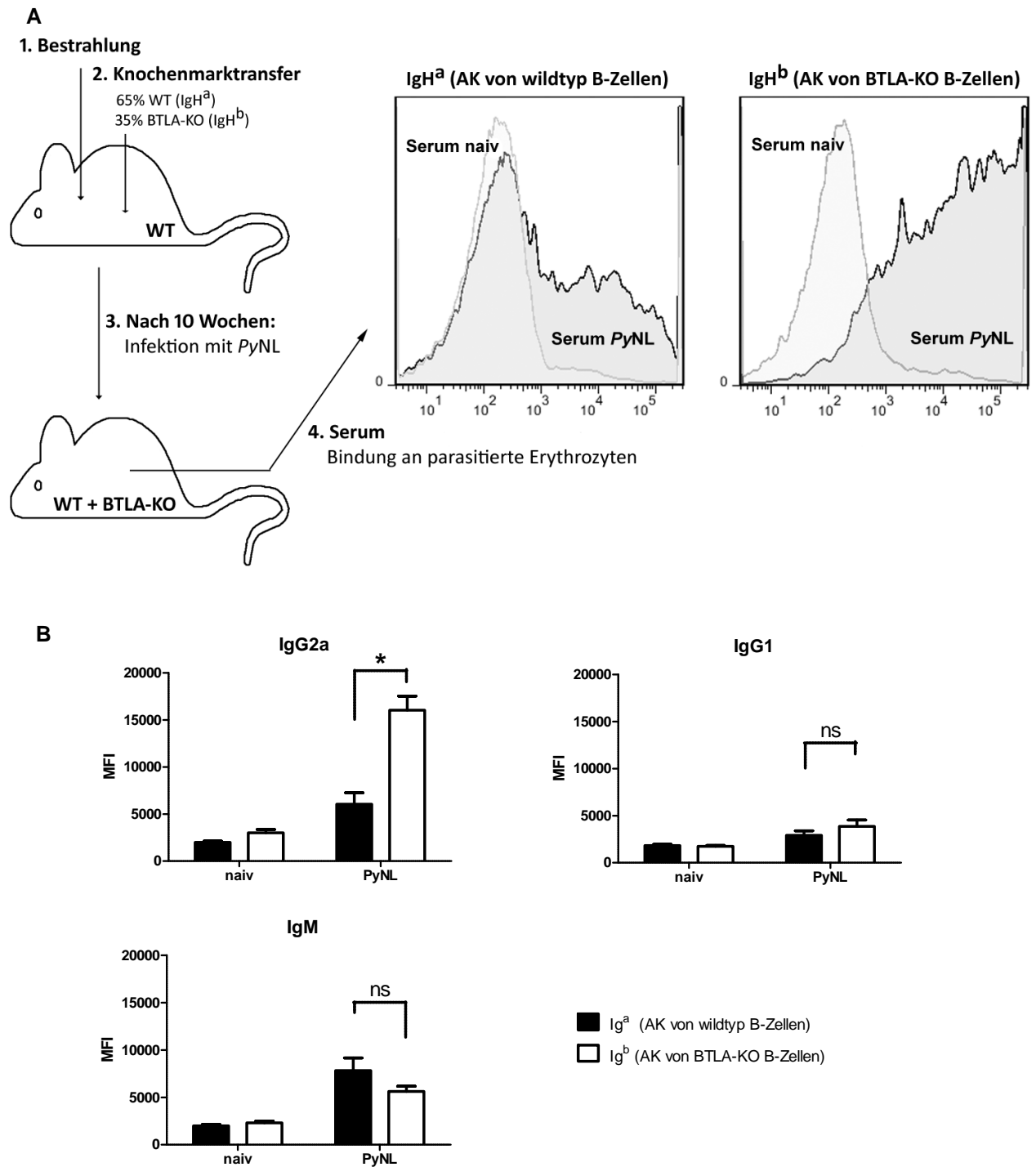


**Abb. 21: B-Zellen sind essenziell für die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL, unabhängig von BTLA-Expression auf anderen Zellen**

J<sub>H</sub>T und J<sub>H</sub>T-BTLA-KO Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Während des Verlaufs der Infektion wurde die Parasitämie bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der kumulierten Ergebnisse zweier unabhängiger Versuche (n=7).

### 3.3.13 Einfluss von BTLA auf die Effektormechanismen von B-Zellen während der *P. yoelii* NL-Infektion

B-Zellen sind die Zellen mit der höchsten BTLA-Expression und sind für die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL unverzichtbar (Burns, Dunn et al. 1997). Um den Einfluss von B-Zell-exprimiertem BTLA auf die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL zu untersuchen, sollte der Einfluss von BTLA auf die humorale Immunantwort während der Infektion analysiert werden. Um einen Einfluss der unterschiedlichen Parasitämie während der Infektion in BTLA-defizienten und -suffizienten Mäusen, sowie den Einfluss von BTLA, welches von nicht-B-Zellen exprimiert wird, auszuschließen, wurden die Untersuchungen wie bereits bei der Untersuchung der Zytokinantwort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter Verwendung von knochenmarkchimären Mäusen durchgeführt. 10 Wochen nach dem Transfer von 35% BTLA-



**Abb. 22: BTLA inhibiert die humorale Immunantwort gegen *P. yoelii* durch einen B-Zellintrinsic Mechanismus**

Gemischt knochenmarkchimäre Mäuse, die durch Transfer von 35% BTLA-KO- und 65% Wildtyp-Knochenmark (kongen für IgH<sup>a</sup>) generiert worden waren, wurden 10 Wochen nach Transfer intraperitoneal mit  $2 \cdot 10^6$  mit *P. yoelii* NL infizierten Erythrozyten infiziert. Die Antikörperproduktion von BTLA-KO- und Wildtyp-B-Zellen in einzelnen chimären Mäusen wurde verglichen, indem die Bindung der Antikörper in den Immunsera der Chimären (Tag 12 nach Infektion) auf antikörper-naiven parasitierten Erythrozyten durchflusszytometrisch quantifiziert wurde. Die unterschiedliche Bindung ist beispielhaft dargestellt (A). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für die Isotypen IgG2a, IgG1 und IgM dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde unter Anwendung des Student's t-test (paired, two-tailed) analysiert (naiv: n=11, PyNL IgM: n=4, PyNL IgG2a: n=3, PyNL IgG1: n=4) (B).

defizientem und 65% BTLA-suffizientem Knochenmark in letal bestrahlte Empfängermause wurden diese mit *P. yoelii* NL infiziert. Zum Zeitpunkt der Infektion waren 42% der B-Zellen BTLA-defizient. Die BTLA-suffizienten Knochenmarkzellen besaßen ein anderes Allel des Gens, das für die schwere Kette der Antikörper kodiert. Während der Immunantwort produzierten die BTLA-defizienten und –suffizienten B-Zellen in einer Empfängermaus daher unterschiedliche Antikörper, die von Sekundärantikörpern allotypspezifisch gebunden und somit unterschieden werden können. Zur Quantifizierung der Antikörperproduktion der BTLA-defizienten und –suffizienten B-Zellen wurde 12 Tage nach der Infektion Serum aus dem Blut der Chimären gewonnen. Gleichzeitig wurden parasitierte Erythrozyten aus *P. yoelii* NL-infizierten B-Zell-defizienten J<sub>H</sub>T-Mäusen gewonnen. Diese wurden mit dem Immenserum aus den Chimären kokubiert, so dass die im Immenserum enthaltenen Antikörper an die parasitierten Erythrozyten binden konnten. Die Bindung wurde anschließend durch Färbung mit allotypspezifischen Antikörpern und durchflusszytometrische Untersuchung quantifiziert (Abb. 22 **A**). Bei der Untersuchung des IgG2a-Isotyps zeigte sich, dass die Bindungsaktivität von Antikörpern, die von BTLA-defizienten B-Zellen produziert worden waren, dreimal so hoch war, wie die Bindungsaktivität von Antikörpern, die von BTLA-exprimierenden B-Zellen produziert worden waren (Abb. 22 **B**). Die Bindungsaktivität ist dabei ein Parameter, der sich aus der Menge und der Avidität der Antikörper zusammensetzt.

Bei der Untersuchung von Antikörpern des IgM-Isotyps ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Auch die Untersuchung von Antikörpern des IgG1-Isotyps ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied, es deutete sich jedoch eine leicht gesteigerte Bindungsaktivität von Antikörpern aus BTLA-defizienten B-Zellen an.

## 4 Diskussion

### ***4.1 Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen P. berghei ANKA***

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass BTLA der Entstehung immunpathologischer Komplikationen der Malaria entgegen wirkt. Die Applikation eines agonistisch wirkenden, gegen BTLA gerichteten Antikörpers reduzierte die Inzidenz zerebraler Malaria von ungefähr 80% auf 15% (Lepenius, Pfeffer et al. 2007). Dieser Effekt trat auch in HVEM-defizienten Mäusen auf, so dass eine Blockade der BTLA-HVEM-Interaktion durch den Antikörper als Wirkmechanismus ausgeschlossen werden kann. Ob während der Malariainfektion Wechselwirkungen zwischen BTLA und HVEM ohne Einwirkung eines Antikörpers die Entwicklung immunpathologischer Komplikationen der Infektion begrenzen oder die protektive Immunantwort behindern, konnte jedoch nicht geklärt werden. Aus diesem Grund sollte der Verlauf der *P. berghei* ANKA-Infektion in BTLA-defizienten Mäusen untersucht werden. Wenn die Interaktion zwischen endogenem BTLA und HVEM an der Beherrschung der Immunpathologie beteiligt ist, müsste die Inzidenz zerebraler Malaria in BTLA-defizienten Mäusen erhöht sein. Da jedoch nicht nur 80%, sondern alle Wildtyp-Mäuse während des Versuchs zerebrale Malaria entwickelten, erwies sich dieses Modell als ungeeignet, um eine Erhöhung der Inzidenz nachzuweisen. Zwar gab es Anzeichen dafür, dass die zerebrale Malaria in BTLA-defizienten Mäusen geringfügig früher eintrat und die Konzentration von Lebertransaminasen leicht erhöht war, diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Als Maß für die protektive Immunantwort wurde 6 Tage nach der Infektion die Parasitämie bestimmt. Die Parasitämie war in BTLA-defizienten Mäusen ebenso hoch wie in BTLA-suffizienten Mäusen und somit unbeeinflusst von BTLA. Die Parasitämie kann jedoch nur innerhalb der ersten Woche nach Infektion untersucht werden, da die Mäuse nach 7 Tagen an zerebraler Malaria versterben. Ob BTLA die protektive Immunantwort im weiteren Verlauf der Infektion beeinflussen würde, kann in diesem Modell daher nicht untersucht werden.

## **4.2 Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen *P. berghei* NK65**

*P. berghei* NK65 verursacht in C57BL/6-Mäusen keine zerebrale Malaria. Die Parasitämie steigt nach der Infektion langsam an und erreicht nach etwa 3 Wochen ein Ausmaß, das zum Tod der Mäuse führt. Untersuchungen, in denen C57BL/6-Mäuse mit bestrahlungsattenuiertem *P. berghei* NK65 (*P. berghei* XAT) infiziert wurden erbrachten Hinweise darauf, dass die protektive Immunantwort gegen die Blutphase von der Produktion von IL-12 und IFN- $\gamma$  abhängt, wohingegen die Produktion von Stickoxid nicht essentiell ist (Yoshimoto, Yoneto et al. 1998; Yoneto, Yoshimoto et al. 1999). Die Depletion von IL-12 unterdrückte hierbei die Produktion von IFN- $\gamma$  und revertierte den durch Attenuierung nicht-letalen zu einem letalen Infektionsverlauf. Diese protektiven Mechanismen sind allerdings auch an der Entstehung von Immunpathologie beteiligt. So verlängerte die Depletion von IL-12 während der Infektion mit nicht attenuiertem *P. berghei* NK65 das Überleben und verminderte den Leberschaden, der sich während der Infektion entwickelt und eine Woche nach Infektion messbar war (Yoshimoto, Takahama et al. 1998). Da dieselben Mechanismen sowohl Protektion als auch Pathologie vermitteln, ist ihre Regulation von besonderer Bedeutung und bei Fehlregulation sind deutliche Auswirkungen auf den Infektionsverlauf zu erwarten. Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *P. berghei* NK65 bietet sich daher als sensitives Modell zur Untersuchung der Auswirkung immunmodulierender Mechanismen an. Der Einfluss von BTLA auf die Immunantwort gegen *P. berghei* NK65 wurde durch Infektion BTLA-defizienter und -suffizienter Mäuse untersucht. Es zeigte sich, dass die Parasitämie in der Endphase der Infektion in Abwesenheit von BTLA verringert war. Dies belegt, dass BTLA die protektive Immunantwort gegen *P. berghei* NK65 dämpft. Es ergaben sich jedoch keine Anzeichen für eine Verstärkung immunpathologischer Mechanismen in Abwesenheit von BTLA, da in BTLA-defizienten Mäusen weder die Konzentration von Lebertransaminasen im Blut als Anzeichen eines immuninduzierten Leberschadens erhöht noch die Überlebensdauer der Mäuse verkürzt war. Das Aufheben der BTLA-vermittelten Dämpfung der Immunantwort hat während der Blutphase der *P. berghei* NK65-Infektion also eine ausschließlich vorteilhafte Wirkung. Das Ausbleiben immunpathologischer Auswirkungen bei Abwesenheit von BTLA während der Infektion steht in starkem Gegensatz zu den weitreichenden immunpathologischen Komplikationen, die sich bei Unterbrechung der CTLA-4-vermittelten Signale während der Blutphase der *P. berghei* ANKA-Infektion einstellen. So erhöht die

Blockierung von CTLA-4 mittels eines Antikörpers die Inzidenz zerebraler Malaria drastisch und verursacht einen Leberschaden (Jacobs, Graefe et al. 2002). Dies ist ein Hinweis auf das unterschiedliche inhibitorische Potential von CTLA-4 und BTLA. CTLA-4 scheint ein Hauptregulator der T-Zellaktivierung zu sein, wohingegen die koinhibitorische Wirkung von BTLA subtilerer Art ist.

### **4.3 Auswirkung der BTLA-Defizienz auf die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL**

Im Gegensatz zu den Infektionen mit *P. berghei* ANKA und *P. berghei* NK65 wird die Infektion mit *P. yoelii* NL von C57BL/6-Mäusen beherrscht und innerhalb von 3 Wochen beseitigt. Es handelt sich also um ein Modell einer erfolgreichen Immunantwort. Da in diesem Modell die protektiven Mechanismen der Immunantwort am stärksten zum Tragen kommen, ist es zur Untersuchung der BTLA-vermittelten Regulation dieser Mechanismen besonders geeignet. Im Verlauf der Infektion wurde zudem eine starke Induktion von BTLA und HVEM auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und von BTLA auf B-Zellen gefunden. Aus diesen Gründen wurde der Verlauf der *P. yoelii* NL-Infektion in BTLA-defizienten Mäusen untersucht. In Abwesenheit von BTLA war die Parasitämie über den gesamten Verlauf der Infektion stark erniedrigt und wurde zudem 3-6 Tage früher beseitigt als in Wildtyp-Mäusen. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die Blockierung des inhibitorischen Signals, das durch den koinhibitorischen Rezeptor CTLA-4 vermittelt wird, die Parasitämie während der Blutphase der *P. yoelii* NL-Infektion vermindert (Lepenius, Gaworski et al. 2007). Die inhibitorische Wirkung von CTLA-4 ist deutlich höher als die von BTLA vermittelte. So entwickeln CTLA-4 defiziente Mäuse wenige Wochen nach der Geburt letale Autoimmunerkrankungen, wohingegen BTLA-defiziente Mäuse über Monate keinerlei Anzeichen von Immunpathologie zeigen (Tivol, Borriello et al. 1995; Han, Goularte et al. 2004; Oya, Watanabe et al. 2008; Liu, Alexiou et al. 2009). Die Immunantwort gegen die Blutphase der *P. yoelii* NL-Infektion wird jedoch durch BTLA-Defizienz weitaus stärker verbessert als durch Blockierung von CTLA-4. Da selbst die kurzzeitige CTLA-4-Blockade während der Infektion Immunpathologie in Form eines Leberschadens verursachen kann, wurden die BTLA-defizienten Mäuse während der Infektion hierauf untersucht. Es zeigte sich jedoch keine Erhöhung der Konzentrationen von Lebertransaminasen im Blut. Dies legt nahe, dass die Verbesserung der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL durch Abwesenheit von BTLA nicht nur stärker, sondern auch spezifischer

ist als durch die Blockierung von CTLA-4. Möglicherweise beruht diese höhere Spezifität darauf, dass BTLA im Gegensatz zu CTLA-4 auf mehreren Zellpopulationen exprimiert wird, die an einer protektiven Immunantwort gegen *P. yoelii* NL beteiligt sind. Der Wegfall einer moderat koinhibitorischen Wirkung durch BTLA auf mehreren protektiven Zellpopulationen könnte dabei günstiger sein als der Wegfall einer stark koinhibitorischen Wirkung durch CTLA-4 auf T-Zellen.

Nach heutigem Wissensstand interagiert BTLA exklusiv mit seinem Rezeptor HVEM. Diese Interaktion verursacht einerseits ein aktivierendes Signal in Richtung der HVEM-exprimierenden Zelle. So konnte nach Bindung von BTLA an HVEM die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern der HVEM-exprimierenden Zelle nachgewiesen werden (Cheung, Steinberg et al. 2009). Andererseits wird durch die Ligation von BTLA ein koinhibitorisches Signal in Richtung der BTLA-exprimierenden Zelle ausgelöst (Watanabe, Gavrieli et al. 2003; Han, Goularte et al. 2004). Da die Proliferation und Zytokinsekretion von BTLA-defizienten, HVEM-suffizienten T-Zellen im Vergleich zu BTLA- und HVEM-suffizienten T-Zellen erhöht ist, überwiegt das koinhibitorische Signal von BTLA im Vergleich zum aktivierenden Signal von HVEM (Watanabe, Gavrieli et al. 2003; Han, Goularte et al. 2004; Liu, Alexiou et al. 2009). Im Gegensatz zu BTLA interagiert HVEM zusätzlich mit einer Reihe weiterer Liganden. So führt die Interaktion von HVEM mit LIGHT zu einem kostimulatorischen Signal in beide Richtungen (Harrop, Reddy et al. 1998; Wang, Lo et al. 2001; Liu, Schmidt et al. 2003; Cheung, Steinberg et al. 2009). Dieses komplexe regulatorische Netzwerk wird also auch durch Signale, die von HVEM nach Bindung an BTLA in der HVEM-exprimierenden Zelle geleitet werden und die Signale, die HVEM durch Interaktion mit anderen Liganden vermittelt, beeinflusst. Eine veränderte Expressionsstärke von HVEM würde daher die Wirkung des regulatorischen Netzwerks beeinflussen. Durch Vergleich der Expressionsstärke von HVEM in BTLA-defizienten und –suffizienten Mäusen zeigte sich, dass diese auf den T-Zellen BTLA-defizienter Mäusen deutlich erhöht ist. Hierbei könnte es sich um eine vergebliche kompensatorische Gegenregulation des Organismus handeln, um die verlorene koinhibitorische Wirkung von BTLA auszugleichen. Die in BTLA-defizienten Mäusen beobachtete Verbesserung der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL muss daher nicht ausschließlich auf der gedämpften Koinhibition durch Abwesenheit von BTLA beruhen, sondern kann zusätzlich durch Verstärkung kostimulatorischer Signale durch Überexpression von HVEM vermittelt werden. In Wildtyp-Mäusen liegen HVEM und BTLA hauptsächlich in



*cis*-Komplexen vor, welche LIGHT-induzierte aktivierende Signale in Richtung der HVEM-exprimierenden Zelle verhindern (Cheung, Osborne et al. 2009). In BTLA-defizienten Mäusen wird HVEM nicht durch *cis*-Interaktion mit BTLA abgeschirmt. Das durch Überexpression von HVEM in BTLA-defizienten Mäusen ohnehin erhöhte kostimulatorische Potential von HVEM wird hierdurch noch weiter erhöht.

Die Beteiligung des erhöhten kostimulatorischen Potentials von HVEM in BTLA-defizienten Mäusen an der in BTLA-defizienten Mäusen beobachteten Verbesserung der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL wurde durch Infektion von HVEM-defizienten Mäusen untersucht. Hier fehlen neben den BTLA-vermittelten koinhibitorischen Signalen auch alle HVEM-vermittelten kostimulatorischen Signale. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen war die Parasitämie in HVEM-defizienten Mäusen nur in der zweiten Hälfte des Infektionsverlaufs verringert. Dies legt eine Beteiligung der kostimulatorischen HVEM-LIGHT-Interaktion an der frühen protektiven Immunantwort gegen *P. yoelii* NL nahe, da in der frühen Phase der Infektion die Abwesenheit des kostimulatorischen Signals den in BTLA-defizienten Mäusen beobachteten günstigen Effekt der Abwesenheit der koinhibitorischen BTLA-HVEM-Interaktion aufhebt. Zusätzlich wird hierdurch nahe gelegt, dass die kostimulatorische Wirkung der HVEM-LIGHT-Interaktion die koinhibitorische Wirkung der HVEM-CD160-Interaktion übertrifft, weil sich bei zusätzlicher Unterbrechung beider Wechselwirkungen die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL im Vergleich zur Situation bei alleiniger Unterbrechung der HVEM-BTLA-Interaktion verschlechtert und nicht verbessert. LIGHT bindet neben HVEM allerdings auch an den Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor und diese Interaktion könnte in HVEM-defizienten Mäusen verändert sein. Ein Einfluss der LIGHT-Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor-Interaktion auf die Immunantwort ist zumindest im *P. berghei* ANKA-Infektionsmodell bekannt (Randall, Amante et al. 2008). Ob diese Interaktion den in der *P. yoelii* NL-Infektion beobachteten Phänotyp von HVEM-defizienten Mäusen beeinflusst, müsste durch *P. yoelii* NL-Infektion von LIGHT-defizienten Mäusen näher untersucht werden.

Da die Unterbrechung der BTLA-HVEM-Interaktion eine deutliche Verbesserung der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL bewirkt hatte, sollte die Bedeutung von BTLA für die Immunregulation auch durch experimentelle Ligation von BTLA während der Infektion untersucht werden. Dies geschah durch Applikation eines gegen BTLA gerichteten monoklonalen Antikörpers, von dem bekannt ist, dass er die BTLA-HVEM-Interaktion nicht

blockiert, sondern nach Bindung an BTLA koinhibitorische Signale über BTLA induziert (Lepeniev, Pfeffer et al. 2007; Albring, Sandau et al. 2010). Die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL wurde durch Gabe des Antikörpers in Mengen, die in anderen Modellen deutliche immunmodulatorische Effekte gezeigt hatten, jedoch nicht verändert. Dieses Versuchsergebnis legt nahe, dass BTLA im Verlauf der Infektion durch Interaktion mit HVEM bereits vollständig ligiert ist, so dass keine zusätzliche Ligandbindung durch den Antikörper stattfinden kann. Im Verlauf der *P. yoelii* NL-Infektion wurde eine deutliche Erhöhung der BTLA-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen festgestellt. Auch dieses zusätzliche BTLA scheint während der Infektion also vollständig durch HVEM ligiert zu werden, was eine Erklärung für den starken Einfluss von BTLA auf die Immunantwort sein kann.

An der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL sind eine Vielzahl von Effektormechanismen beteiligt (Li, Seixas et al. 2001; Langhorne, Quin et al. 2002). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten daher Immunmechanismen identifiziert werden, die in Abwesenheit von BTLA verändert sind. Ziel war die Erlangung von Erkenntnissen sowohl darüber, welche Effektormechanismen generell von BTLA moduliert werden können als auch, welche Effektormechanismen die verbesserte Immunantwort in BTLA-defizienten Mäusen vermitteln.

Da die Produktion und Sezernierung von Zytokinen ein zentraler Mechanismus der Koordinierung und Regulierung von Immunantworten ist, wurde zunächst die Zytokinantwort in Abwesenheit von BTLA untersucht. Im Vergleich der Serumkonzentration verschiedener Zytokine BTLA-defizienter und –suffizienter Mäuse konnten keine Unterschiede gefunden werden. Erst mittels des sensitiveren Nachweises der Zytokinproduktion auf Einzelzellebene konnte während der Infektion ein erhöhter Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender NK- bzw. NKT-Zellen in BTLA-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Da IFN- $\gamma$  zentrale Bedeutung für die Aktivierung phagozytischer Zellen besitzt, die ihrerseits entscheidend an der Beseitigung parasitierter Erythrozyten beteiligt sind, ist eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion als Effektormechanismus, der die verbesserte Immunantwort in BTLA-defizienten Mäusen vermittelt, prinzipiell vorstellbar. Der Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL ist jedoch nicht eindeutig. Einerseits wird während der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL die Produktion von IFN- $\gamma$  induziert. Im Vergleich zu Infektionen mit anderen Plasmodien-Stämmen ist die IFN- $\gamma$ -Induktion hier sogar besonders

ausgeprägt (Shear, Srinivasan et al. 1989; De Souza, Williamson et al. 1997). Verschiedene Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass die Parasitämie in IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen anfangs nicht erhöht, sondern sogar verringert ist. In der Endphase der Infektion begünstigt IFN- $\gamma$  jedoch die Beseitigung der Infektion (van der Heyde, Pepper et al. 1997; Couper, Blount et al. 2007; Soulard, Roland et al. 2009). Die Beteiligung von IFN- $\gamma$  an der Reduktion der Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen wurde durch Depletion von IFN- $\gamma$  während der Infektion untersucht. Hierbei wurde weder in BTLA-defizienten noch in BTLA-suffizienten Mäusen ein Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die Parasitämie gefunden. Die Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen war weiterhin niedriger, als in BTLA-suffizienten Mäusen. Eine vermehrte Produktion von IFN- $\gamma$  als alleinige Ursache für die reduzierte Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen kann daher ausgeschlossen werden.

Als zentrale Auswirkung BTLA-vermittelter Signale wurde in einer Vielzahl von Arbeiten die Verminderung der Proliferation nach Aktivierung von Lymphozyten in der Maus wie auch im Menschen beschrieben (Watanabe, Gavrieli et al. 2003; Han, Goularte et al. 2004; Krieg, Han et al. 2005; Sedy, Gavrieli et al. 2005; Chemnitz, Lanfranco et al. 2006; Wang, Chen et al. 2007). Wie aus der bereits zu Beginn der *P. yoelii* NL-Infektion verringerten Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen hervorgeht, ist die Immunantwort durch Abwesenheit von BTLA bereits sehr früh verbessert. Da Proliferation eine der frühesten Antworten auf Aktivierung von Lymphozyten darstellt, könnte BTLA durch Modulation der Leukozytenproliferation in der Frühphase der Infektion die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL beeinflussen. Um dies zu untersuchen wurde die Zellzahl der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen in den Milzen BTLA-defizienter und -suffizienter Mäuse in der Frühphase der Infektion verglichen. In den ersten 3-4 Tagen nach Infektion wurden deutliche Unterschiede in der infektionsinduzierten Akkumulation von Leukozyten in den Milzen BTLA-defizienter und -suffizienter Mäuse gefunden. In Gegenwart BTLA-vermittelter Signale kam es in dieser Phase zu einer Kontraktion der Milz, die Zellzahl in der Milz nahm deutlich ab. In Abwesenheit von BTLA war hingegen eine frühe und stetige Zunahme der Zellzahlen zu beobachten, so dass die Milzen BTLA-defizienter Mäuse teilweise über 50% mehr Zellen enthielten als die Milzen BTLA-suffizienter Mäuse. Die Anteile der einzelnen Milzzellpopulationen blieben dabei sowohl während der Kontraktion als auch während der Expansion konstant. Zwar kann die vermehrte Akkumulation von Milzzellen in BTLA-defizienten Mäusen hierbei nicht nur auf vermehrter Proliferation, sondern auch auf

veränderter Migration, vermindertem Zelltod oder auf einer Kombination dieser Faktoren beruhen. Das Resultat ist jedoch in jedem Fall eine erhöhte Anzahl potentieller Effektorzellen in dem Organ, dem die zentrale Rolle bei der Bekämpfung der Infektion zugeschrieben wird. Die immunologische Relevanz der erhöhten Zellzahlen in BTLA-defizienten Mäusen wird durch das Untersuchungsergebnis bestätigt, dass der Anteil aktivierter  $CD4^+$  T-Zellen in den expandierten Milzen BTLA-defizienter Mäuse ebenso hoch war, wie in Wildtyp-Mäusen. Zumindest für  $CD4^+$  T-Zellen entspricht somit die erhöhte Zellzahl auch einer erhöhten Anzahl aktivierter Zellen, welche Effektormechanismen gegen die Infektion initiieren können. Da die Vermehrung der Merozoiten im Blut ohne immunologische Intervention prinzipiell exponentiell verlaufen würde, hat eine früh einsetzende Immunantwort den größten Einfluss auf die Entwicklung der Parasitämie. Obwohl die Milzzellzahlen in Wildtyp-Mäusen spätestens am 6. Tag nach Infektion die Zahl in BTLA-defizienten Mäusen wieder erreichen, könnte die Zellzahldifferenz bis zu diesem Zeitpunkt daher ursächlich sein für den Unterschied in der Parasitämie, der sich vom 6. Tag nach Infektion an offenbart.

Inwieweit die erhöhte Anzahl von  $CD4^+$  T-Zellen hieran beteiligt ist, wurde durch Depletion dieser Zellpopulation während des gesamten Infektionsverlaufs untersucht. Hierdurch konnte belegt werden, dass  $CD4^+$  T-Zellen ab dem 6. Tag der Infektion unerlässlich für eine erfolgreiche Immunantwort sind. Auch BTLA-defiziente Mäuse können ab diesem Zeitpunkt die Parasitämie ohne  $CD4^+$  T-Zellen nicht mehr kontrollieren. Im Zusammenhang mit der erhöhten Anzahl aktivierter  $CD4^+$  T-Zellen in BTLA-defizienten Mäusen in der Frühphase der Infektion untermauert dies die Hypothese, dass  $CD4^+$  T-Zellen ein zentraler Angriffspunkt der BTLA-vermittelten Immunmodulation sind, die die verringerte Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen verursacht. Die Parasitämie BTLA-defizienter Mäuse war bis zum 6. Tag nach Infektion jedoch unabhängig von der An- oder Abwesenheit von  $CD4^+$  T-Zellen unverändert stark reduziert. Die Effektormechanismen, die diesen frühen Unterschied in der Parasitämie verursachen, müssen also von anderen Zellpopulationen vermittelt werden. Dies schließt jedoch nicht aus, dass die beobachtete erhöhte Anzahl aktivierter  $CD4^+$  T-Zellen in BTLA-defizienten Mäusen in der Frühphase der Infektion an der der späteren,  $CD4^+$  T-Zell-vermittelten Reduktion der Parasitämie beteiligt ist.

Da die in BTLA-defizienten Mäusen bis zum 6. Tag nach Infektion verringerte Parasitämie nicht von  $CD4^+$  T-Zellen vermittelt wird, sollte die verantwortliche Zellpopulation identifiziert

werden. Das frühe Auftreten des Unterschieds legt nahe, dass er von Mechanismen des angeborenen Immunsystems vermittelt wird, da diese im Unterschied zu Mechanismen der adaptiven Immunantwort keine mehrtägige Initiationsphase durchlaufen müssen. Durch Vergleich der Infektionsverläufe in BTLA-suffizienten und –defizienten Mäusen, die durch zusätzliche RAG1-Defizienz kein adaptives, sondern ausschließlich das angeborene Immunsystem besitzen, wurde der Einfluss von BTLA auf die Immunantwort des angeborenen Immunsystems untersucht. Die Parasitämie wurde von RAG1-defizienten Mäusen zu Beginn der Infektion sogar besser kontrolliert, als von Wildtyp-Mäusen in den vorangegangenen Versuchen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der regulatorische Einfluss des adaptiven Immunsystems, der die Zytokinantwort des angeborenen Immunsystems abschwächt (Kim, Zhao et al. 2007). Durch Abwesenheit dieses regulatorischen Einflusses in RAG1-defizienten Mäusen könnte die angeborene Immunantwort daher verbessert sein. Im Vergleich der angeborenen Immunantworten BTLA-defizienter und –suffizienter Mäuse zeigte sich jedoch, dass die Abwesenheit von BTLA die Immunantwort signifikant verbesserte. Dies belegt, dass BTLA, welches von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird, die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL beeinträchtigt. NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen gehören zu den wenigen Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems, für die eine Expression von BTLA beschrieben ist (Han, Goularte et al. 2004). NK-Zellen haben in immunkompetenten Mäusen jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Immunantwort gegen die Blutphase der *P. yoelii* NL-Infektion, da ihre Depletion den Infektionsverlauf nicht verändert (Couper, Blount et al. 2007). Eine Beteiligung von NK-Zellen an der Reduktion der Parasitämie in Abwesenheit von BTLA, die durch das angeborene Immunsystem verursacht wird, ist daher nicht anzunehmen. Dendritische Zellen phagozytieren während der Infektion zwar parasitierte Erythrozyten, um T-Zellen antigenes Material präsentieren zu können. Dass die Phagozytose durch dendritische Zellen hierbei einen Hauptmechanismus zur direkten Reduzierung der Parasitämie darstellt, erscheint aufgrund der im Vergleich zu anderen phagozytischen Zellen geringen Zahl von dendritischen Zellen jedoch unwahrscheinlich. Daher ist auch die Beteiligung von dendritischen Zellen an der Vermittlung der reduzierten Parasitämie in BTLA- und RAG1-defizienten Mäusen nicht anzunehmen. Makrophagen phagozytieren während der Blutphase große Mengen parasitierter Erythrozyten, was durch die Akkumulation von unlöslichen Abbauprodukten in den Makrophagen im Verlauf der Blutphase verdeutlicht

wird. Makrophagen tragen am meisten zur Beseitigung *P. yoelii*-parasitierter Erythrozyten durch Phagozytose bei (Tosta und Wedderburn 1980). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass Makrophagen für die Reduktion der Parasitämie in BTLA-defizienten, RAG1-defizienten Mäusen verantwortlich sind.

Die Untersuchung der Milzzellpopulationen sowie die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Immunantwort gegen *P. yoelii* NL ergaben Hinweise auf eine umfangreiche Beteiligung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Vermittlung der unterschiedlichen Parasitämie zwischen BTLA-defizienten und –suffizienten Mäusen. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten daher die Mechanismen identifiziert werden, über die CD4<sup>+</sup> T-Zellen diesen Unterschied verursachen. Da die BTLA-Defizienz einer Zellpopulation auch Effektormechanismen anderer Zellpopulationen beeinflussen kann, wenn eine funktionelle Abhängigkeit zwischen diesen Zellpopulationen besteht, sollten dabei untersucht werden, inwieweit der Einfluss von BTLA zellpopulationsintrinsisch ist. Daher musste ein mittelbarer Einfluss der BTLA-Defizienz anderer Zellpopulationen auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort experimentell ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen in gemischt knochenmarkchimären Mäusen durchgeführt, deren adaptives Immunsystem zu etwa gleichen Teilen aus BTLA-defizienten und –suffizienten Zellen bestand. Hier ist der Einfluss des BTLA-defizienten und -suffizienten Umfelds für jede untersuchte Zelle gleich. Daher lassen sich gemessene Parameter einer einzelnen Zelle direkt der An- oder Abwesenheit der eigenen BTLA-Expression zuordnen. Da BTLA-defiziente und –suffiziente Zellen aus jeweils derselben Maus miteinander verglichen wurden, war zudem der Einfluss der Parasitämie exakt gleich, was die Interpretation der Messergebnisse stark vereinfacht. Der regulatorische Einfluss von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Immunantwort gegen Infektionen beruht zu großen Teilen auf der Produktion von immunregulatorischen Zytokinen. Daher wurde die Produktion von Zytokinen durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Infektion untersucht. Dies geschah 6 Tage nach Infektion, da ab diesem Zeitpunkt ein Einfluss von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf den Infektionsverlauf festgestellt worden war. Von der Produktion bis zur Wirkung von Zytokinen können einige Tage vergehen. Daher wurde die Zytokinproduktion auch bereits 3 Tage nach Infektion gemessen. Tatsächlich zeigte sich bereits 3 Tage nach Infektion, dass ein deutlich erhöhter Anteil der BTLA-defizienten T-Zellen IL-2 produzierte. IL-2 wird nach Aktivierung von T-Zellen produziert und erlaubt den Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase in die Synthesephase des Zellzyklus und somit die klonale Expansion antigenspezifischer T-Zellen (Cantrell und Smith 1984; Stern und Smith

1986). Die vermehrte IL-2-Produktion im BTLA-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellkompartiment deutet daher auf eine stärkere Expansion in Abwesenheit von BTLA hin. Dies legt nahe, dass die erhöhte Zahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die bei der Untersuchung der Milzzusammensetzung 3-4 Tage nach Infektion gefunden wurde, auf verstärkter Proliferation und weniger auf veränderter Migration oder Apoptose beruht. Es ist bekannt, dass Milzzellen während der Blutphase der Malaria in ihrer Fähigkeit, IL-2 zu produzieren, eingeschränkt sind, jedoch weiterhin auf IL-2 reagieren können (Lelchuk, Rose et al. 1984). Die therapeutische Applikation von rekombinantem IL-2 verbessert die nachfolgende Immunantwort und verringert die Parasitämie (Lucas, Kasper et al. 1996). Eine vermehrte Produktion von IL-2 durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Frühphase der Infektion könnte daher ein wichtiger Mechanismus bei der Verringerung der Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen sein. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis des Depletionsversuchs, dass IFN- $\gamma$  nicht für die verringerte Parasitämie BTLA-defizienter Mäuse verantwortlich ist, wurde kein wesentlich erhöhter Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen im BTLA-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellkompartiment gefunden. IL-4 wurde jedoch von einem deutlich höheren Anteil BTLA-defizienter als -suffizienter T-Zellen exprimiert. IL-4 ist essentiell für die Ausdifferenzierung von B-Zellen nach Aktivierung und ermöglicht so die Produktion hochaffiner Antikörper unterschiedlicher Isotypen. Auch der Anteil TNF- $\alpha$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen war 3 Tage nach Infektion im BTLA-defizienten Kompartiment erhöht. 6 Tage nach Infektion war der Anteil sogar mehr als doppelt so hoch wie unter den BTLA-exprimierenden Zellen. Der Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die Parasitämie während der Blutphase der Malariainfektion ist unklar. Die Expression von TNF- $\alpha$  ist Die Parasitämie während einer *P. chabaudi* AS-Infektion ist durch Depletion von TNF- $\alpha$  oder Abwesenheit des TNF-Rezeptors nicht wesentlich verändert (Jacobs, Radzioch et al. 1996; Sam, Su et al. 1999). Die Applikation von rekombinantem TNF- $\alpha$  kann jedoch die Parasitämie während einer *P. yoelii*-Infektion verringern, wobei TNF- $\alpha$  dies nicht direkt, sondern durch Initiierung nachfolgender Effektormechanismen oder synergistisch mit diesen verursacht (Taverne, Tavernier et al. 1987). Um zu überprüfen, ob TNF- $\alpha$  an der Reduzierung der Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen beteiligt ist, wurde es während der *P. yoelii* NL-Infektion depletiert. Da die Parasitämie sowohl in BTLA-defizienten wie in -suffizienten Mäusen hiervon unbeeinflusst war, die Parasitämie also auch in Abwesenheit von TNF- $\alpha$  in BTLA-defizienten Mäusen verringert blieb, kann TNF- $\alpha$  als alleinige Ursache ausgeschlossen werden.

Die vermehrte IL-4-Produktion BTLA-defizienter CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutet eine verbesserte humorale Immunantwort als Ursache für die verringerte Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen an. Die humorale Immunantwort ist für die Beseitigung der *P. yoelii* NL-Infektion unerlässlich, da B-Zelldefiziente Mäuse eine fulminante Parasitämie entwickeln und an der Infektion sterben (Burns, Dunn et al. 1997). Auch in BTLA-defizienten Mäusen ist der Erfolg der Immunantwort abhängig von B-Zellen, da B-Zellose J<sub>H</sub>T-Mäuse die Infektion auch in Abwesenheit von BTLA nicht beherrschen können. B-Zellen sind somit auch dann essenziell für eine erfolgreiche Immunantwort, wenn andere Zellpopulationen von BTLA-vermittelter Attenuierung befreit sind und ihrerseits die Immunantwort potentiell verbessern.

Über den Einfluss von BTLA auf die Antikörperantwort ist bislang nur wenig bekannt. Die Produktion von Antikörpern gegen T-Zellunabhängige Antigene scheint weitgehend unbeeinflusst von BTLA zu sein, da die Produktion von Antikörpern der Isotypen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgA nach NP-Ficoll-Immunisierung von BTLA-defizienten Mäusen nicht höher war als in BTLA-suffizienten Mäusen. Lediglich die Produktion von IgG3 war leicht erhöht (Hurchla, Sedy et al. 2005). Obwohl diese Modellimmunisierung nicht von direkter T-Zellhilfe abhängt, kann hierbei ein Einfluss des BTLA-defizienten Umfelds nicht ausgeschlossen werden. Immunisierung von BTLA-defizienten Mäusen mit dem T-Zellabhängigen Antigen NP-KLH belegte zwar eine substanziiell erhöhte Produktion von Antikörpern der Isotypen IgG1, IgG2a und IgG2b in Abwesenheit von BTLA, dieser Effekt wurde jedoch der durch BTLA-Defizienz verbesserten T-Zellhilfe zugeschrieben (Watanabe, Gavrieli et al. 2003).

Um zu untersuchen, ob eine verbesserte humorale Immunantwort an der Reduktion der Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen beteiligt ist, wurde die Produktion plasmodienspezifischer Antikörper BTLA-defizienter und –suffizienter B-Zellen während der Infektion verglichen. Die Untersuchung erfolgte in gemischt knochenmarkchimären Mäusen, so dass die BTLA-Expression anderer Zellpopulationen die Antikörperproduktion BTLA-defizienter und –suffizienter B-Zellen gleichermaßen beeinflusste, was die Untersuchung der B-zellintrinsic Wirkung von BTLA auf die Antikörperproduktion ermöglichte. Insbesondere wäre ein Einfluss der BTLA-Expression von folliculären T-Helferzellen auf die Antikörperproduktion zu erwarten gewesen. Diese Zellen vermitteln in den Keimzentren der lymphatischen Organe die T-Zellhilfe für die B-Zellreifung und werden durch ihre BTLA-



Expression attenuiert, was die nachfolgende Antikörperantwort abschwächt (Kashiwakuma, Suto et al. 2010). Untersucht wurde die Produktion von Antikörpern der Isotypen IgM, IgG1 und IgG2a. IgG2a-Antikörper scheinen für die Immunantwort gegen *P. yoelii* NL die größte Bedeutung zu haben, da der Transfer von Antikörpern dieses Isotyps die Parasitämie während einer *P. yoelii* NL-Infektion deutlich verzögert (White, Evans et al. 1991). Auch Antikörper des IgG1-Isotyps können die Parasitämie verzögern, wenn auch in erheblich geringerem Maße. 12 Tage nach der Infektion wurde keine erhöhte Produktion von plasmodienspezifischen Antikörpern der Isotypen IgM und IgG1 durch BTLA-defiziente B-Zellen festgestellt. Die Produktion von IgG1-Antikörpern erreicht allerdings erst ca. 3 Wochen nach Infektion ihren Höhepunkt, so dass ein späterer Zeitpunkt zur Untersuchung unterschiedlicher IgG1-Antikörperproduktion erfolgversprechender wäre (Langhorne, Evans et al. 1984; Smith und Taylor-Robinson 2003). Die Produktion von plasmodienspezifischen Antikörpern des IgG2a-Isotyps durch BTLA-defiziente B-Zellen war jedoch dreimal so hoch, wie durch BTLA-exprimierende B-Zellen. Dies belegt erstmals einen B-zellintrinsic Einfluss von BTLA auf die Antikörperantwort gegen T-zellabhängige Antigene und untermauert die Beteiligung von BTLA auf B-Zellen an der Vermittlung der unterschiedlichen Parasitämie BTLA-defizienter und –suffizienter Mäuse.

## 5 Zusammenfassung

BTLA ist ein koinhibitorischer Rezeptor mit wichtigen Funktionen bei der Begrenzung überschießender Immunreaktionen. Auch an der Beherrschung immunpathologischer Komplikationen während einer Malariainfektion ist BTLA beteiligt (Lepenes, Pfeffer et al. 2007). Der Einfluss von BTLA auf die Regulation der protektiven Immunantwort gegen die Blutphase der Malaria war jedoch noch weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BTLA die protektiven Mechanismen der Immunantwort gegen verschiedene Plasmodienstämme inhibiert, da in Abwesenheit von BTLA die Immunantwort verbessert ist. Der Einfluss anderer kostimulatorischer Moleküle, die ebenfalls Bestandteil des regulatorischen Systems um den BTLA-Rezeptor HVEM sind, konnte dabei von der Wirkung von BTLA abgegrenzt werden. Im Modell der Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *Plasmodium yoelii* NL wurde demonstriert, dass BTLA die protektiven Mechanismen unterschiedlicher Leukozytenpopulationen inhibiert. Zellen des angeborenen Immunsystems sind in Abwesenheit von BTLA auf diesen Zellen besser in der Lage, die Parasitämie im Verlauf der Blutphase zu verringern. Trotz der verbesserten angeborenen Immunantwort in Abwesenheit von BTLA bleiben sowohl T-Zellen als auch B-Zellen unverzichtbar für eine erfolgreiche Immunantwort, wie durch Depletion dieser Zellpopulationen belegt wurde. Die Untersuchung der Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte, dass BTLA während der Blutphase der Malaria in CD4<sup>+</sup> T-Zellintrinsischer Weise die Produktion der Zytokine IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 und in geringerem Maße auch IFN- $\gamma$  hemmt. Eine Beteiligung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  an der Reduktion der Parasitämie in BTLA-defizienten Mäusen konnte durch *in vivo*-Depletionsexperimente jedoch ausgeschlossen werden. Die verstärkte Produktion des Proliferation-induzierenden Zytokins IL-2 in Abwesenheit von BTLA steht in Einklang mit der beschleunigten Expansion von Milzzellen, die in der Frühphase der Infektion in BTLA-defizienten Mäusen beobachtet wurde. Die humorale Immunantwort während der Immunantwort gegen die Blutphase der *P. yoelii* NL-Infektion wird nicht nur T-Zellseitig über Verminderung der IL-4-Produktion durch BTLA attenuiert. BTLA vermindert darüber hinaus in B-Zellintrinsischer Weise die Produktion *P. yoelii* NL-spezifischer Antikörper des protektiven Isotyps IgG2a. Die Verbesserung der Immunantwort gegen die Blutphase der Malaria durch Abwesenheit von BTLA geht nicht einher mit vermehrter Induktion von Immunpathologie. Dies untermauert die Eignung des HVEM-BTLA-Signalwegs als Ziel therapeutischer Intervention.

## 6 Literatur

- Albring, J. C., M. M. Sandau, et al. (2010). "Targeting of B and T lymphocyte associated (BTLA) prevents graft-versus-host disease without global immunosuppression." J Exp Med **207**(12): 2551-2559.
- Angus, B. J., K. Chotivanich, et al. (1997). "In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria." Blood **90**(5): 2037-2040.
- Anyona, S. B., S. L. Schrier, et al. (2006). "Pitting of malaria parasites and spherocyte formation." Malar J **5**: 64.
- Armitage, R. J., W. C. Fanslow, et al. (1992). "Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40." Nature **357**(6373): 80-82.
- Artavanis-Tsakonas, K. und E. M. Riley (2002). "Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes." J Immunol **169**(6): 2956-2963.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, et al. (2006). "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection." Nature **439**(7077): 682-687.
- Belnoue, E., M. Kayibanda, et al. (2002). "On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria." J Immunol **169**(11): 6369-6375.
- Berendt, A. R., D. L. Simmons, et al. (1989). "Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum." Nature **341**(6237): 57-59.
- Brown, K. E., G. J. Freeman, et al. (2010). "Role of PD-1 in regulating acute infections." Curr Opin Immunol **22**(3): 397-401.
- Bull, P. C. und K. Marsh (2002). "The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria." Trends Microbiol **10**(2): 55-58.
- Burns, J. M., Jr., P. D. Dunn, et al. (1997). "Protective immunity against Plasmodium yoelii malaria induced by immunization with particulate blood-stage antigens." Infect Immun **65**(8): 3138-3145.
- Butte, M. J., M. E. Keir, et al. (2007). "Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses." Immunity **27**(1): 111-122.
- Cai, G., A. Anumanthan, et al. (2008). "CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator." Nat Immunol **9**(2): 176-185.
- Cantrell, D. A. und K. A. Smith (1984). "The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model." Science **224**(4655): 1312-1316.
- Cardillo, F., J. C. Voltarelli, et al. (1996). "Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells." Infect Immun **64**(1): 128-134.
- Chang, K. H. und M. M. Stevenson (2004). "Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria." Int J Parasitol **34**(13-14): 1501-1516.
- Chemnitz, J. M., A. R. Lanfranco, et al. (2006). "B and T lymphocyte attenuator-mediated signal transduction provides a potent inhibitory signal to primary human CD4 T cells that can be initiated by multiple phosphotyrosine motifs." J Immunol **176**(11): 6603-6614.

- Chemnitz, J. M., R. V. Parry, et al. (2004). "SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation." J Immunol **173**(2): 945-954.
- Cheung, T. C., L. M. Osborne, et al. (2009). "T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment." J Immunol **183**(11): 7286-7296.
- Cheung, T. C., M. W. Steinberg, et al. (2009). "Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(15): 6244-6249.
- Chotivanich, K., R. Udomsangpetch, et al. (2002). "Central role of the spleen in malaria parasite clearance." J Infect Dis **185**(10): 1538-1541.
- Clark, I. A., N. H. Hunt, et al. (1987). "Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) in vivo by recombinant interferon-gamma or tumor necrosis factor, and its enhancement by butylated hydroxyanisole." J Immunol **139**(10): 3493-3496.
- Coban, C., K. J. Ishii, et al. (2005). "Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin." J Exp Med **201**(1): 19-25.
- Collins, A. V., D. W. Brodie, et al. (2002). "The interaction properties of costimulatory molecules revisited." Immunity **17**(2): 201-210.
- Coltel, N., V. Combes, et al. (2004). "Cerebral malaria -- a neurovascular pathology with many riddles still to be solved." Curr Neurovasc Res **1**(2): 91-110.
- Compaan, D. M., L. C. Gonzalez, et al. (2005). "Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex." J Biol Chem **280**(47): 39553-39561.
- Couper, K. N., D. G. Blount, et al. (2007). "Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of *Plasmodium yoelii* parasitemia." Infect Immun **75**(12): 5806-5818.
- Day, C. L., D. E. Kaufmann, et al. (2006). "PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression." Nature **443**(7109): 350-354.
- de Souza, J. B., J. C. Hafalla, et al. (2010). "Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease." Parasitology **137**(5): 755-772.
- De Souza, J. B., K. H. Williamson, et al. (1997). "Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria." Infect Immun **65**(5): 1593-1598.
- Deppong, C., T. I. Juehne, et al. (2006). "Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation." J Immunol **176**(7): 3909-3913.
- Dondorp, A. M., F. Nosten, et al. (2009). "Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria." N Engl J Med **361**(5): 455-467.
- Dong, C., U. A. Temann, et al. (2001). "Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions." J Immunol **166**(6): 3659-3662.
- Doolan, D. L., M. Sedegah, et al. (1996). "Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8+ cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity." J Exp Med **183**(4): 1739-1746.
- Duhen, T., C. Pasero, et al. (2004). "LIGHT costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion; a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation." Eur J Immunol **34**(12): 3534-3541.
- Ekvall, H. (2003). "Malaria and anemia." Curr Opin Hematol **10**(2): 108-114.

- Engwerda, C. R., L. Beattie, et al. (2005). "The importance of the spleen in malaria." Trends Parasitol **21**(2): 75-80.
- Eppihimer, M. J., J. Gunn, et al. (2002). "Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells." Microcirculation **9**(2): 133-145.
- Evans, K. J., D. S. Hansen, et al. (2006). "Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes." Blood **107**(3): 1192-1199.
- Favre, N., B. Ryffel, et al. (1999). "Parasite killing in murine malaria does not require nitric oxide production." Parasitology **118 ( Pt 2)**: 139-143.
- Finley, R. W., L. J. Mackey, et al. (1982). "Virulent P. berghei malaria: prolonged survival and decreased cerebral pathology in cell-dependent nude mice." J Immunol **129**(5): 2213-2218.
- Franklin, B. S., P. Parroche, et al. (2009). "Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(14): 5789-5794.
- Frauwirth, K. A. und C. B. Thompson (2002). "Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation." J Clin Invest **109**(3): 295-299.
- Fritsche, G., C. Larcher, et al. (2001). "Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against Plasmodium falciparum infection." J Infect Dis **183**(9): 1388-1394.
- Gavrieli, M. und K. M. Murphy (2006). "Association of Grb-2 and PI3K p85 with phosphotyrosine peptides derived from BTLA." Biochem Biophys Res Commun **345**(4): 1440-1445.
- Gavrieli, M., N. Watanabe, et al. (2003). "Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2." Biochem Biophys Res Commun **312**(4): 1236-1243.
- Gonzalez, L. C., K. M. Loyet, et al. (2005). "A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1116-1121.
- Grau, G. E., P. F. Piguet, et al. (1986). "L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria." J Immunol **137**(7): 2348-2354.
- Gu, H., Y. R. Zou, et al. (1993). "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting." Cell **73**(6): 1155-1164.
- Guntermann, C. und D. R. Alexander (2002). "CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases." J Immunol **168**(9): 4420-4429.
- Han, P., O. D. Goularte, et al. (2004). "An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection." J Immunol **172**(10): 5931-5939.
- Harding, F. A., J. G. McArthur, et al. (1992). "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." Nature **356**(6370): 607-609.
- Harrop, J. A., P. C. McDonnell, et al. (1998). "Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth." J Biol Chem **273**(42): 27548-27556.

- Harrop, J. A., M. Reddy, et al. (1998). "Antibodies to TR2 (herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines." *J Immunol* **161**(4): 1786-1794.
- Hay, S. I., E. A. Okiro, et al. (2010). "Estimating the global clinical burden of Plasmodium falciparum malaria in 2007." *PLoS Med* **7**(6): e1000290.
- Hermesen, C., T. van de Wiel, et al. (1997). "Depletion of CD4+ or CD8+ T-cells prevents Plasmodium berghei induced cerebral malaria in end-stage disease." *Parasitology* **114 ( Pt 1)**: 7-12.
- Ho, M., N. J. White, et al. (1990). "Splenic Fc receptor function in host defense and anemia in acute Plasmodium falciparum malaria." *J Infect Dis* **161**(3): 555-561.
- Hurchla, M. A., J. R. Sedy, et al. (2005). "B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly induced in anergic CD4+ T cells." *J Immunol* **174**(6): 3377-3385.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, et al. (1999). "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." *Nature* **397**(6716): 263-266.
- Jacobs, P., D. Radzioch, et al. (1996). "A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice." *Infect Immun* **64**(2): 535-541.
- Jacobs, T., S. E. Graefe, et al. (2002). "Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade." *J Immunol* **169**(5): 2323-2329.
- Jacobs, T., T. Plate, et al. (2004). "CTLA-4-dependent mechanisms prevent T cell induced-liver pathology during the erythrocyte stage of Plasmodium berghei malaria." *Eur J Immunol* **34**(4): 972-980.
- Jakeman, G. N., A. Saul, et al. (1999). "Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes." *Parasitology* **119 ( Pt 2)**: 127-133.
- Jenkins, M. K. und J. G. Johnson (1993). "Molecules involved in T-cell costimulation." *Curr Opin Immunol* **5**(3): 361-367.
- Kashiwakuma, D., A. Suto, et al. (2010). "B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses." *J Immunol* **185**(5): 2730-2736.
- Kataoka, H., S. Takahashi, et al. (2005). "CD25(+)CD4(+) regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4." *Int Immunol* **17**(4): 421-427.
- Kaye, J. (2008). "CD160 and BTLA: LIGHTs out for CD4+ T cells." *Nat Immunol* **9**(2): 122-124.
- Keir, M. E., M. J. Butte, et al. (2008). "PD-1 and its ligands in tolerance and immunity." *Annu Rev Immunol* **26**: 677-704.
- Kim, K. D., J. Zhao, et al. (2007). "Adaptive immune cells temper initial innate responses." *Nat Med* **13**(10): 1248-1252.
- Krieg, C., P. Han, et al. (2005). "Functional analysis of B and T lymphocyte attenuator engagement on CD4+ and CD8+ T cells." *J Immunol* **175**(10): 6420-6427.
- Kwiatkowski, D. (2000). "Genetic susceptibility to malaria getting complex." *Curr Opin Genet Dev* **10**(3): 320-324.
- Kyewski, B. und L. Klein (2006). "A central role for central tolerance." *Annu Rev Immunol* **24**: 571-606.
- Langhorne, J., C. B. Evans, et al. (1984). "Immunoglobulin isotype distribution of malaria-specific antibodies produced during infection with Plasmodium chabaudi adami and Plasmodium yoelii." *Cell Immunol* **87**(2): 452-461.

- Langhorne, J., S. J. Quin, et al. (2002). "Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology." Chem Immunol **80**: 204-228.
- Lazar-Molnar, E., A. Gacser, et al. (2008). "The PD-1/PD-L costimulatory pathway critically affects host resistance to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2658-2663.
- Lelchuk, R., G. Rose, et al. (1984). "Changes in the capacity of macrophages and T cells to produce interleukins during murine malaria infection." Cell Immunol **84**(2): 253-263.
- Lepenies, B., I. Gaworski, et al. (2007). "CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal *Plasmodium yoelii* infections." Microbes Infect **9**(6): 687-694.
- Lepenies, B., K. Pfeffer, et al. (2007). "Ligation of B and T lymphocyte attenuator prevents the genesis of experimental cerebral malaria." J Immunol **179**(6): 4093-4100.
- Li, C., E. Seixas, et al. (2001). "Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite." Med Microbiol Immunol **189**(3): 115-126.
- Liang, S. C., Y. E. Latchman, et al. (2003). "Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses." Eur J Immunol **33**(10): 2706-2716.
- Ling, V., P. W. Wu, et al. (2000). "Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor." J Immunol **164**(4): 1653-1657.
- Linsley, P. S., W. Brady, et al. (1991). "Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation." J Exp Med **173**(3): 721-730.
- Liu, J., C. S. Schmidt, et al. (2003). "LIGHT-deficiency impairs CD8+ T cell expansion, but not effector function." Int Immunol **15**(7): 861-870.
- Liu, X., M. Alexiou, et al. (2009). "Cutting edge: A critical role of B and T lymphocyte attenuator in peripheral T cell tolerance induction." J Immunol **182**(8): 4516-4520.
- Loser, K., A. Scherer, et al. (2005). "An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice." J Immunol **174**(9): 5298-5305.
- Lucas, B., L. H. Kasper, et al. (1996). "In vivo treatment with interleukin 2 reduces parasitemia and restores IFN-gamma gene expression and T-cell proliferation during acute murine malaria." C R Acad Sci III **319**(8): 705-710.
- Lyke, K. E., R. Burges, et al. (2004). "Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls." Infect Immun **72**(10): 5630-5637.
- Maeda, M., C. Carpenito, et al. (2005). "Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and nonclassical MHC class I and regulates NK cell activation." J Immunol **175**(7): 4426-4432.
- Marelli-Berg, F. M., D. Scott, et al. (2001). "Antigen presentation by murine endothelial cells." Transplant Proc **33**(1-2): 315-316.
- Marsters, S. A., T. M. Ayres, et al. (1997). "Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1." J Biol Chem **272**(22): 14029-14032.
- Masteller, E. L., E. Chuang, et al. (2000). "Structural analysis of CTLA-4 function in vivo." J Immunol **164**(10): 5319-5327.

- Mellouk, S., S. J. Green, et al. (1991). "IFN-gamma inhibits development of *Plasmodium berghei* exoerythrocytic stages in hepatocytes by an L-arginine-dependent effector mechanism." J Immunol **146**(11): 3971-3976.
- Mellouk, S., S. L. Hoffman, et al. (1994). "Nitric oxide-mediated antiplasmodial activity in human and murine hepatocytes induced by gamma interferon and the parasite itself: enhancement by exogenous tetrahydrobiopterin." Infect Immun **62**(9): 4043-4046.
- Miller, M. L., Y. Sun, et al. (2009). "Cutting Edge: B and T Lymphocyte Attenuator Signaling on NKT Cells Inhibits Cytokine Release and Tissue Injury in Early Immune Responses." J Immunol.
- Miyakoda, M., D. Kimura, et al. (2008). "Malaria-specific and nonspecific activation of CD8+ T cells during blood stage of *Plasmodium berghei* infection." J Immunol **181**(2): 1420-1428.
- Morel, Y., J. M. Schiano de Colella, et al. (2000). "Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor." J Immunol **165**(8): 4397-4404.
- Morgan, B. P., C. W. van den Berg, et al. (1993). "Cross-linking of CD59 and of other glycosyl phosphatidylinositol-anchored molecules on neutrophils triggers cell activation via tyrosine kinase." Eur J Immunol **23**(11): 2841-2850.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Murphy, K. M., C. A. Nelson, et al. (2006). "Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM." Nat Rev Immunol **6**(9): 671-681.
- Murphy, T. L. und K. M. Murphy (2010). "Slow down and survive: Enigmatic immunoregulation by BTLA and HVEM." Annu Rev Immunol **28**: 389-411.
- Nebel, T., M. J. De Veer, et al. (2005). "Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors." Parasitology **130 Suppl**: S45-62.
- Newton, C. R. und S. Krishna (1998). "Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment." Pharmacol Ther **79**(1): 1-53.
- Nishimura, H., M. Nose, et al. (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." Immunity **11**(2): 141-151.
- Nishimura, H., T. Okazaki, et al. (2001). "Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice." Science **291**(5502): 319-322.
- Nitcheu, J., O. Bonduelle, et al. (2003). "Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis." J Immunol **170**(4): 2221-2228.
- Noelle, R. J., J. A. Ledbetter, et al. (1992). "CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation." Immunol Today **13**(11): 431-433.
- Okazaki, T., A. Maeda, et al. (2001). "PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13866-13871.
- Otsuki, N., Y. Kamimura, et al. (2006). "Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells." Biochem Biophys Res Commun **344**(4): 1121-1127.



- Oya, Y., N. Watanabe, et al. (2008). "Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator." Arthritis Rheum **58**(8): 2498-2510.
- Parroche, P., F. N. Lauw, et al. (2007). "Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(6): 1919-1924.
- Parry, R. V., J. M. Chemnitz, et al. (2005). "CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms." Mol Cell Biol **25**(21): 9543-9553.
- Patel, S. N., J. Berghout, et al. (2008). "C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria." J Exp Med **205**(5): 1133-1143.
- Paul, F., S. Roath, et al. (1981). "Separation of malaria-infected erythrocytes from whole blood: use of a selective high-gradient magnetic separation technique." Lancet **2**(8237): 70-71.
- Petrovas, C., J. P. Casazza, et al. (2006). "PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection." J Exp Med **203**(10): 2281-2292.
- Pichyangkul, S., P. Saengkrai, et al. (1994). "Plasmodium falciparum pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta." Am J Trop Med Hyg **51**(4): 430-435.
- Pongponratn, E., M. Riganti, et al. (1991). "Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study." Am J Trop Med Hyg **44**(2): 168-175.
- Potter, S. M., A. J. Mitchell, et al. (2005). "Phagocyte-derived reactive oxygen species do not influence the progression of murine blood-stage malaria infections." Infect Immun **73**(8): 4941-4947.
- Randall, L. M., F. H. Amante, et al. (2008). "Cutting edge: selective blockade of LIGHT-lymphotoxin beta receptor signaling protects mice from experimental cerebral malaria caused by Plasmodium berghei ANKA." J Immunol **181**(11): 7458-7462.
- Ribaut, C., A. Berry, et al. (2008). "Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human Plasmodium species." Malar J **7**: 45.
- Riley, J. L. und C. H. June (2005). "The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation." Blood **105**(1): 13-21.
- Riley, J. L., M. Mao, et al. (2002). "Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11790-11795.
- Robert, C., S. Peyrol, et al. (1996). "Ultrastructural aspects of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte adherence to endothelial cells of Saimiri brain microvasculature." Am J Trop Med Hyg **54**(2): 169-177.
- Rowe, J. H., T. M. Johanns, et al. (2008). "PDL-1 blockade impedes T cell expansion and protective immunity primed by attenuated Listeria monocytogenes." J Immunol **180**(11): 7553-7557.
- Sam, H., Z. Su, et al. (1999). "Deficiency in tumor necrosis factor alpha activity does not impair early protective Th1 responses against blood-stage malaria." Infect Immun **67**(5): 2660-2664.
- Schlotmann, T., I. Waase, et al. (2000). "CD4 alphabeta T lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria." J Infect Dis **182**(1): 367-370.
- Schofield, L. und G. E. Grau (2005). "Immunological processes in malaria pathogenesis." Nat Rev Immunol **5**(9): 722-735.

- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." *Annu Rev Immunol* **21**: 305-334.
- Sedy, J. R., M. Gavrieli, et al. (2005). "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." *Nat Immunol* **6**(1): 90-98.
- Seguin, M. C., F. W. Klotz, et al. (1994). "Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells." *J Exp Med* **180**(1): 353-358.
- Shear, H. L., R. Srinivasan, et al. (1989). "Role of IFN-gamma in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts." *J Immunol* **143**(6): 2038-2044.
- Silva, A. J. d. (2002). Public Health Image Library (PHIL), CDC.
- Smith, E. C. und A. W. Taylor-Robinson (2003). "Parasite-specific immunoglobulin isotypes during lethal and non-lethal murine malaria infections." *Parasitol Res* **89**(1): 26-33.
- Soulard, V., J. Roland, et al. (2009). "An early burst of IFN-gamma induced by the pre-erythrocytic stage favours Plasmodium yoelii parasitaemia in B6 mice." *Malar J* **8**: 128.
- Stefanova, I., V. Horejsi, et al. (1991). "GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases." *Science* **254**(5034): 1016-1019.
- Steinberg, M. W., O. Turovskaya, et al. (2008). "A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation." *J Exp Med* **205**(6): 1463-1476.
- Stephens, R., F. R. Albano, et al. (2005). "Malaria-specific transgenic CD4(+) T cells protect immunodeficient mice from lethal infection and demonstrate requirement for a protective threshold of antibody production for parasite clearance." *Blood* **106**(5): 1676-1684.
- Stern, J. B. und K. A. Smith (1986). "Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression." *Science* **233**(4760): 203-206.
- Stevenson, M. M., M. F. Tam, et al. (1995). "IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism." *J Immunol* **155**(5): 2545-2556.
- Sturm, A., R. Amino, et al. (2006). "Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids." *Science* **313**(5791): 1287-1290.
- Sun, Y., N. K. Brown, et al. (2009). "B and T Lymphocyte Attenuator Tempers Early Infection Immunity." *J Immunol*.
- Tao, R., L. Wang, et al. (2005). "Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts." *J Immunol* **175**(9): 5774-5782.
- Taverne, J., J. Tavernier, et al. (1987). "Recombinant tumour necrosis factor inhibits malaria parasites in vivo but not in vitro." *Clin Exp Immunol* **67**(1): 1-4.
- Taylor, P. R., E. Seixas, et al. (2001). "Complement contributes to protective immunity against reinfection by Plasmodium chabaudi chabaudi parasites." *Infect Immun* **69**(6): 3853-3859.
- Tivol, E. A., F. Borriello, et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." *Immunity* **3**(5): 541-547.
- Tosta, C. E. und N. Wedderburn (1980). "Immune phagocytosis of Plasmodium yoelii-infected erythrocytes by macrophages and eosinophils." *Clin Exp Immunol* **42**(1): 114-120.
- Trautmann, L., L. Janbazian, et al. (2006). "Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction." *Nat Med* **12**(10): 1198-1202.

- Truong, W., W. W. Hancock, et al. (2009). "BTLA targeting modulates lymphocyte phenotype, function, and numbers and attenuates disease in nonobese diabetic mice." J Leukoc Biol **86**(1): 41-51.
- Truong, W., J. C. Plester, et al. (2007). "Combined coinhibitory and costimulatory modulation with anti-BTLA and CTLA4Ig facilitates tolerance in murine islet allografts." Am J Transplant **7**(12): 2663-2674.
- Turner, G. D., H. Morrison, et al. (1994). "An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration." Am J Pathol **145**(5): 1057-1069.
- van der Heyde, H. C., B. Pepper, et al. (1997). "The time course of selected malarial infections in cytokine-deficient mice." Exp Parasitol **85**(2): 206-213.
- Vinetz, J. M., S. Kumar, et al. (1990). "Adoptive transfer of CD8+ T cells from immune animals does not transfer immunity to blood stage Plasmodium yoelii malaria." J Immunol **144**(3): 1069-1074.
- von Boehmer, H. (2009). "Central tolerance: essential for preventing autoimmune disease?" Eur J Immunol **39**(9): 2313-2316.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker, et al. (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." J Exp Med **183**(6): 2541-2550.
- Wang, J., J. C. Lo, et al. (2001). "The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT." J Clin Invest **108**(12): 1771-1780.
- Wang, X. F., Y. J. Chen, et al. (2007). "Distinct expression and inhibitory function of B and T lymphocyte attenuator on human T cells." Tissue Antigens **69**(2): 145-153.
- Wang, Y., S. K. Subudhi, et al. (2005). "The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses." J Clin Invest **115**(3): 711-717.
- Warburg, O. (1941). "Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase." Biochemische Zeitung **310**: 384-421.
- Warrell, D. A., N. J. White, et al. (1988). "Cerebral anaerobic glycolysis and reduced cerebral oxygen transport in human cerebral malaria." Lancet **2**(8610): 534-538.
- Wassmer, S. C., V. Combes, et al. (2003). "Pathophysiology of cerebral malaria: role of host cells in the modulation of cytoadhesion." Ann N Y Acad Sci **992**: 30-38.
- Watanabe, N., M. Gavrieli, et al. (2003). "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." Nat Immunol **4**(7): 670-679.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4." Science **270**(5238): 985-988.
- White, W. I., C. B. Evans, et al. (1991). "Antimalarial antibodies of the immunoglobulin G2a isotype modulate parasitemias in mice infected with Plasmodium yoelii." Infect Immun **59**(10): 3547-3554.
- WHO (2007). "Resistance to artemisinin derivatives along the Thai-Cambodian border." Wkly Epidemiol Rec **82**(41): 360.
- WHO (2008). "World Malaria Report 2008."
- WHO (2009). "World Malaria Report 2009."
- WHO (2010). "World Malaria Report 2010."
- Wing, K., Y. Onishi, et al. (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." Science **322**(5899): 271-275.
- Wu, T. H., Y. Zhen, et al. (2007). "B and T lymphocyte attenuator interacts with CD3zeta and inhibits tyrosine phosphorylation of TCRzeta complex during T-cell activation." Immunol Cell Biol **85**(8): 590-595.

- Yamazaki, T., H. Akiba, et al. (2002). "Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC." J Immunol **169**(10): 5538-5545.
- Yanez, D. M., J. Batchelder, et al. (1999). "Gamma delta T-cell function in pathogenesis of cerebral malaria in mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA." Infect Immun **67**(1): 446-448.
- Yanez, D. M., D. D. Manning, et al. (1996). "Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria." J Immunol **157**(4): 1620-1624.
- Yashiro, Y., X. G. Tai, et al. (1998). "A fundamental difference in the capacity to induce proliferation of naive T cells between CD28 and other co-stimulatory molecules." Eur J Immunol **28**(3): 926-935.
- Yoneto, T., T. Yoshimoto, et al. (1999). "Gamma interferon production is critical for protective immunity to infection with blood-stage *Plasmodium berghei* XAT but neither NO production nor NK cell activation is critical." Infect Immun **67**(5): 2349-2356.
- Yoshimoto, T., Y. Takahama, et al. (1998). "A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection." J Immunol **160**(11): 5500-5505.
- Yoshimoto, T., T. Yoneto, et al. (1998). "Interleukin-12-dependent mechanisms in the clearance of blood-stage murine malaria parasite *Plasmodium berghei* XAT, an attenuated variant of *P. berghei* NK65." J Infect Dis **177**(6): 1674-1681.
- Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, et al. (1999). "T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS." Nature **402**(6763): 827-832.
- Zhang, M., H. Hisaeda, et al. (2001). "CD4+ T cells are required for HSP65 expression in host macrophages and for protection of mice infected with *Plasmodium yoelii*." Parasitol Int **50**(3): 201-209.
- Zhang, X., J. C. Schwartz, et al. (2004). "Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1." Immunity **20**(3): 337-347.
- Zhong, X., J. R. Tumang, et al. (2007). "PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding." Eur J Immunol **37**(9): 2405-2410.