

**Der Einfluss von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern auf die  
CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort im Vakzinierungs- und  
Infektionsmodell der experimentellen Malaria**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Nina Lapke**

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Professor Dr. I. BRUCHHAUS  
Weitere Gutachterin der Dissertation:  
Priv.-Doz. Dr. T. JACOBS  
Tag der Disputation: 29. November 2013

Hamburg, den 14. November 2013



Professor Dr. C. Lohr  
Vorsitzender des  
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Erstgutachterin:

Prof. Dr. Iris Bruchhaus

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Abteilung Molekulare Parasitologie

Zweitgutachter:

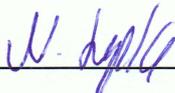
PD Dr. Thomas Jacobs

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Abteilung Immunologie

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

  
\_\_\_\_\_

Nina Lapke

## **Danksagung**

Ich danke PD Dr. Thomas Jacobs für die Betreuung meiner Arbeit und die unermüdliche Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Iris Bruchhaus für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Ich danke Dr. Kyeong-Hee Lee für die Bereitstellung der anti-Fc $\mu$ R Antikörper und der Fc $\mu$ R ko Mäuse.

Ich bedanke mich bei Christiane Steeg, Iris Dethlefsen, Dr. Susanne Tartz, Dr. Marthe Janßen, Dr. Kathrin Kuhlmann, Wiebke Theess und Julie Sellau für ihre ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Jacobs für das wundervolle Arbeitsklima, durch das ich mich bei der Arbeit sehr wohl gefühlt habe.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Das Immunsystem</i> .....	1
1.1.1 Das adaptive Immunsystem .....	1
1.1.2 T-Zellen .....	1
1.1.3 B-Zellen .....	3
1.1.4 B- und T-Zell-Interaktionen .....	4
1.1.5 Antikörper und ihre Rezeptoren bei der Immunantwort .....	6
1.1.6 IgM und IgM Fc-Rezeptoren .....	6
1.2 <i>Malaria</i> .....	9
1.2.1 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i> .....	9
1.2.2 Immunantwort gegen Plasmodien und Pathologie .....	11
IgM bei der Malaria-Infektion .....	13
1.2.3 Bekämpfung der Malaria .....	14
Malaria-Vakzinierungen .....	14
Die Adenylatzyklase von <i>Bordetella pertussis</i> als Vakzine-Carrier .....	17
1.3 <i>Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit</i> .....	18
<b>2. Material</b> .....	<b>19</b>
2.1 <i>Laborgeräte</i> .....	19
2.2 <i>Glas- und Plastikwaren</i> .....	20
2.3 <i>Chemikalien</i> .....	20
2.4 <i>Materialien für molekularbiologische Arbeiten</i> .....	20
2.5 <i>Enzyme und Puffer für molekularbiologische Arbeiten</i> .....	21
2.6 <i>Material für zellbiologische Arbeiten</i> .....	21
2.7 <i>Kulturmedium, Puffer und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten</i> .....	22
2.8 <i>Antikörper und MHC-Multimere</i> .....	23
2.9 <i>ACT-CSP/ ACT-OVA</i> .....	24
2.10 <i>Mäuse</i> .....	24
2.11 <i>Parasiten</i> .....	24
<b>3. Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1 <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	25
3.1.1 Isolation von RNA aus muriner Leber .....	25
3.1.2 cDNA-Synthese .....	25
3.1.3 Quantitative Real-Time PCR .....	26
3.2 <i>Zellbiologische Methoden</i> .....	26
3.2.1 Präparation von murinen Milzzellen .....	26
3.2.2 Präparation von murinen Lymphozyten aus der Leber .....	26
3.2.3 Präparation von murinen Lymphozyten aus dem Hirn .....	27

3.2.4 Durchflusszytometrie .....	28
3.2.5 Aufreinigung muriner B-Zellen.....	29
3.3 Tierversuche .....	29
3.3.1 Mäuse .....	29
3.3.2 Immunisierung mit ACT-CSP bzw. ACT-OVA .....	30
3.3.3 Infektion mit <i>Plasmodium berghei</i> ANKA .....	30
3.3.4 B-Zell-Transfer.....	31
3.4 Statistische Analysen .....	31
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
4.1 Die Verstärkung der Vakzinierungseffizienz durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper.....	32
4.1.1 Die Verstärkung der vakzineinduzierten CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper .....	32
4.1.2 Anti-Fc $\mu$ R Antikörper-vermittelte erhöhte Funktionalität von vakzineinduzierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen....	36
4.2 Die Vermittlung der Verstärkung der vakzineinduzierten CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort bei anti-Fc $\mu$ R Antikörper-Applikation durch B-Zellen.....	38
4.2.1 Starke Expression des Fc $\mu$ R in der murinen Milz nur auf B-Zellen.....	38
4.2.2 Förderung der Zytokinproduktion vakzineinduzierter CD8 <sup>+</sup> T-Zellen durch B-Zellen.....	38
4.2.3 Keine Verstärkung der vakzineinduzierten CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort durch anti-Fc $\mu$ R Antikörper-Applikation in B-Zell-defizienten JHT Mäusen .....	40
4.2.4 Erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf B-Zellen vakzinierter Mäuse bei anti-Fc $\mu$ R Antikörper-Applikation.....	42
4.2.5 Untergeordnete Rolle von B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen bei der ACT-CSP Vakzinierung .....	43
4.3 Der Einfluss des Fc $\mu$ R auf die Entwicklung der experimentellen zerebralen Malaria.....	45
4.3.1 Verstärkte CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort und erhöhte Inzidenz experimenteller zerebraler Malaria bei Applikation von anti-Fc $\mu$ R B68 .....	45
4.3.2 Verstärkte CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort und erhöhte Inzidenz experimenteller zerebraler Malaria bei Applikation von anti-Fc $\mu$ R A96.....	48
4.3.3 Das Auftreten von experimenteller zerebraler Malaria in Fc $\mu$ R-defizienten Mäusen .....	51
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>53</b>
5.1 Die Steigerung der vakzineinduzierten CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper.....	54
5.2 B-Zellen als Mediatoren der durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper verstärkten vakzineinduzierten CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Antwort .....	56
5.3 Die Rolle des Fc $\mu$ R bei der Entwicklung der experimentellen zerebralen Malaria .....	61
5.4 Ausblick .....	66
<b>6. Literatur.....</b>	<b>67</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>73</b>
7.1 Zusammenfassung.....	73
7.2 Summary.....	75

## ***Abkürzungsverzeichnis***

ACT	Adenylatzyklasetoxoid
AID	activation induced deaminase
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
CSP	Circumsporozoitenprotein
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4
DZ	dendritische Zelle
EZM	experimentelle zerebrale Malaria
FACS	fluorescence activated cell sorting
Faim3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3
Fc	fragment crystallizable
FCS	fötales Kälberserum
FDZ	follikuläre dendritische Zelle
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ko	knockout
L	Ligand
MHC	major histocompatibility complex

NF-κB	nuclear factor κB
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht (statistisch) signifikant
OVA	Ovalbumin
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PfEMP1	( <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1)
pIgR	poly-Immunglobulin Rezeptor
PRR	pathogen recognition receptor
R	Rezeptor
RIgG	Ratten-Immunglobulin G
Rpm	revolutions per minute
SEM	standard error of the mean
SSC	sidewards scatter
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TZR	T-Zell-Rezeptor
WHO	world health organization
wt	Wildtyp
ZM	zerebrale Malaria

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein körpereigenes Abwehrsystem, das aus Immunzellen und immunwirksamen Proteinen besteht. Es dient der Bekämpfung von Krankheitserregern und entarteten körpereigenen Zellen. Krankheitserreger sind hierbei Pathogene verschiedenen Ursprungs, und zwar Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten. Diese können zunächst durch das angeborene Immunsystem erkannt und über dessen Effektormechanismen wie beispielsweise die Phagozytose von Pathogenen teilweise kontrolliert werden. Die Erkennung von Pathogenen erfolgt dabei über charakteristische konservierte molekulare Merkmale (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) durch entsprechende Rezeptoren (PRR, *pattern recognition receptors*) (1). Später werden die Pathogene spezifisch über Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems bekämpft.

### 1.1.1 Das adaptive Immunsystem

Die spezifische Pathogenabwehr des adaptiven Immunsystems wird von T- und B-Zellen vermittelt. T-Zellen erkennen Peptide, die in der Wirtszelle prozessierten Proteinen des Pathogens entstammen, im Komplex mit den wirtseigenen sogenannten MHC-Molekülen auf der Wirtszelloberfläche. Sie sind wesentlich an der Vermittlung der zellulären Immunität beteiligt. B-Zellen dagegen erkennen nativ vorliegendes Antigen und sind in ihrer Spezifität nicht auf Proteine beschränkt, sondern können auch z.B. Kohlenhydratstrukturen erkennen. Sie vermitteln die humorale Immunität. In einer adaptiven Immunantwort werden auch langlebige Gedächtniszellen gebildet, die noch Jahre nach einer Infektion persistieren und bei erneutem Antigenkontakt eine schnelle Immunreaktion vermitteln (2).

### 1.1.2 T-Zellen

Die Erkennung eines Pathogens durch T-Zellen erfolgt über die Bindung ihres T-Zell-Rezeptors (TZR) an die MHC-Moleküle einer anderen Zelle. Jede T-Zelle exprimiert dabei Rezeptoren nur einer einzigen Spezifität. Die in einem Individuum vorliegende hohe Diversität verschiedener TZR-Spezifitäten ermöglicht die Erkennung einer Vielzahl von aus Pathogenen stammenden Peptiden im Komplex mit MHC-Molekülen. Es gibt zwei Subtypen

klassischer MHC-Moleküle, MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. MHC-I Moleküle liegen im Komplex mit im Zytosol generierten Peptiden vor und binden neben ihrer Bindung an den TZR ebenfalls an den auf T-Zellen exprimierten Korezeptor CD8. Diese Art der Präsentation ist für die Bekämpfung von im Zytosol vorliegenden Pathogenen wie Viren von Bedeutung. T-Zellen, die kein CD8 exprimieren, exprimieren den Korezeptor CD4, welcher an MHC-II Moleküle bindet. Da MHC-II Moleküle im lysosomalen Kompartiment mit Peptiden beladen werden, erkennen  $CD4^+$  T-Zellen nicht zytosolische, sondern durch Phagozytose aufgenommene Antigene.

Die initiale Bindung an einen zum TZR passenden Peptid-MHC-Komplex findet in sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten oder der Milz bei Kontakt mit einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ) statt. Die besten APZ sind dendritische Zellen (DZ), es können aber auch Makrophagen und B-Zellen als APZ fungieren. Damit es nicht zur Aktivierung von T-Zellen in Abwesenheit einer Infektion kommt, müssen APZ durch Erkennung eines Pathogens über einen PRR aktiviert werden. Durch die Bindung an einen PRR kommt es weiterhin zur Reifung der APZ, die nun verstärkt die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimieren, die an das auf T-Zellen befindliche Molekül CD28 binden. Die Bindung an kostimulatorische Moleküle ist ein essentieller Schritt bei der Aktivierung von T-Zellen, und eine Bindung des TZR an Peptid-MHC in Abwesenheit dieser Signale führt zur Anergie von T-Zellen. Die T-Zell-Aktivierung führt zur klonalen Expansion der T-Zellen und ihrer Differenzierung in Effektorzellen (2).

$CD4^+$  T-Zellen differenzieren zu T-Helferzellen ( $T_H$ ) aus, wobei je nach dem durch die APZ generierten Zytokinmilieu verschiedene Subtypen entstehen. Die am besten charakterisierten Subtypen sind hierbei  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$ .  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$  Zellen liefern B-Zellen kostimulatorische Signale, wobei je nach T-Zell-Subtyp bevorzugt verschiedene Isotypen von Antikörpern gebildet werden.  $T_{H1}$  Zellen können zusätzlich infizierte Makrophagen aktivieren, was eine Zerstörung der Pathogene begünstigt. Interessanterweise benötigen auch  $CD8^+$  T-Zell-Antworten oft die Hilfe von  $CD4^+$  T-Helferzellen, besonders wenn die Immunantwort des angeborenen Immunsystems nicht sehr stark ist. Dies kann sowohl durch die Sekretion von Zytokinen als auch durch die Expression von CD40L auf aktivierten T-Helferzellen bewirkt werden. Dabei wirken die Zytokine direkt auf die  $CD8^+$  T-Zellen, während die Expression von CD40L durch Interaktion mit CD40 auf APZ zu einer effizienteren Stimulation von  $CD8^+$  T-Zellen durch die APZ führt (2).

CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen aus und bekämpfen Pathogene in infizierten Wirtszellen. Dabei können sie eine direkte zytotoxische Wirkung über die Moleküle FasL, TRAIL (Tumor Necrosis Factor related apoptosis inducing ligand), TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), Perforin und Granzyme entfalten, die in der infizierten Wirtszelle die Apoptose auslösen (3). Des Weiteren ist eine Wirkung über Zytokine wie IFN $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) möglich. IFN $\gamma$  induziert eine Hochregulation von MHC-I auf Wirtszellen, was eine erhöhte Dichte antigenen Materials auf der Oberfläche dieser Zellen bewirkt und somit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Erkennung infizierter Zellen durch antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingt. Zusätzlich können sowohl IFN $\gamma$  als auch TNF $\alpha$  zur Aktivierung von Zellen beitragen, indem sie in diesen die Produktion von toxischen Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) auslösen. Ein weiterer Effektormechanismus von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist die Sekretion von Chemokinen, die zur Rekrutierung anderer Zellen wie Makrophagen und Neutrophilen führt (4).

### 1.1.3 B-Zellen

B-Zellen spielen bei der adaptiven Immunantwort hauptsächlich als antikörperproduzierende Zellen eine Rolle, können aber auch als APZ agieren und exprimieren PRR. Des Weiteren sind sie für die Organisation von lymphoiden Organen wichtig (5). Ebenso wie bei den T-Zellen erfolgt die spezifische Aktivierung von B-Zellen über ihren Antigenrezeptor, den B-Zell-Rezeptor, der ein membranständiges Antikörpermolekül darstellt. Jede B-Zelle hat nur eine Spezifität, durch die hohe Anzahl von B-Zellen ist aber in einem Individuum eine hohe Diversität an Antigenespezifitäten vorhanden. Die Aktivierung hat die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen sowie die Sekretion löslichen Antikörpers zur Folge, der über verschiedene Effektormechanismen eine humorale Immunität vermittelt (2).

Neben den klassischen B2 B-Zellen, welche eine hohe Rezeptordiversität aufweisen und nach Antigenbindung und T-Zell-Hilfe Klassenwechsel, Affinitätsreifung und Differenzierung durchlaufen können, gibt es weitere B-Zell-Subtypen. Dies sind B1 B-Zellen, Marginalzonen-B-Zellen und regulatorisch wirkende B-Zellen. B1 B-Zellen entstehen in der Ontogenese früher als B2 B-Zellen und sekretieren, ebenso wie Marginalzonen-B-Zellen, natürliche IgM Antikörper limitierter Diversität. Marginalzonen-B-Zellen befinden sich hauptsächlich in der Nähe des marginalen Sinus in der Milz, während B1 B-Zellen im Peritoneum und der Pleura

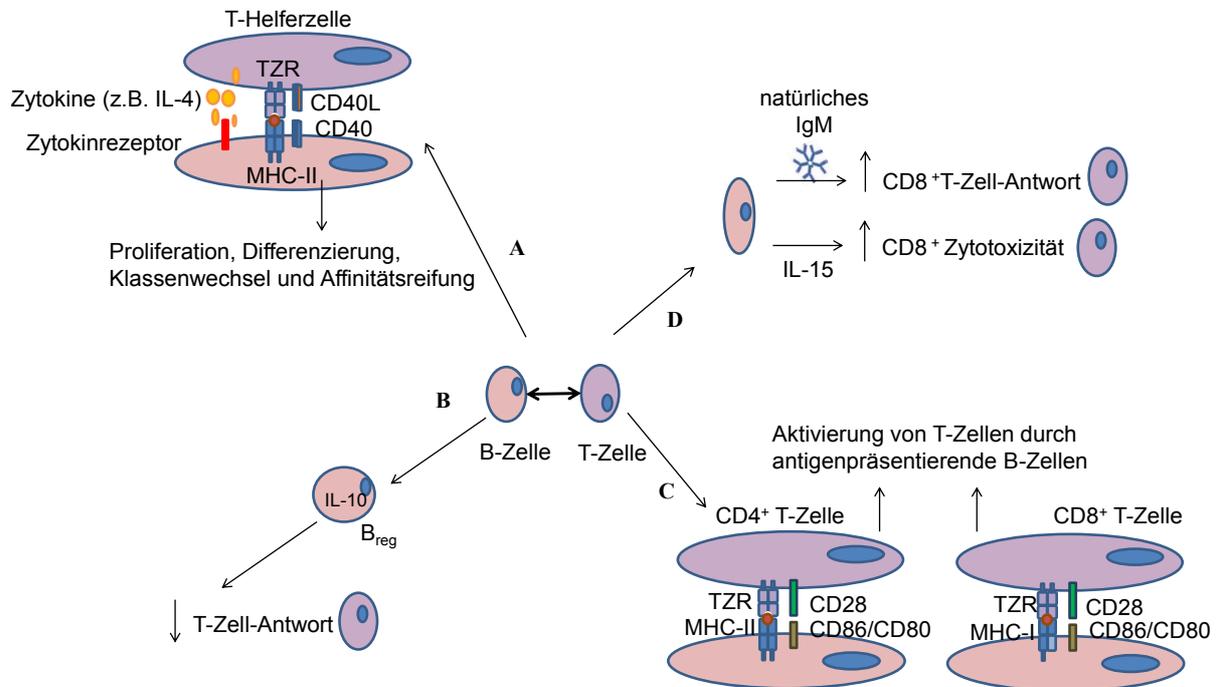
zu finden sind. Regulatorisch wirkende B-Zellen können in verschiedene Subklassen unterteilt werden und können Immunantworten durch die Produktion von IL-10 negativ modulieren (2, 6).

### 1.1.4 B- und T-Zell-Interaktionen

Bei einer Immunantwort können sich T- und B-Zellen wechselseitig beeinflussen (Abb. 1.1). Die Interaktion von B- und T-Zellen ist insbesondere für die Produktion von Antikörpern bei T-Zell-abhängigen Antikörperantworten von Bedeutung. Dabei liefern die T-Zellen den B-Zellen Signale zur Proliferation, Differenzierung, der Affinitätsreifung und dem Klassenwechsel. Die Affinitätsreifung ist das Ergebnis der somatischen Hypermutation. Die somatische Hypermutation führt durch Mutationen in der für die Antigenbindungsstelle von Antikörpern kodierenden DNA und den daraus resultierenden Änderungen der Aminosäuresequenz zur Generierung von Antikörpern einer höheren Affinität. Bei allen genannten Prozessen spielt die Expression von CD40L auf aktivierten T-Helferzellen und von CD40 auf B-Zellen eine Rolle. Die Bindung von CD40L an CD40 bewirkt unter anderem eine Induktion der Expression des Enzyms AID (activation induced deaminase), welches für die somatische Hypermutation und den Klassenwechsel benötigt wird. Von den T-Helferzellen sekretierte Zytokine sind ebenfalls wichtig für die Stimulierung der B-Zellen. Hierbei bestimmt das generierte Zytokinmilieu auch die produzierten Antikörperklassen (2).

Es ist auch die Beeinflussung von T-Zell-Antworten durch B-Zellen bekannt. Dies ist z. B. durch eine Funktion von B-Zellen als APZ zu erklären. So sind B-Zellen für die Induktion einer optimalen T-Zell-Immunität in einem Melanom-Modell wichtig, was dadurch erkennbar ist, dass bei Depletion von B-Zellen durch einen anti-CD20 Antikörper die Induktion zytokinproduzierender CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen verringert wird (7). Die Funktion von B-Zellen als APZ kann durch Targeting von Antigenen an spezifisch auf B-Zellen exprimierte Moleküle gezielt zur Induktion von T-Zell-Antworten verwendet werden, wie durch die Induktion einer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort beim Targeting von Antigen an CD19 gezeigt wurde (8). Auch indirekte Effekte über sekretierte Antikörper sind denkbar. So wurde in einem Modell der Vakzinierung gegen Leishmanien die Wirkung von natürlichen Antikörpern als Adjuvantien für CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten festgestellt (9). Des Weiteren konnte bei der rheumatoiden Arthritis eine Korrelation zwischen dem IgM Rheumafaktor und der

Zahl von CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zellen beobachtet werden (10). Durch die Expression von IL-15 konnten B-Zellen die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen steigern (11). Eine negative Beeinflussung von T-Zell-Antworten durch IL-10 produzierende regulatorisch wirkende B-Zellen ist ebenfalls bekannt (12).



**Abb. 1.1: Beispiele für wechselseitige Interaktionen von B- und T-Zellen bei der Immunantwort**

- (A) T-Helferzellen geben B-Zellen Signale, die Proliferation, Differenzierung, Affinitätsreifung und Klassenwechsel fördern. Dabei sind Interaktionen zwischen MHC-II auf der B-Zelle und dem TZR sowie zwischen CD40 auf der B-Zelle und CD40L auf der T-Zelle wichtig. Auch von der T-Zelle sekretierte Zytokine spielen eine Rolle.
- (B) Regulatorisch wirkende, IL-10 produzierende B-Zellen (B<sub>reg</sub>) inhibieren T-Zell-Antworten.
- (C) B-Zellen präsentieren Antigene an T-Zellen und aktivieren diese durch Bereitstellung kostimulatorischer Signale.
- (D) B-Zellen produzieren Moleküle wie IL-15 oder natürliches IgM, die T-Zell-Antworten beeinflussen.

### 1.1.5 Antikörper und ihre Rezeptoren bei der Immunantwort

Antikörper können spezifisch und hochaffin an Pathogene oder an von diesen generierte Moleküle binden. Sie können neutralisierend wirken, indem sie z.B. die Bindung von viralen Proteinen an Wirtszellrezeptoren oder die Funktion von Toxinen blockieren. Weitere Effektorfunktionen werden durch die Bindung an Fc-Rezeptoren und deren Kreuzvernetzung mit dadurch ausgelöster intrazellulärer Signaltransduktion ermöglicht. Die bewirkten Effektorfunktionen sind vom Isotyp des entsprechenden Antikörpers abhängig. Der erste in einer Immunantwort gebildete Antikörper ist IgM. Der Einfluss von IgM Antikörpern im Vergleich zu anderen Isotypen nimmt oft im Laufe einer Immunantwort ab. Neben IgM gibt es noch die Isotypen IgG, IgD, IgA und IgE, wobei IgD nur in membrangebundener Form auf B-Zellen vorliegt und keine Rolle bei der humoralen Immunantwort spielt. IgG wirkt sowohl als Aktivator des Komplementsystems als auch als opsonisierender Antikörper, der durch Bindung an entsprechende Fc-Rezeptoren die Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile auslöst. Des Weiteren löst die Bindung von IgG an den Fc $\gamma$ RIIIA auf NK-Zellen (natürliche Killerzellen) die Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität aus. IgA spielt durch seine Sekretion in die Schleimhäute insbesondere eine Rolle bei der mukosalen Immunität. IgE bewirkt durch Bindung an den hochaffinen Fc $\epsilon$ RI auf Mastzellen deren Degranulation, was in Hypersensitivitätsreaktionen von Bedeutung ist (2).

### 1.1.6 IgM und IgM Fc-Rezeptoren

IgM Antikörper, die eine Spezifität für Selbst- und Fremdartigene aufweisen, werden selbst bei Abwesenheit einer Infektion produziert. Diese auch als natürliche Antikörper bezeichneten IgM Antikörper sind durch eine geringe Affinität und hohe Kreuzreaktivität gekennzeichnet. Die Produktion erfolgt durch B-1 oder Marginalzonen-B-Zellen.

Bei einer Infektion vermittelt antigenspezifisches IgM vor allem zu Beginn einen humoralen Schutz, wenn andere Isotypen noch nicht gebildet wurden. Trotz seiner relativ geringen Affinität ist auch IgM zu einer guten Bindung an Antigen fähig, da die Avidität durch sein Vorliegen als multimeres Molekül stark erhöht wird. Seine Wirkung entfaltet IgM durch seine Bindung an IgM-Fc-Rezeptoren, die Neutralisierung von Pathogenen oder deren Toxinen sowie über eine Aktivierung des Komplementsystems (Abb. 1.2). Die Aktivierung des Komplementsystems durch IgM hat die Phagozytose von mit Komplementfragmenten

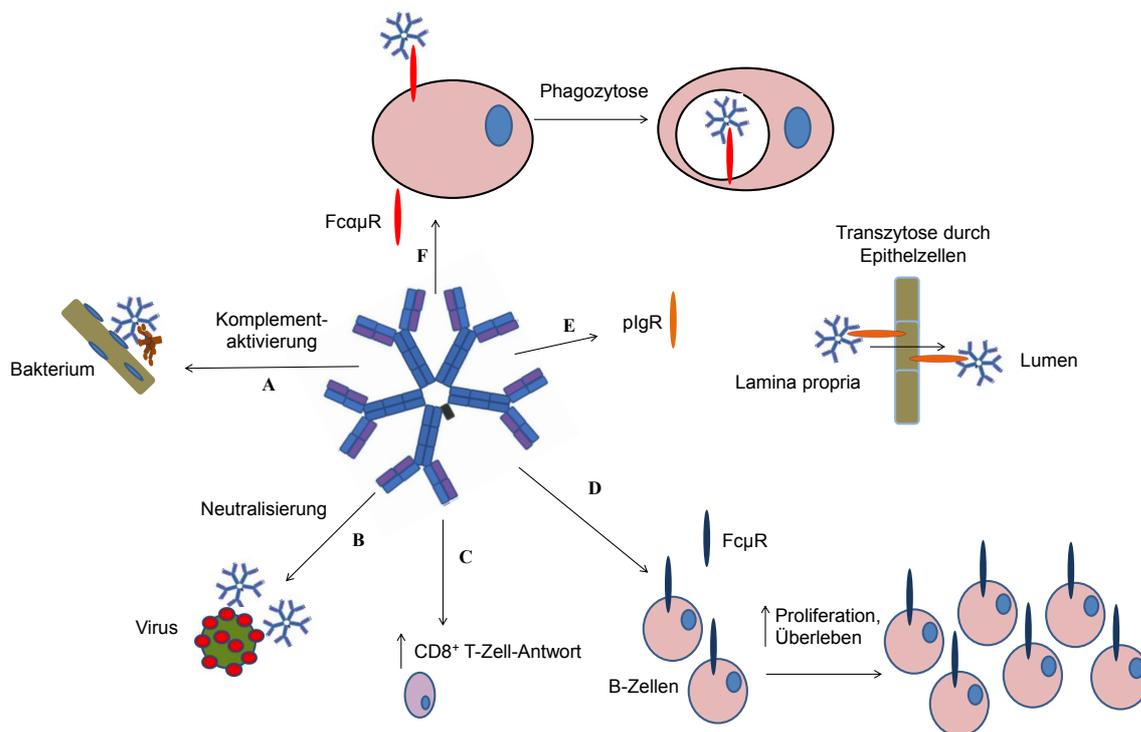
opsonisierten Pathogenen durch Bindung an Komplementrezeptoren phagozytischer Zellen oder auch eine Komplement-vermittelte Lyse von Mikroben zur Folge (2).

Es sind drei IgM Fc-Rezeptoren bekannt, der  $Fc\alpha\mu$ -Rezeptor ( $Fc\alpha\mu R$ ), der polyIg-Rezeptor (pIgR) und der  $Fc\mu$ -Rezeptor ( $Fc\mu R$ ). Dabei weist nur der  $Fc\mu R$  eine ausschließliche Bindungsspezifität für IgM auf (13). Der  $Fc\alpha\mu R$  sowie der pIgR hingegen binden ebenfalls an IgA. Der pIgR transportiert Antikörper durch epitheliale Zellen hindurch in das intestinale Lumen sowie in die Muttermilch. Dieser Transport wird über Bindung an die an IgA und IgM gebundene J-Kette vermittelt (14). Der  $Fc\alpha\mu R$  ist ein phagozytischer Rezeptor (15), der hauptsächlich von follikulären dendritischen Zellen (FDZ), aber auch B-Zellen und Makrophagen exprimiert wird.

Das Molekül Toso, das auch Faim3 genannt wird, wurde kürzlich als Rezeptor für IgM identifiziert (13, 16) und wird daher nun zumeist als  $Fc\mu R$  bezeichnet. Seine Funktion im Immunsystem ist bisher nur unzureichend charakterisiert. Der  $Fc\mu R$  ist ein Transmembranprotein. Seine Struktur ist gekennzeichnet durch eine extrazelluläre Ig-like Domäne, die eine Homologie zu der des  $Fc\alpha\mu R$  und pIgR aufweist. Der zytoplasmatische Teil des  $Fc\mu R$  enthält Tyrosin- und Serinreste, welche bei Aktivierung phosphoryliert werden können (16). Das Gen des  $Fc\mu R$  liegt auf Chromosom 1 in Nähe zu den Genen des  $Fc\alpha\mu R$  und des pIgR. Die Bindung an IgM führt zur Internalisierung des  $Fc\mu R$  und des gebundenen IgMs (17).

Der  $Fc\mu R$  wird von humanen B-, T- und NK-Zellen exprimiert. In Mäusen dagegen ist die Expression des  $Fc\mu R$  hauptsächlich auf B-Zellen beschränkt (13, 16, 18). Es wurde ebenfalls eine Expression auf dem angeborenen Immunsystem zugehörigen Zellen wie Makrophagen und Granulozyten beschrieben, die aber umstritten ist (19-21). Die Expression von  $Fc\mu R$  ist besonders stark auf reifen B-Zellen und wird in der Keimzentrumsreaktion verringert (18, 22). Bei der humanen chronischen lymphatischen Leukämie, einer malignen Erkrankung, die in der westlichen Welt die häufigste Leukämieform darstellt, ist der  $Fc\mu R$  überexprimiert (23, 24). In Patienten mit dieser Erkrankung kommt es zudem zur Expression größerer Mengen einer löslichen Form des  $Fc\mu R$ , die in gesunden Spendern kaum oder gar nicht detektierbar ist (25).

Die Funktion des Fc $\mu$ R wurde ursprünglich aufgrund der Beobachtung einer inhibitorischen Wirkung auf die Fas-vermittelte T-Zell-Apoptose als antiapoptotisch beschrieben (26). In neueren Studien wird der Einfluss von Fc $\mu$ R auf die Apoptose von Zellen kontrovers diskutiert (21, 27-31). Die Expression von Fc $\mu$ R hat Einfluss auf die Aktivierung und Funktion von B-Zellen. So ist die Expression von Fc $\mu$ R förderlich für das Überleben und die Proliferation von B-Zellen (22). Die Produktion von Antikörpern bei der Immunisierung mit thymusabhängigen Antigenen und die Keimzentrumsreaktion in Fc $\mu$ R ko Mäusen ist beeinträchtigt. Dies spricht für eine Beteiligung von Fc $\mu$ R an der von IgM vermittelten Verstärkung humoralen Immunantworten (22). Außerdem ist die Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments in Fc $\mu$ R ko Mäusen verändert (18, 21, 22). So ist in der Milz von Fc $\mu$ R ko Mäusen die Frequenz von Marginalzonen-B-Zellen vermindert, während die Frequenz von B1 B-Zellen erhöht ist (18). Die Gesamtanzahl von B- und T-Zellen in der Milz von wt und Fc $\mu$ R ko Mäusen ist jedoch nicht unterschiedlich (18).



**Abb. 1.2: IgM-vermittelte Effekte bei der Immunantwort**

- (A) Das Komplementprotein C1q bindet an IgM und löst die Komplementkaskade aus.
- (B) Die Neutralisierung von Partikeln wie Viren oder Toxinen blockiert deren Infektiosität bzw. schädliche Wirkung.
- (C) Natürliches IgM wirkt stimulatorisch auf vakzineinduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten.
- (D) Die Bindung an den Fc $\mu$ R auf B-Zellen fördert deren Proliferation und Überleben.
- (E) Die Bindung an den pIgR bedingt den Transport durch Epithelzellen ins mukosale Lumen, z.B. in der Lamina propria des Darmes.
- (F) Die Bindung an den Fc $\alpha\mu$ R bedingt die Phagozytose.

### 1.2 Malaria

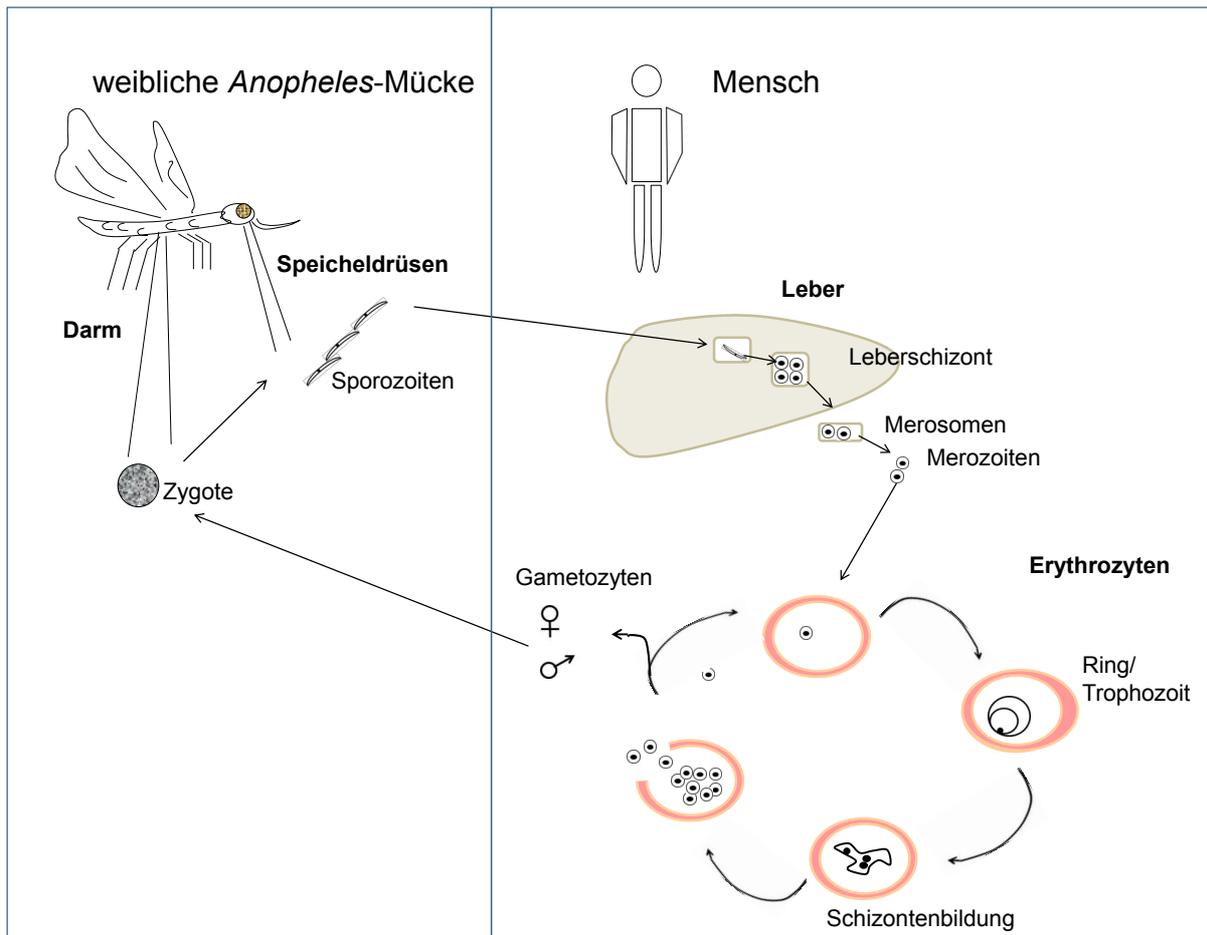
Die Malaria ist mit weltweit etwa 250 Millionen Fällen pro Jahr eine der am weitesten verbreiteten Infektionserkrankungen und tritt hauptsächlich in den Tropen und Subtropen auf. Es gibt 5 Erreger, die Menschen infizieren können, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi*. Hierbei ist der Erreger *Plasmodium falciparum* am gefährlichsten und verursacht die meisten der fast 1 Millionen Todesfälle jährlich, die vorwiegend in Afrika auftreten (WHO, 2010). Häufige Todesursachen sind Anämie und zerebrale Malaria (ZM).

#### 1.2.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium*

Der Lebenszyklus von *Plasmodium* (Abb. 1.3) wird durch die Blutmahlzeit einer mit *Plasmodium* infizierten *Anopheles*-Mücke eingeleitet, bei der Sporozoiten auf den Wirt übertragen werden. In diesem findet der asexuelle Teil des Lebenszyklus des Parasiten statt. Die Sporozoiten wandern mit dem Blutstrom in die Leber und initiieren durch die Infektion von Hepatozyten die Leberphase der Krankheit, wobei sie zunächst mehrere Hepatozyten durchwandern, bevor sie in ihrer Zielzelle verbleiben (32). Dort repliziert der Parasit in einem als exoerythrozytäre Schizogonie bezeichneten Prozess und setzt je nach Erreger nach einigen Tagen bis wenigen Wochen mehrere zehntausend Merozoiten pro infiziertem Hepatozyten ins Blut frei. Im Falle einer Infektion mit *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* kann es jedoch auch zu einem Ruhestadium in der Leberphase kommen, in dem der Parasit als Hypnozoit in der Leber verbleibt und noch Jahre später in die Blutphase übergehen kann.

In der Blutphase infizieren die Merozoiten Erythrozyten, in denen sie sich in der membranbegrenzten, sogenannten parasitophoren Vakuole befinden. Nun kommt es zur erythrozytären Schizogonie. Hierbei findet zunächst das Trophozoitenstadium statt, zu dessen Beginn der Parasit eine ringförmige Morphologie aufweist. Der Trophozoit ernährt sich vorwiegend von Glukose und Hämoglobin. Am Ende des Trophozoitenstadiums wird nach mehreren Teilungsschritten ein Schizont gebildet. Jeder reife Schizont enthält etwa 20 Merozoiten, die beim Platzen des Erythrozyten ins Blut freigesetzt werden und weitere Erythrozyten infizieren können. Die synchronisierte Freisetzung von Merozoiten, die je nach Erreger alle 2-3 Tage geschieht, ist verantwortlich für die auftretenden Fieberschübe, die durch die Produktion von Zytokinen wie TNF $\alpha$  bedingt sind. Es kommt es ebenfalls zur Bildung von Gametozyten aus einigen der Merozoiten. Diese werden bei einer weiteren

Blutmahlzeit einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen und ermöglichen den sexuellen Teil ihres Lebenszyklus in der Mücke durch Verschmelzung der aus den Gametozyten entstehenden Gameten zur Zygote und weitere Entwicklungsschritte. Es kommt daraufhin zur Produktion von Sporozoiten, die in die Speicheldrüsen der Mücke einwandern und bei der nächsten Blutmahlzeit einen neuen Wirt infizieren können (33, 34).

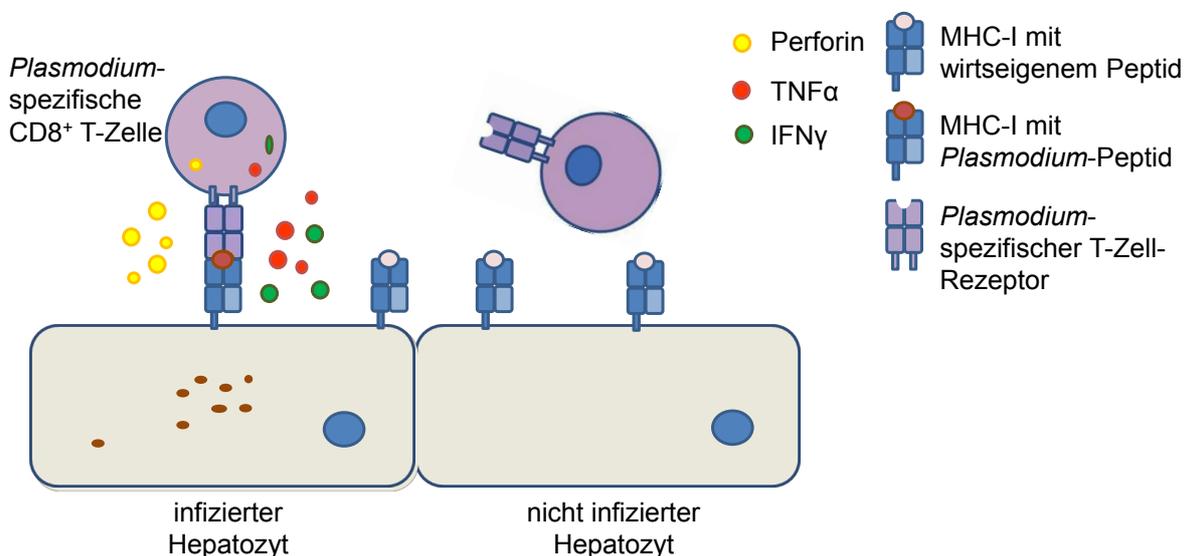


**Abb. 1.3 Der Lebenszyklus von *Plasmodium***

Beim Stich einer mit *Plasmodium* infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke werden infektiöse Sporozoiten übertragen, die über das Blut in die Leber gelangen und dort Hepatozyten infizieren. Im humanen Wirt wird der asexuelle Zyklus durchlaufen (Schizogonie). Die Replikation in Hepatozyten führt zur Bildung eines Schizonten und schließlich zur Abschnürung von Merozoiten enthaltenden Merosomen beim Übergang in die Blutphase. Freigesetzte Merozoiten infizieren Erythrozyten und reifen über das Trophozoitenstadium zum Schizonten heran. Beim Platzen der infizierten Erythrozyten werden Merozoiten freigesetzt, die erneut Erythrozyten infizieren können. Bei der erythrozytären Vermehrung entstehen außerdem Gametozyten, die bei einer Blutmahlzeit in die *Anopheles*-Mücke gelangen können, in der der sexuelle Zyklus durchlaufen wird (Sporogonie). Hierbei entsteht im Mückendarm eine Zygote, aus der nach weiteren Entwicklungsschritten neue Sporozoiten gebildet werden, die in die Speicheldrüsen einwandern und bei einer weiteren Blutmahlzeit in einen neuen humanen Wirt gelangen können.

### 1.2.2 Immunantwort gegen Plasmodien und Pathologie

Nach der Inokulation von Sporozoiten in die Haut des Wirts erfolgt die Initiierung einer Immunantwort, bei der  $CD8^+$  T-Zellen in den die Haut drainierenden Lymphknoten aktiviert werden (35). Die Aktivierung von  $CD8^+$  T-Zellen ist für den Erwerb einer Immunität in der Leberphase essentiell (36). Dabei sind sowohl direkt zytotoxische Perforin-vermittelte Effektormechanismen, als auch die Produktion von  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  von Bedeutung für den Schutz durch  $CD8^+$  T-Zellen, wobei der Schutz durch Perforin vom *Plasmodium*-Stamm abhängig ist (37-39). Die durch die Zytokinproduktion bedingte Schutzwirkung wird zum Teil über eine Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthese (iNOS) in Hepatozyten vermittelt, wobei das entstehende NO antiparasitär wirkt (37, 40, 41).



**Abb. 1.4: Effektormechanismen von  $CD8^+$  T-Zellen in der Leberphase der *Plasmodium*-Infektion**

$CD8^+$  T-Zellen erkennen ihr Antigen im Komplex mit MHC-I auf Hepatozyten und können ihre antiparasitäre Wirkung in einer Infektion über die Sekretion des zytotoxischen Moleküls Perforin und über die Sekretion der Zytokine  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  entfalten.

Ein Problem bei der Immunantwort gegen die Leberphase bei der Infektion eines naiven Individuums ist, dass eine Immunantwort durch  $CD8^+$  T-Zellen oft erst dann voll wirksam werden kann, wenn der Parasit die Leber bereits verlassen hat und in die Blutphase übergegangen ist. Selbst bei einer erneuten Infektion muss die Anzahl der zuvor induzierten  $CD8^+$  T-Zellen sehr hoch sein, damit innerhalb der Leberphase alle infizierten Hepatozyten erkannt und die Parasiten erfolgreich bekämpft werden können. Des Weiteren kommt

erschwerend hinzu, dass es sich bei der Leber um ein Organ handelt, in dem Immunantworten in der Regel supprimiert werden.

In der Blutphase der Infektion werden andere Antigene exprimiert als in der Leberphase, zudem ist eine Schutzwirkung durch  $CD8^+$  T-Zellen nicht möglich, weil infizierte Erythrozyten der Erkennung durch  $CD8^+$  T-Zellen durch das generelle Fehlen der Expression von MHC-I Molekülen entgehen. Einen weiteren Schutzmechanismus des Parasiten vor dem Immunsystem des Wirts stellt das Verlassen der Leber in von Leberzellen stammenden Vesikeln, den Merosomes dar, da freie Merozoiten von phagozytischen Zellen in der Leber phagozytiert werden (42, 43).

Eine Erkennung des Parasiten durch das angeborene Immunsystem in der Blutphase erfolgt u.a. über die Bindung von Molekülen des Parasiten an auf Zellen des angeborenen Immunsystems befindliche Toll-like-Rezeptoren (TLR). So ist das *Plasmodium* Glykosylphosphatidylinositol (GPI) ein Ligand für TLR2 und in geringerem Ausmaß auch für TLR4 (44). Das beim Abbau von Hämoglobin entstehende Hämozin bzw. an Hämozin gebundene Nukleinsäuren sind ein Ligand für TLR9 (45). Die Aktivierung von TLR hat die Produktion von Zytokinen wie  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  sowie von NO zur Folge. Dies ist für einen protektiven Effekt wichtig, jedoch führt eine übermäßige Produktion der genannten Moleküle zu einer Pathologie.

DZ präsentieren T-Zellen Antigene und induzieren so  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zell-Antworten. Dabei spielen  $CD4^+$  T-Zellen als T-Helferzellen bei der Antikörperproduktion eine Rolle und sind somit an der Vermittlung eines Schutzes beteiligt. Ein eindrucksvoller Beweis für die schützende Wirkung von Antikörpern ist der Befund, dass der Transfer von IgG von zuvor mit Malaria infizierten Erwachsenen in infizierte Kinder mit hohen Parasitämien zu einer schnellen Reduktion der Parasitämie führt (34, 46). Die Induktion einer Antikörperantwort kann auch erklären, warum in Erwachsenen durch wiederholte Infektionen in Endemiegebieten oft eine Semi-Immunität entsteht. Diese Semi-Immunität ist durch eine geringe Parasitämie und Symptomatik ausgezeichnet. Besonders Kinder bis zu einem Alter von 5 Jahren sind jedoch gefährdet, eine schwere Malaria zu entwickeln. Das Auftreten einer schweren Malaria bei Kindern ist u.a. mit einer verminderten Antikörperantwort im Vergleich zu an unkomplizierter Malaria erkrankten Kindern assoziiert (47).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen können neben ihrer schützenden Funktion als T-Helferzellen auch eine Rolle bei der Entstehung der zerebralen Pathologie spielen. Hierbei bedingt die IFN $\gamma$ -Produktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Akkumulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn und trägt so zur zerebralen Symptomatik bei (48).

Die Entwicklung der ZM ist eine schwerwiegende Komplikation der Infektion mit *Plasmodium falciparum* im Menschen. Im entsprechenden Mausmodell der Erkrankung, der Infektion mit *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) in den suszeptiblen C57BL/6 Mäusen, tritt ebenfalls eine zerebrale Pathologie, die EZM (experimentelle zerebrale Malaria) auf. Mit dem Auftreten zerebraler Symptome werden zusätzlich zu der Sequestration infizierter Erythrozyten an das vaskuläre Endothel, wodurch deren Entfernung in der Milz verhindert wird, CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Hirn in Verbindung gebracht. Die Beteiligung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Entwicklung einer Pathologie ist dadurch belegt, dass die Abwesenheit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Schutz vor dieser Symptomatik vermitteln kann (49). CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen dabei ihr Antigen auf Endothelzellen im Gehirn und tragen durch Granzym B und Perforin involvierende Mechanismen zur Entwicklung der zerebralen Pathologie bei (50, 51). IFN $\gamma$  als weiteres Effektormolekül von CD8<sup>+</sup> T-Zellen kann zwar die verstärkte Expression von MHC-I Molekülen auf Hirnendothelzellen bewirken und dadurch potentiell eine CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort verstärken, jedoch ist die Expression von IFN $\gamma$  durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht notwendig für die Entwicklung der zerebralen Symptomatik (51, 52).

### ***IgM bei der Malaria-Infektion***

Es konnte gezeigt werden, dass bei *Plasmodium falciparum* die Bindung von IgM an Erythrozyten mit der Formierung von Erythrozyten-Rosetten sowie mit der Schwere der Malaria assoziiert ist (53). IgM kann über seinen Fc-Teil an auf der Oberfläche von infizierten Erythrozyten befindliche Varianten des Proteins PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) binden. Es wurde darüber spekuliert, dass durch diese Bindung die Interaktion des gebundenen IgMs mit Wirtsproteinen beeinflusst werden könnte, wie z.B. dem Komplementprotein C1q oder dem Fc $\mu$ R. Des Weiteren wurde diskutiert, dass die bei der Infektion mit *Plasmodium falciparum* beobachtete polyklonale B-Zell-Aktivierung durch eine veränderte Interaktion von IgM mit dem Fc $\mu$ R bedingt sein könnte (54).

Bei der experimentellen Vakzinierung gegen Malaria wurde festgestellt, dass antigenspezifisches IgM als Adjuvanz für eine schützende IgG-Antwort wirken kann (55).

### 1.2.3 Bekämpfung der Malaria

Die Bekämpfung der Malaria ist grundsätzlich durch die Behandlung mit gegen *Plasmodium* wirksamen Medikamenten, eine Impfung sowie eine Bekämpfung des Vektors möglich.

Für die Vektorbekämpfung werden sowohl mit Insektiziden behandelte Bettnetze als auch insektizide Sprays verwendet. Problematisch ist hier allerdings die Entwicklung von Resistenzen gegen die verwendeten Insektizide (34).

Die Entwicklung von Resistenzen ist auch bei der medikamentösen Behandlung von Malaria von Bedeutung. So verbreiteten sich gegen das sehr häufig eingesetzte synthetisch hergestellte Medikament Chloroquin Resistenzen. Die Wirkung von Chloroquin beruht auf der Störung der Bildung des Malariapigments Hämozoin. Die Bildung von Hämozoin schützt den Parasiten vor beim Abbau von Hämoglobin entstehenden und für den Parasiten toxischen Molekülen. Nach dem Auftreten von Chloroquinresistenzen haben sich Artemisinin-basierte Kombinationstherapien gegen Malaria etabliert. Artemisinin schädigt den Parasiten durch die Bildung von Radikalen. Trotz einer schnellen Eliminierung der Parasiten kommt es zu einer Mortalität von 15-20 % bei ZM und metabolischer Azidose. Außerdem sind in Asien bereits Artemisininresistenzen aufgetreten, sodass auch diese Therapie keine zufriedenstellende Dauerlösung bietet (56).

Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Vektorbekämpfung und der medikamentösen Behandlung der Malaria ist die Entwicklung eines Impfstoffes nach wie vor von großem Interesse.

#### ***Malaria-Vakzinierungen***

Eine Vakzinierung bietet die Möglichkeit des Schutzes vor einer Infektion mit einem Pathogen durch die Induktion einer Immunantwort bereits vor dem Erstkontakt, bzw. in weiter gefassten Anwendungen die Verstärkung von Immunantworten bei bereits bestehenden Erkrankungen wie in der Tumorthherapie. Der Schutz einer Vakzinierung basiert auf der Induktion einer adaptiven Immunantwort und kann über T-Zellen und/oder über antikörperproduzierende B-Zellen vermittelt werden. Wichtig für einen langfristigen Schutz ist dabei die Induktion antigenspezifischer Memory-Zellen. In der Regel werden für eine erfolgreiche Vakzinierung Adjuvantien benötigt, die zusätzlich zu dem die Immunantwort initiiierenden Antigen verabreicht werden, um die PRR des angeborenen Immunsystems zu

aktivieren die für die Generierung einer adaptiven Immunantwort wichtige Kostimulation zu ermöglichen (2).

Die Entwicklung einer effektiven Malaria-Vakzine ist trotz intensiver Forschung bisher nicht gelungen. Entwickelte Ansätze richten sich gegen die Leberphase, die Blutphase oder gegen eine Transmissions des Erregers.

Impfstoffe gegen die Leberphase sind besonders interessant, da es in dieser Phase noch zu keinen Krankheitssymptomen kommt und die Antigene in der Leberphase nicht variabel sind. Schon früh wurde festgestellt, dass bestrahlte Sporozoiten einen Schutz gegen eine Malaria-Infektion vermitteln können (57). Eine weitere Möglichkeit bei der Immunisierung mit Sporozoiten ist deren genetische Attenuierung (58, 59). Für die Vermittlung eines Schutzes bei der Immunisierung mit Sporozoiten sind  $CD8^+$  T-Zellen essentiell (36). Während die Immunisierung mit Sporozoiten den Vorteil bietet, dass eine Immunantwort gegen diverse Antigene initiiert wird, besteht der Nachteil in der Schwierigkeit, ausreichende Mengen von Sporozoiten für Massimpfungen bereitzustellen. Eine Alternative hierzu besteht in einer gezielten Immunisierung gegen Leberphasenantigene.

Ein sehr gut charakterisiertes Leberphasenantigen ist das Circumsporozoitenprotein (CSP), welches in seiner adhäsiven Konformation für die Invasion von Hepatozyten benötigt wird (60). Das CSP ist immunogen, wie aus der Generierung CSP-spezifischer T-Zellen und Antikörper hervorgeht. Die Immunisierung gegen CSP wird auch bei der RTS,S Vakzine angewendet, welche in den klinischen Studien sehr weit fortgeschritten ist. Bei der RTS,S Vakzine wird das Hepatitis B surface antigen (HBsAg) verwendet, welches zu 25 % mit dem C-terminalen Teil des CSP fusioniert ist. Der C-terminale Teil des CSP enthält dabei sowohl B- als auch T-Zell-Epitope. Die Schutzwirkung der RTS,S Vakzine ist allerdings moderat und beträgt oft nur etwa 50 %, wie beispielsweise in einer Studie bei afrikanischen Kindern im Alter zwischen 5 und 17 Monaten (34, 61).

In der Blutphase können besonders *Plasmodium*-spezifische Antikörper wichtige antiparasitäre Mechanismen vermitteln. Mögliche Wirkmechanismen sind hierbei die Blockade der Interaktion von infizierten Erythrozyten mit Endothelzellen, die Opsonisierung und Zerstörung von Merozoiten und infizierten Erythrozyten durch phagozytische Zellen sowie die Neutralisierung von proinflammatorisch wirkenden *Plasmodium*-spezifischen Molekülen wie GPI. Problematisch bei der Suche nach möglichen Zielantigenen zur

Entwicklung einer Blutphasenvakzine ist, dass diese oft eine hohe Variabilität besitzen. So ist z.B. das Protein PfEMP1 ein potentieller Kandidat für die Entwicklung einer Blutphasenvakzine. PfEMP1 wird auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten exprimiert und ist an ihrer Sequestration an das Endothel beteiligt. Die hohe Variabilität von PfEMP1 ist durch seine Kodierung durch mindestens 60 *var* Gene bedingt und wird zusätzlich durch zwischen verschiedenen Klonen auftretende Polymorphismen erhöht. Daher kann der Parasit bei der Erkennung eines PfEMP1 Proteins durch das Immunsystem durch die Verwendung anderer PfEMP1 Varianten der gegen das ursprünglich exprimierte Molekül gerichteten Immunantwort entgehen (34).

Transmissionsblockierende Impfstoffe sollen die Parasitenentwicklung über einen antikörpervermittelten Mechanismus im Mückendarm blockieren und werden in einer natürlichen Infektion gebildet. Problematisch ist jedoch, dass ein transmissionsblockierender Impfstoff allein den geimpften Träger nicht vor einer Infektion schützt, sondern nur eine Übertragung auf andere Individuen verhindert. Außerdem müssen die Antikörper im Blut einen sehr hohen Titer erreichen, um ihre Wirkung zu vermitteln (34).

### **Die Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis* als Vakzine-Carrier**

*Bordetella pertussis*, ein gram-negatives Bakterium, ist der Erreger des Keuchhustens, einer Atemwegsinfektion, welche besonders für nicht vakzinierte Kinder gefährlich ist. Kennzeichnend für *B. pertussis* ist die Produktion von Toxinen, z.B. der Adenylatzyklase (ACT).

Die ACT wird von *B. pertussis* sekretiert, bindet an ihre Zielzellen und transloziert anschließend ihre katalytische Domäne ins Wirtszellzytosol. Zwar können viele verschiedene Zelltypen befallen werden, jedoch transloziert die ACT vorwiegend in CD11b/CD18 exprimierende Zellen (62). CD11b/CD18 exprimierende Zellen sind APZ wie myeloide DZ und Makrophagen, aber auch NK-Zellen und Neutrophile. Durch die Translokation der ACT in ihre Zielzellen wird eine negative Modulation der Immunantwort des Wirtes ermöglicht. Dabei spielt sowohl die Induktion der Apoptose in den Zielzellen als auch eine Inhibierung deren immunologischer Effektorfunktionen eine Rolle. So induziert ACT die Apoptose von Makrophagen (63) und führt zur Inhibition von Chemotaxis und Superoxid-Produktion (64). Diese Effekte werden durch die von der ACT nach Aktivierung durch in der Wirtszelle befindliches Calmodulin katalysierte Umsetzung von ATP zu cAMP (64) vermittelt.

Die ACT ist durch die Translokation ihrer zytoplasmatischen Domäne ins Zytosol von APZ und damit in den MHC-I Präsentationsweg in der Lage, in Vakzinen als Antigen-träger zur Induktion von CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten zu fungieren. Dabei wird eine detoxifizierte Variante des Proteins eingesetzt, welche die gewünschten Epitope in der translozierten Domäne trägt. Insbesondere ein Einsatz dieses Vakzine-Carriers in heterologen Prime/Boost-Immunisierungen hat sich als wirkungsvoll erwiesen, z.B. bei der Induktion CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der murinen Malaria (65, 66) sowie bei der Immuntherapie HPV16 induzierter Tumore (67).

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern auf CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten auswirkt. Der an IgM bindende Fc $\mu$ R ist in Mäusen auf B-Zellen stark exprimiert (13). Es ist bekannt, dass B-Zellen für die Induktion von T-Zell-Antworten von Bedeutung sind und natürliche Antikörper als Adjuvantien für CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten wirken (9). Daher sollte geklärt werden, ob über den Fc $\mu$ R vermittelte Signale die Stärke einer CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort beeinflussen können.

Als Modelle zur Untersuchung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort wurden die experimentelle Malaria-Vakzinierung und -Infektion ausgewählt. Bei der Vakzinierung gegen die Leberphase der Malaria vermitteln CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Schutz, indem sie die Parasiten in infizierten Hepatozyten bekämpfen. Die Vakzinierung der Mäuse sollte mit dem Vakzine-Carrier Adenylatzyklasetoxoid (ACT) erfolgen. Dieser induziert je nach verwendetem Konstrukt für das in der Leberphase exprimierte Circumsporozoitenprotein (CSP) oder für das Modellantigen Ovalbumin spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort sollte mittels einer MHC-I Multimerfärbung sowie einer Analyse der Zytokinproduktion verfolgt werden. Des Weiteren sollte die Effizienz der Vakzinierung durch die Bestimmung der Parasitenlast nach der Infektion vakzinierter Mäuse analysiert werden. Nachfolgend sollte durch die Verwendung B-Zell-defizienter Mäuse untersucht werden, ob die den Fc $\mu$ R stark exprimierenden B-Zellen für beobachtete Effekte verantwortlich sein könnten. Außerdem sollte bestimmt werden, welche Rolle der Fc $\mu$ R bei der Infektion mit *Plasmodium berghei* ANKA spielt, bei der CD8<sup>+</sup> T-Zellen maßgeblich für die Ausprägung einer zerebralen Pathologie verantwortlich sind.

## 2. Material

### 2.1 Laborgeräte

Analysenwaage	<i>Satorius AG, Göttingen</i>
CO <sub>2</sub> -Inkubator	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Durchflusszytometer „Accuri C6“	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Durchflusszytometer „LSRII“	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Mikroskop „Axiostar plus“	<i>Zeiss, Oberkochen</i>
Mikroskop „Wilovert 30“	<i>Leica WETZLAR, Wetzlar</i>
Nano-Drop 2000c	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
PCR Maschine „Corbett RG6000“	<i>Qiagen, Hilden</i>
Pipetten	<i>Gilson, Middleton, USA</i>
Pistill	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Sterile Arbeitsbank „Lamin Air HB 2448“	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Wasserbad	<i>Braun, Melsungen</i>
Zentrifuge „Centrifuge 5415 R“	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Zentrifuge „Centrifuge 5810 R“	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Zentrifuge „J2-HS Centrifuge“	<i>Beckman Coulter, Krefeld</i>

### 2.2 Glas- und Plastikwaren

Cell Strainer „Falcon“	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Einmal-Injektionskanülen (0,4 x 20 mm)	<i>Braun, Melsungen</i>
Einwegpipetten (5 und 10 mL)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
FACS-Röhrchen	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Glaspipetten	<i>Brand, Wertheim</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Brand, Wertheim</i>
Petrischale	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen und Sarstedt, Nümbrecht</i>
Spritzen (5 und 10 mL)	<i>Braun, Melsungen</i>
Sterilfilter (0,22 µm, Stericup & Steritop)	<i>Millipore, Schwalbach</i>
Sterilfilter „Filtropur“ (0,45 µm)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Zellkulturplatten 96-Well	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen</i>
Zentrifugentröhrchen (15 und 50 mL)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>

### 2.3 Chemikalien

Die benutzten Chemikalien stammen, sofern nicht anders deklariert, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

### 2.4 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

Die Randomprimer stammen von Invitrogen (Darmstadt), die anderen benutzten Primer stammen von TIB Molbiol (Berlin).

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
Pb 18S rRNA forward	GGATGTATTCGCTTTATTTAATGCTT
Pb 18S rRNA revers	CACGCGTGCAGCCTAGTAT
Maus GAPDH forward	GGGTGTGAACCACGAGAAAT
Maus GAPDH revers	CCTTCCACAATGCCAAAGTT

## 2.5 Enzyme und Puffer für molekularbiologische Arbeiten

Ampuwa	<i>Fresenius Kabi, Bad Homburg</i>
dNTPs	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
5x Reaction Buffer for RT	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
Revert Aid H minus reverse Transkriptase	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>
Maxima Sybr Green qPCR Mastermix	<i>Thermo Scientific, Waltham, USA</i>

## 2.6 Material für zellbiologische Arbeiten

Collagenase A	<i>Roche, Mannheim</i>
DNaseI	<i>Roche, Mannheim</i>
EasySep Negative Selection Mouse B cell Enrichment Kit	<i>Stem Cell Technologies, Grenoble, Frankreich</i>
EDTA Probenröhrchen	<i>Kabe, Nümbrecht-Elsenroth</i>
Fc-Block	<i>BNI, Hamburg</i>
Fixierungsreagenz „BD Cytotfix/Cytoperm“	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Fötale Kälberserum (FCS)	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
Gentamycin-Lösung	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
Golgi-Stop	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Incidin Liquid	<i>Ecolab, Düsseldorf</i>
L-Glutamin	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
Monensin	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
NycoPrep Universal	<i>Axis-Shield, Oslo, Norwegen</i>
Peptid CSP <sub>245-253</sub> (SYIPSAEKI)	<i>Proimmune, Oxford, UK</i>
Peptid OVA <sub>257-264</sub> (SIINFEKL)	<i>MWG-Biotech AG, Ebersberg</i>
Percoll	<i>GE Healthcare, Uppsala, Schweden</i>
Permeabilisierungsreagenz „BD Perm/Wash“	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>

## 2.7 Kulturmedium, Puffer und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

### Medium

500 mL	RPMI 1640
25 mL	FCS
5 mL	L-Glutamin (200 mM)
2,5 mL	Gentamycin (10 mg/mL)

### Erythrozytenlysepuffer

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

### 10 x PBS (Phosphate Buffered Saline)

80 g	Natriumchlorid (NaCl)
2 g	Kaliumchlorid (KCl)
14,4 g	Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
2,4 g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )

ad 1L dH<sub>2</sub>O

pH 7,4

### FACS-Puffer

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

### Percoll A

78 %	Percoll-Stammlösung
22 %	1 x PBS

### 80 % Percoll

80 %	Percoll-Stammlösung
20 %	Medium

### Percoll-Stammlösung

90%	Percoll
10%	10 x PBS

### Percoll B

33 %	Percoll-Stammlösung
67 %	RPMI 1640

### 40 % Percoll

40 %	Percoll-Stammlösung
60 %	Medium

## 2.8 Antikörper und MHC-Multimere

### Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper und sekundäre Detektions-Reagenzien

Spezifität	Klon	Herkunft
Anti-Maus CD3 PerCP Cy5.5	145-2C11	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus CD4 FITC	RM4-5	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus CD8 APC	53-6.7	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus CD8 FITC	53-6.7	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus CD8 PE	53-6.7	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus CD8 e450	53-6.7	<i>eBioscience, San Diego, USA</i>
Anti-Maus CD11b V450	M1/70	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus CD11c PE Cy7	N418	<i>eBioscience, San Diego, USA</i>
Anti-Maus CD19 APC	6D5	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus CD19 FITC	1D3	<i>eBioscience, San Diego, USA</i>
Anti-Maus CD19 PE	6D5	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus CD45 PerCP	30-F11	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus CD62L FITC	MEL-14	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus CD86 Biotin	PO3	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus CD86 PE	GL1	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Anti-Maus Fc $\mu$ R Alexa 647	B68	<i>K.-H. Lee, Borstel</i>
Anti-Maus IFN $\gamma$ Alexa 488	XMG1.2	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus IFN $\gamma$ APC	XMG1.2	<i>Biolegend, San Diego, USA</i>
Anti-Maus IFN $\gamma$ PE	XMG1.2	<i>eBioscience, San Diego, USA</i>
Anti-RIgG Alexa 647	polyklonal	<i>Jackson Immunoresearch, West Grove, USA</i>
Streptavidin APC		<i>Biolegend, San Diego, USA</i>

### MHC-I Multimere

MHC-I H2-K <sup>d</sup> CSP <sub>245-253</sub> Pentamer APC	<i>ProImmune, Oxford, UK</i>
MHC-I H2-K <sup>b</sup> OVA <sub>257-264</sub> Pentamer APC	<i>ProImmune, Oxford, UK</i>

### In vivo verwendete Antikörper

<u>Spezifität</u>	<u>Klon</u>	<u>Herkunft</u>
Anti-Maus Fc $\mu$ R	A96	<i>K.-H. Lee, Borstel</i>
Anti-Maus Fc $\mu$ R	B68	<i>K.-H. Lee, Borstel</i>
RIgG (Isotypkontrolle)		<i>Jackson Immunoresearch, West Grove, USA</i>

### **2.9 ACT-CSP/ ACT-OVA**

ACT-CSP	<i>P. Sebo, Prag, Tschechische Republik</i>
ACT-OVA	<i>P. Sebo, Prag, Tschechische Republik</i>

### **2.10 Mäuse**

<u>Stamm</u>	<u>Herkunft</u>
BALB/c	Charles River oder BNI, Hamburg
C57BL/6	Charles River, BNI, Hamburg oder K.-H. Lee, Borstel
C57BL/6 Fc $\mu$ R ko	K.-H. Lee, Borstel oder BNI, Hamburg
C57BL/6 JHT	BNI, Hamburg

### **2.11 Parasiten**

<i>Plasmodium berghei</i> ANKA	BNI, Hamburg
--------------------------------	--------------

## 3. Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolation von RNA aus muriner Leber

Die Isolation von RNA aus der Leber zur Detektion von *Plasmodium*-RNA erfolgte 30 Stunden nach der Infektion der Mäuse mit Sporozoiten. Hierzu wurden die Lebern vor Entnahme über die Pfortader mit 5 mL PBS gespült, komplett entnommen, in Trizol gegeben und mit einem Pistill zerkleinert. Anschließend wurden die Lebern in 5 mL Trizol bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen der Lebersuspension wurden 2,5 mL abgenommen, mit 1 mL Chloroform versetzt, 15 Sekunden geschüttelt und dann 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (7000 rpm, 15 Minuten, 4°C) und das Abpipettieren der wässrigen, RNA-haltigen Phase. Zu dieser wurden 2,5 mL Isopropanol gegeben, dann folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (7000 rpm, 10 Minuten, 4°C) wurde das Pellet mit 5 mL 75 % Ethanol gewaschen, gevortext und abzentrifugiert (7000 rpm, 5 Minuten, 4°C). Das RNA-Pellet wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, in RNase-freiem Ampuwa aufgenommen und durch 10-minütige Inkubation bei 55°C gelöst. Die RNA-Konzentration wurde am Nano-Drop bestimmt und die RNA bei -80°C eingefroren.

#### 3.1.2 cDNA-Synthese

Retrovirale reverse Transkriptasen sind in der Lage, unter Verwendung von RNA als Matrix eine komplementäre cDNA zu synthetisieren. Diese Enzyme wurden für die Synthese von cDNA aus der zuvor aus der Leber isolierten RNA verwendet. Als Primer wurden Random-Primer verwendet. Zunächst wurde ein Ansatz aus je 1 µg RNA, 300 ng Randomprimern und 1 µL 10 mM dNTPs mit Ampuwa auf 12 µL Gesamtvolumen eingestellt. Dieser wurde 5 Minuten bei 65°C inkubiert, auf Eis gestellt und nun mit 8 µL Mastermix, bestehend aus 4 µL 5x Reaction Buffer for RT, 1 µL Reverser Transkriptase und 3,5 µL Ampuwa versetzt. Es erfolgte eine Inkubation von 60 Minuten bei 42°C und anschließend von 10 Minuten bei 70°C. Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

### 3.1.3 Quantitative Real-Time PCR

Zur Quantifizierung der Expression eines Gens mittels einer quantitativen PCR wird sowohl eine PCR, welche spezifisch für das Zielgen ist, als auch eine PCR, welche spezifisch für ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen ist, durchgeführt. Somit wird eine Normalisierung der Menge der exprimierten Zielgen-RNA in individuellen Proben ermöglicht. Die Vervielfältigung der DNA durch die PCR kann hierbei durch das bei der Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Sybr-Green in die entstehende doppelsträngige DNA auftretende Fluoreszenzsignal verfolgt werden.

In dieser Arbeit wurde die *Plasmodium* 18S rRNA in Relation zur RNA des Referenzgens Maus-GAPDH quantifiziert. Dazu wurden von jeder Probe jeweils Duplikate zur Bestimmung der GAPDH-mRNA und der *Plasmodium* 18S rRNA angesetzt. Pro Ansatz wurden 0,5  $\mu$ L cDNA und 9,5  $\mu$ L eines Mastermixes, bestehend aus je 1  $\mu$ L forward- und reverse-Primern (5 pmol/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L Sybr-Green Mastermix und 2,5  $\mu$ L Ampuwa eingesetzt. Der für die quantitative Real-Time-PCR verwendete Temperaturverlauf wurde wie folgt gewählt: 15 Minuten bei 95°C, 35 Wiederholungen von je 15 Sekunden bei 95°C, 20 Sekunden bei 50°C und 20 Sekunden bei 68°C und anschließend 30 Sekunden 95°C. Die Analyse der Daten erfolgte nach der  $\Delta\Delta$  Ct Methode.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Präparation von murinen Milzzellen

Die Milzen wurden aus den Mäusen präpariert, in RPMI-Medium zerrieben und zum Erhalt einer Einzelzellsuspension über ein Zellsieb gegeben. Nach einer Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 5 Minuten) und dem Abnehmen des Mediums wurden die Zellen 5 Minuten mit 5 mL Erythrozytenlysepuffer inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 10 mL Medium abgestoppt und die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation in frischem Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

### 3.2.2 Präparation von murinen Lymphozyten aus der Leber

Die Lebern wurden aus den Mäusen präpariert, in PBS zerrieben und zum Erhalt einer Einzelzellsuspension über ein Zellsieb gegeben. Nach Zentrifugation der Zellen (1400 rpm, 4°C, 10 Minuten) wurde das PBS abgenommen und die Zellen in 5 mL 80 % Percoll

resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Überschichtung mit 5 mL 40 % Percoll. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation (2000 rpm, 21°C, 25 Minuten ohne Bremse) und das Abpipettieren der Interphase des Gradienten. Diese enthält die Leberlymphozyten und wurde nun mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten mit 5 mL Erythrozytenlysepuffer inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 10 mL PBS abgestoppt und die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation in frischem Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

Alternativ erfolgte die Isolation der murinen Leberlymphozyten nach Präparation des Organs, des Zerreibens in PBS, der Filtration durch ein Zellsieb und der Zentrifugation über einen Nycoprep-Gradienten. Hierbei wurde das Zellpellet in einem Volumen von 6,5 mL, zusammengesetzt aus 1 mL RPMI ohne Zusätze und 5,5 mL 1:1 mit Aqua bidest vorverdünntem Nycoprep, aufgenommen und die Zellsuspension unter 2 mL RPMI ohne Zusätze geschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation (2500 rpm, 4°C, 20 Minuten ohne Bremse), das Abpipettieren des Lymphozytenringes und ein zweimaliges Waschen mit je 10 mL PBS. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit 5 mL Erythrozytenlysepuffer inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 10 mL PBS abgestoppt und die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation in frischem Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

#### **3.2.3 Präparation von murinen Lymphozyten aus dem Hirn**

Nach Präparation des Gehirns wurde dieses mit einem Skalpell zerkleinert und mit 5 mL RPMI-Medium mit 1 mg/ mL Collagenase und 0,1 mg/ mL DNase I für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Gehirn zerrieben, mit 10 mL PBS über ein Zellsieb gegeben und zentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 10 Minuten). Das Pellet wurde in 2,5 mL Percoll B resuspendiert, mit 2 mL Percoll A unterschichtet und es wurde erneut zentrifugiert (2500 rpm, 4°C, 30 Minuten ohne Bremse). Die Zellen an der Trennfläche wurden abpipettiert und drei Mal mit je 10 mL Medium gewaschen. Nach Aufnahme der Zellen in frischem Medium erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer.

#### 3.2.4 Durchflusszytometrie

Die Analyse von Zellen mit der Durchflusszytometrie ist eine Methode, die die individuelle Messung vieler Zellen einer Probe ermöglicht. Dabei können die Zellen zunächst je nach Bedarf mit fluorochrommarkierten Antikörpern, die spezifisch an die zu analysierenden Moleküle binden, angefärbt werden. Nachfolgend erfolgt die durchflusszytometrische Analyse, bei der die Zellen im Durchflusszytometer mittels Laserlichtstrahlen und spezifischer Detektoren charakterisiert werden. Die Streuung des Lichtes gibt hierbei einen Aufschluss über Größe (Vorwärtsstreuung) und Granularität (Seitwärtsstreuung) der Zellen. Des Weiteren geben die nach Inkubation der Zellen mit den fluorochrommarkierten Antikörpern gemessenen Fluoreszenzintensitäten Aufschluss über die Expressionsstärke des zu analysierenden Moleküls.

Bei der peptidspezifischen Restimulation wurden  $1-1,5 \times 10^6$  Zellen in RPMI-Medium für 5 Stunden mit jeweils  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  CSP<sub>245-253</sub> oder  $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$  OVA<sub>257-264</sub> stimuliert. Die letzten 4 Stunden der Stimulation erfolgten in der Anwesenheit von Golgi-Stop in einer 1:250 Verdünnung oder von Monensin in einer 1:1000 Verdünnung. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 7 Minuten) und anschließend mit anti-CD8 Antikörper gefärbt (30 Minuten, 4°C). Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit Cytotfix/Cytoperm Puffer inkubiert (15 Minuten, 4°C) und mit Perm-Wash-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit anti-IFN $\gamma$  Antikörper inkubiert (30 Minuten, Raumtemperatur) und zwei Mal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Die PMA/Ionomycin Restimulation erfolgte bei einer PMA-Konzentration von  $100 \text{ ng}/\text{mL}$  und einer Ionomycin-Konzentration von  $500 \text{ ng}/\text{mL}$  für 4 Stunden in der Anwesenheit von Golgi-Stop. Die Färbung der Zellen erfolgte wie für die peptidspezifische Restimulation beschrieben, allerdings erfolgte die Inkubation mit dem anti-CD8 Antikörper zusammen mit der des anti-IFN $\gamma$  Antikörpers.

Bei der Multimerfärbung wurden die jeweiligen MHC-I Moleküle,  $H-2K^d$  beladen mit dem Peptid CSP<sub>245-253</sub> (SYPSAEKI) und  $H-2K^b$  beladen mit dem Peptid OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL), verwendet. Nach Inkubation der Zellen mit dem Multimer (10 Minuten, Raumtemperatur) wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit anti-CD8 und anti-

CD62L Antikörpern inkubiert (30 Minuten, 4°C) und nachfolgend durchflusszytometrisch analysiert.

Bei der Färbung von Fc $\mu$ R mit dem anti-Fc $\mu$ R Antikörper B68 wurden die Zellen zunächst in Fc-Block inkubiert (15 Minuten, 4°C) und nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit dem direkt fluorochrommarkierten anti-Fc $\mu$ R B68 Antikörper sowie mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD3, CD19, CD11b und CD11c gefärbt (30 Minuten, 4°C). Bei der Färbung von Fc $\mu$ R durch anti-Fc $\mu$ R A96 wurde ein nicht fluorochrommarkierter Antikörper verwendet und es erfolgte eine Detektion mit einem fluorochrommarkierten anti-RIgG Antikörper. Die Inkubationszeit mit dem anti-RIgG Antikörper betrug ebenfalls 30 Minuten bei 4°C.

Die Färbung von CD86 erfolgte entweder als Direktfärbung zusammen mit den Antikörpern für extrazelluläre Marker oder mit einem Biotin-markierten anti-CD86 Antikörper und nachfolgender Detektion mit Streptavidin-APC. Die Inkubation mit Streptavidin-APC erfolgte ebenfalls für 30 Minuten bei 4°C.

Die Färbung von Zellen aus dem Hirn mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD45 erfolgte ebenso für 30 Minuten bei 4°C.

#### **3.2.5 Aufreinigung muriner B-Zellen**

Murine B-Zellen wurden aus Milzzellen unter Verwendung des Aufreinigungskits „EasySep Negative Selection Mouse B cell Enrichment Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Reinheit wurde durch Färbung der Zellen mit einem anti-CD19 Antikörper durchflusszytometrisch überprüft und lag bei 94-96 %.

### **3.3 Tierversuche**

#### **3.3.1 Mäuse**

Die Mäuse wurden in einem Alter von 7 bis 12 Wochen verwendet, außer in den Experimenten zur Bestimmung des Einflusses der anti-Fc $\mu$ R Behandlung bei JHT Mäusen, in denen aus Verfügbarkeitsgründen Mäuse im Alter von bis zu 17 Wochen verwendet wurden. Die Tötung der Mäuse erfolgte durch das Einleiten von CO<sub>2</sub> in die Käfige.

#### 3.3.2 Immunisierung mit ACT-CSP bzw. ACT-OVA

Für die i.p. Immunisierung von BALB/c Mäusen gegen das Peptid CSP<sub>245-253</sub> (SYIPSAEKI) von *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) wurde ein ACT-CSP Konstrukt (68) (20 µg/ Maus; Ausnahme: im B-Zell-Transferversuch, s. Abb. 4.12 ca. 35 µg, aber nur bei der Rezipienten-Kontrollmaus) verwendet. Die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen wurde mit dem Konstrukt ACT-OVA durchgeführt (30 µg/ Maus), welches das Epitop OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL) enthält. In einigen Versuchen wurde den Mäusen 4 Stunden vor Immunisierung und 4 Tage nach Immunisierung je 200 µg anti-FcµR B68 Antikörper oder RIGG als Kontrolle i.p. appliziert. 5, 7 oder 14 Tage nach Vakzinierung wurden die Mäuse entweder zur Organentnahme verwendet oder es wurden i.v. 1000 PbA Sporoziten injiziert.

#### 3.3.3 Infektion mit *Plasmodium berghei* ANKA

Für die Infektion von Mäusen mit PbA Sporoziten wurden diese zunächst aus den Speicheldrüsen von *Anopheles*-Mücken, welche durch eine Blutmahlzeit von infizierten BALB/c Mäusen infiziert wurden, präpariert. Die Isolation der Sporoziten erfolgte 18 bis 25 Tage nach der Infektion der Mücken. Anschließend wurden den Mäusen je 1000 Sporoziten in sterilem PBS i.v. injiziert.

Bei der Infektion mit zuvor in flüssigem Stickstoff eingefrorenen PbA Blutphaseparasiten wurde ein Aliquot einer 1:1 Mischung des Blutes infizierter Mäuse mit einer Lösung aus 0,9 % NaCl, 4,6 % Sorbit und 35 % Glycerin aufgetaut, mit PBS verdünnt und je  $2 \times 10^6$  infizierte Erythrozyten i.p. in die zu infizierenden Mäuse injiziert.

Bei Infektion mit frisch isolierten PbA Blutphaseparasiten wurde das Blut infizierter Mäuse zur Verhinderung der Gerinnung in EDTA-Röhrchen aufgefangen und vor der Injektion in die zu infizierenden Mäuse mit PBS verdünnt. Bei dem Survival-Experiment (s. Abb. 4.19 B) wurden den Mäusen je  $2 \times 10^6$  infizierte Erythrozyten und bei dem Experiment zur Bestimmung der Inzidenz zerebraler Malaria (s. Abb. 4.19 A)  $5 \times 10^5$  infizierte Erythrozyten i.p. injiziert.

Die Parasitämie der Mäuse wurde über Blutausrichungen aus dem Schwanzblut bestimmt. Diese wurden mit Wright's stain-Lösung angefärbt. Hierzu wurden 10 Tropfen Wright's stain-Lösung auf den Objektträger aufgetropft und nach 2 Minuten wurden weitere 10 Tropfen destillierten Wassers hinzugegeben. Nach weiteren 3 Minuten wurde der Objektträger vorsichtig mit Leitungswasser abgespült und nachfolgend mikroskopisch analysiert. Die

Parasitämie ist der prozentuale Anteil infizierter Erythrozyten bezogen auf die Gesamterthrozytenanzahl.

Die Identifikation von Mäusen mit Symptomen zerebraler Malaria erfolgte bei Ausprägung mindestens eines der folgenden Symptome: wackeliger Gang, Lähmungserscheinungen, Krämpfe oder Koma. Bei dem Survival-Experiment wurden Mäuse mit sehr stark ausgeprägten Symptomen der zerebralen Malaria aus ethischen Gründen vorzeitig getötet.

#### **3.3.4 B-Zell-Transfer**

Für den Transfer von B-Zellen wurden aus mit ACT-CSP immunisierten und mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper oder RIgG behandelten BALB/c Mäusen 5 Tage nach Vakzinierung die B-Zellen aus den Milzzellen mit dem Kit „EasySep Negative Selection Mouse B cell Enrichment Kit“ aufgereinigt und anschließend für 60 Minuten mit 2  $\mu$ g/ mL des Peptids CSP<sub>245-253</sub> bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS  $1,5 \times 10^6$  B-Zellen den BALB/c Mäusen in PBS i.v. injiziert.

#### **3.4 Statistische Analysen**

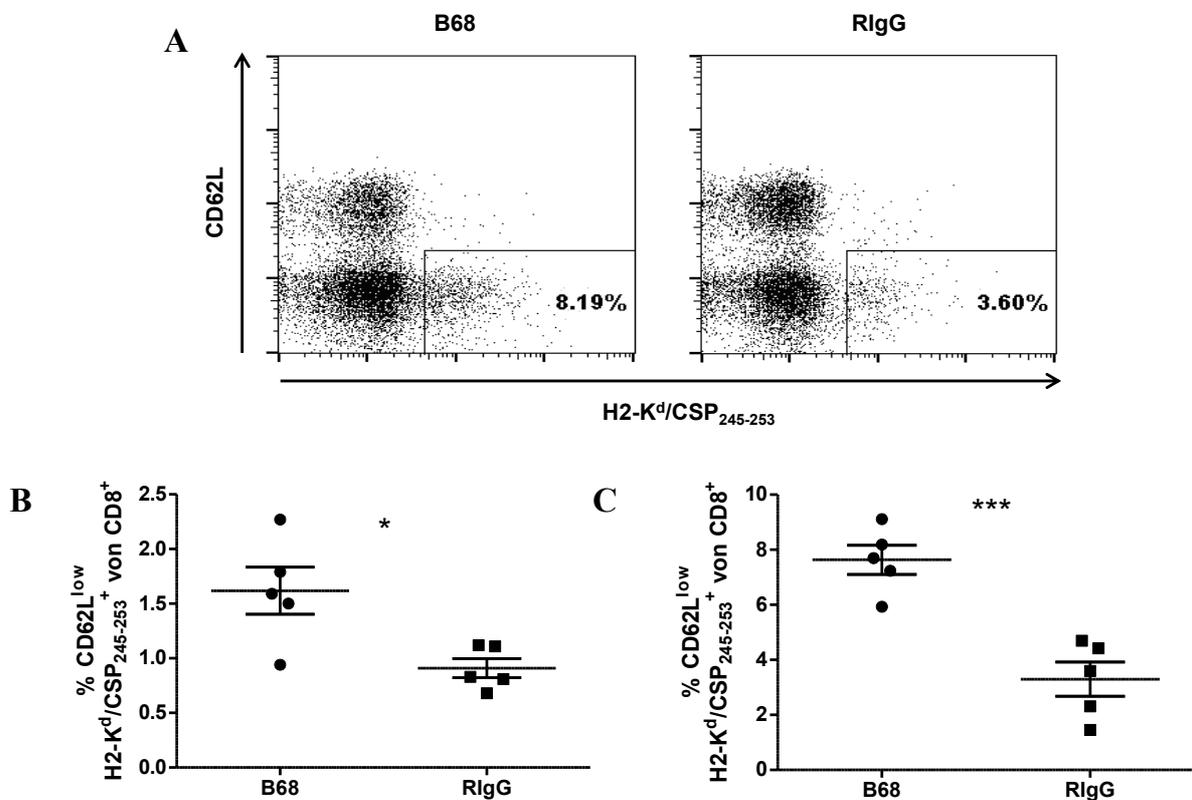
Für die statistische Auswertung der Experimente wurde die Software Graph Pad Prism 5 benutzt. Die Bezeichnung ns bedeutet nicht statistisch signifikant. Für die statistische Signifikanz wurde folgende Deklaration verwendet: p<0,05: \*; p<0,01: \*\*; p<0,001: \*\*\*.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die Verstärkung der Vakzinierungseffizienz durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper

#### 4.1.1 Die Verstärkung der vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper

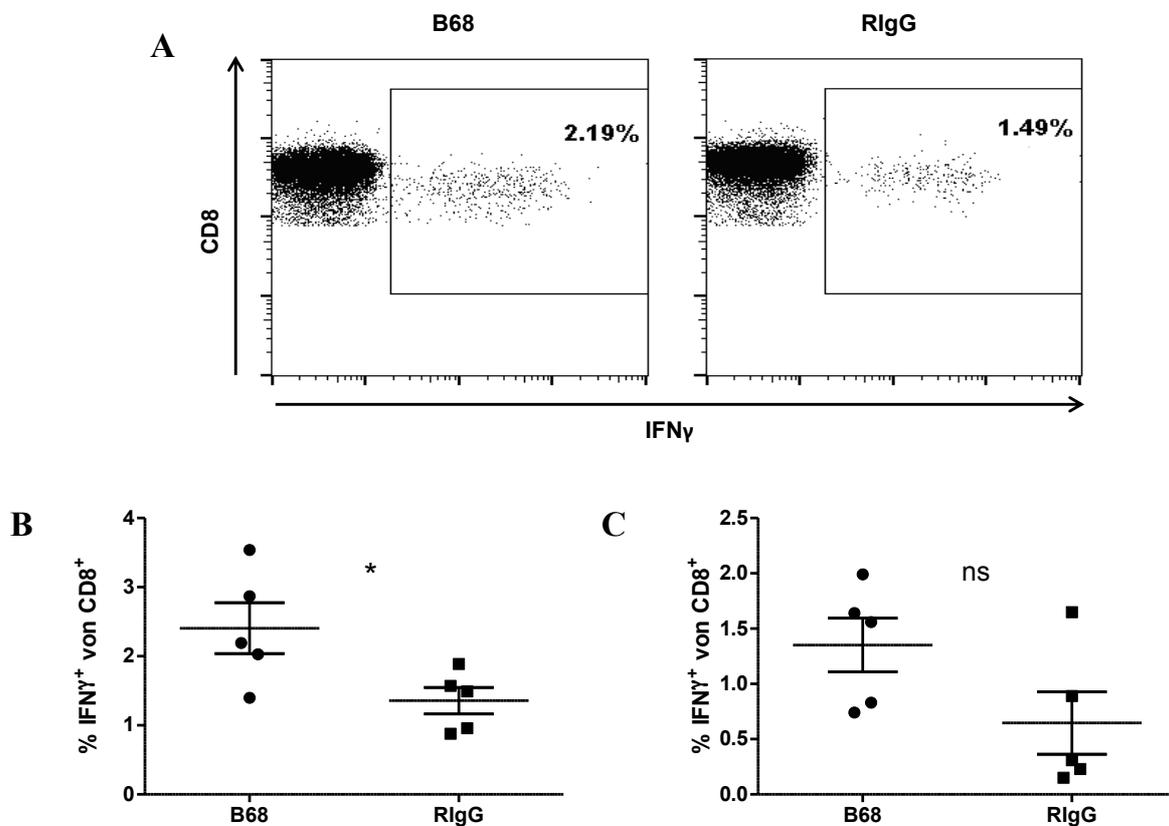
Zunächst sollte untersucht werden, ob die Applikation des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers B68 eine vakzineinduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort beeinflusst (Abb. 4.1 und 4.2).



**Abb. 4.1: Einfluss von anti-Fc $\mu$ R B68 auf die Frequenz ACT-CSP-induzierter CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen 7 Tage nach Vakzinierung**

BALB/c Mäuse wurden mit ACT-CSP immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung wurde den Mäusen i.p. 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG als Kontrolle injiziert. 7 Tage nach Vakzinierung wurde die Frequenz CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen mittels einer MHC-I Multimerfärbung bestimmt. Ein repräsentatives Beispiel der MHC-I Multimerfärbung ist für CD8<sup>+</sup> Zellen der Leber gezeigt (A). Die Daten der MHC-I Multimerfärbung sind für (B) Milz und (C) Leber dargestellt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment von zweien ist gezeigt.

Dazu wurden BALB/c Mäuse mit ACT-CSP vakziniert. Die Mäuse wurden 4 Stunden vor der Vakzinierung sowie am Tag 4 nach der Vakzinierung i.p. mit 200  $\mu\text{g}$  anti-Fc $\mu$ R B68 behandelt oder erhielten Ratten-IgG (RIgG) als Kontrollantikörper. Am Tag 7 nach Vakzinierung wurde die Frequenz CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen ermittelt (Abb. 4.1). CD62L ist ein auf naiven T-Zellen exprimiertes Molekül, dessen Expression nach Aktivierung von T-Zellen herunterreguliert wird. In der Milz und der Leber war etwa eine Verdopplung CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen bei den mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen in Vergleich zu mit RIgG behandelten Mäusen zu beobachten.



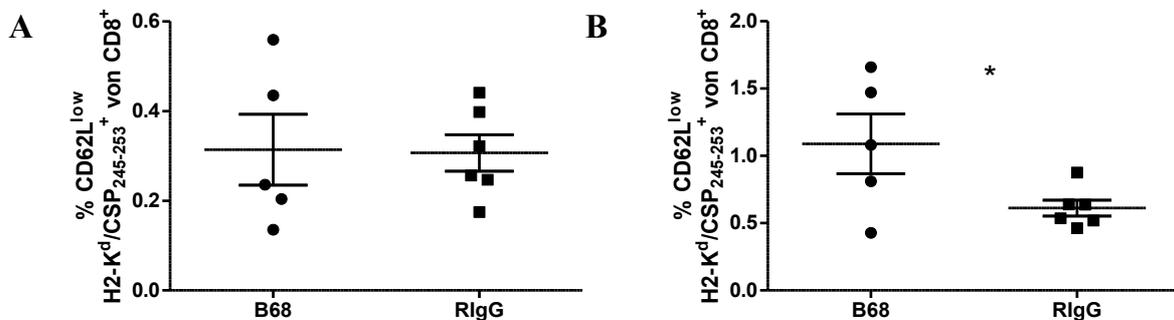
**Abb. 4.2: Einfluss von anti-Fc $\mu$ R B68 auf die Frequenz ACT-CSP-induzierter IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen 7 Tage nach Vakzinierung**

BALB/c Mäuse wurden mit ACT-CSP immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung wurde den Mäusen i.p. 200  $\mu\text{g}$  anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG als Kontrolle injiziert. 7 Tage nach Vakzinierung wurde die Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach antigenspezifischer Restimulation bestimmt. Ein repräsentatives Beispiel der IFN $\gamma$ -Färbung ist für CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Milz gezeigt (**A**). Die Daten der IFN $\gamma$ -Färbung sind für (**B**) Milz und (**C**) Leber dargestellt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment von zweien ist gezeigt.

Um zu untersuchen, ob auch die IFN $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit CSP-Peptid in vakzinieren und mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen im Vergleich zu mit RIgG behandelten Mäusen erhöht ist, wurden Zellen aus Milz und Leber antigenspezifisch restimuliert und die IFN $\gamma$ -Produktion wurde durch intrazelluläre Zytokinfärbung bestimmt (Abb. 4.2). In Milz und Leber war eine erhöhte Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen in mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen feststellbar. In der Leber war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Somit verursachte die anti-Fc $\mu$ R B68 Applikation eine deutliche Verbesserung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort nach ACT-CSP-Immunsierung, was sich sowohl durch eine erhöhte Frequenz CSP MHC-I Multimer-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen als auch durch eine erhöhte Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach peptidspezifischer Restimulation zeigte.

Es sollte nachfolgend untersucht werden, ob die Applikation von anti-Fc $\mu$ R B68 auch eine verlängerte Persistenz von vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen bewirkt. Dazu wurde am Tag 14 nach Vakzinierung die Frequenz CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen in Milz und Leber mittels einer MHC-I Multimerfärbung ermittelt (Abb. 4.3).



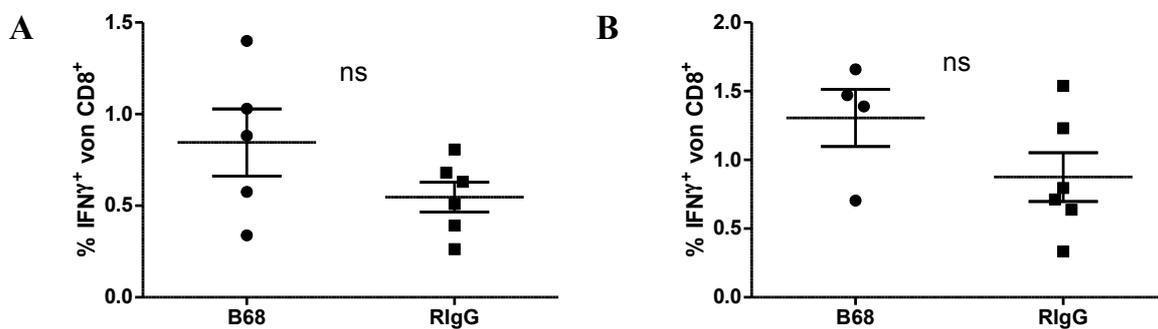
**Abb. 4.3: Einfluss von anti-Fc $\mu$ R B68 auf die Frequenz ACT-CSP-induzierter CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen 14 Tage nach Vakzinierung**

BALB/c Mäuse wurden mit ACT-CSP immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung wurde den Mäusen i.p. 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG als Kontrolle injiziert. 14 Tage nach Vakzinierung wurde die Frequenz CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen mittels einer MHC-I Multimerfärbung in (A) Milz und (B) Leber bestimmt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=5-6) dargestellt.

Es ist erkennbar, dass die Frequenz CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen am Tag 14 nach Vakzinierung im Vergleich zu Tag 7 nach Vakzinierung in Leber und Milz stark

zurückgegangen ist (Vergleich Abb. 4.1 B und C). Des Weiteren ist in der Milz 14 Tage nach Vakzinierung kein Unterschied in den Frequenzen CSP-spezifischer  $CD8^+CD62L^{low}$  T-Zellen zwischen anti-Fc $\mu$ R B68 und RIgG behandelten Mäusen erkennbar (Abb. 4.3 A), während in der Leber in anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen noch mehr CSP MHC-I Multimer-spezifische  $CD8^+CD62L^{low}$  T-Zellen persistierten (Abb. 4.3 B).

Es wurde ebenfalls die IFN $\gamma$ -Produktion von  $CD8^+$  T-Zellen nach antigenspezifischer Restimulation 14 Tage nach Vakzinierung bestimmt (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4: Einfluss von anti-Fc $\mu$ R B68 auf die Frequenz ACT-CSP-induzierter IFN $\gamma$ -produzierender  $CD8^+$  T-Zellen 14 Tage nach Vakzinierung**

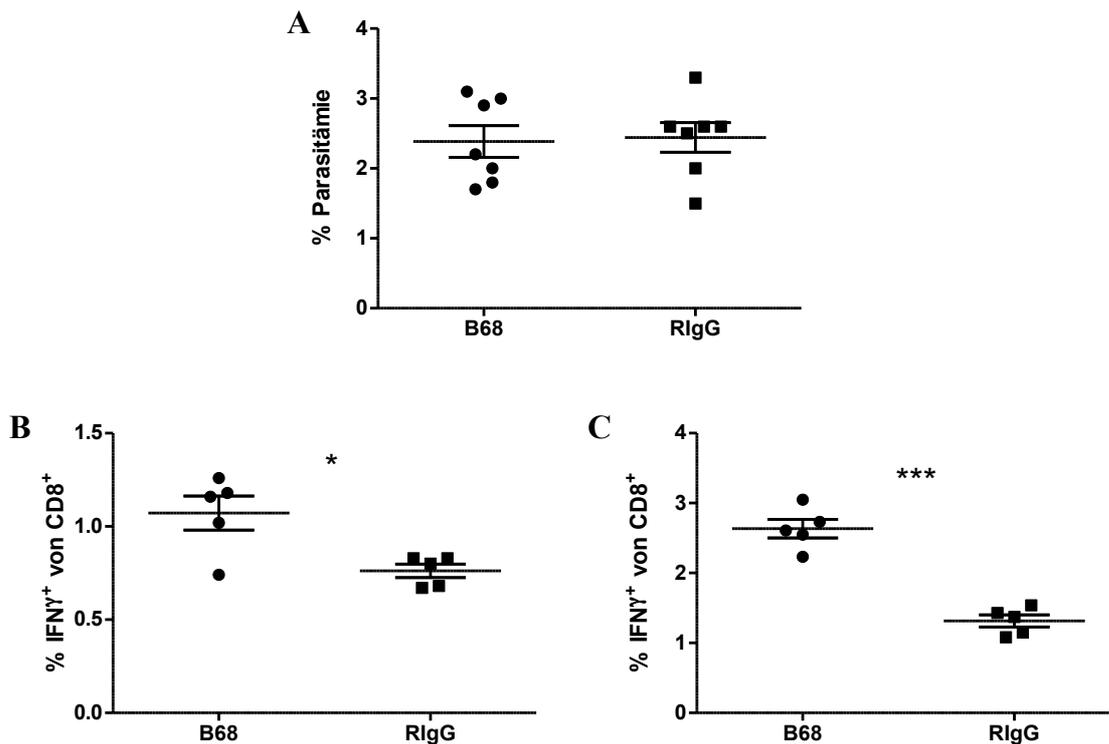
BALB/c Mäuse wurden mit ACT-CSP immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung wurde den Mäusen i.p. 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG als Kontrolle injiziert. 14 Tage nach Vakzinierung wurde die Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender  $CD8^+$  T-Zellen nach antigenspezifischer Restimulation in (A) Milz und (B) Leber bestimmt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=4-6) dargestellt.

Die IFN $\gamma$ -Produktion von  $CD8^+$  T-Zellen war sowohl in der Milz als auch Leber anti-Fc $\mu$ R B68 behandelter Mäuse erhöht, obwohl dieser Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Frequenz vakzineinduzierter  $CD8^+$  T-Zellen 14 Tage nach Vakzinierung im Vergleich zum Zeitpunkt 7 Tage nach Vakzinierung in beiden Gruppen stark abgenommen hatte. Zudem war der Unterschied zwischen anti-Fc $\mu$ R B68 und RIgG behandelten Mäusen verringert. Daher vermittelte die Applikation von anti-Fc $\mu$ R B68 bei Vakzinierung zwar eine erhöhte Induktion antigenspezifischer  $CD8^+$  T-Zellen 7 Tage nach der Vakzinierung, konnte jedoch nur zu einer leicht erhöhten Persistenz dieser Zellen führen.

### 4.1.2 Anti-Fc $\mu$ R Antikörper-vermittelte erhöhte Funktionalität von vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Anzahl CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach ACT-CSP-Immunisierung bei Applikation von anti-Fc $\mu$ R B68 im Vergleich zur Applikation von RIgG einen Schutz bei einer Infektion vermitteln kann, wurden BALB/c Mäuse 7 Tage nach Vakzinierung mit *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) Sporozoiten infiziert (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Parasitämie und IFN $\gamma$ -Produktion CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Infektion von mit ACT-CSP vakzinierten Mäusen mit PbA Sporozoiten**

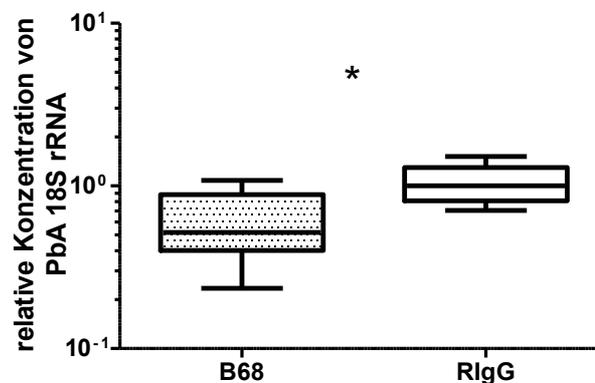
BALB/c Mäuse wurden mit ACT-CSP immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung wurde den Mäusen i.p. 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG als Kontrolle injiziert. 7 Tage nach Vakzinierung wurden die Mäuse mit 1000 PbA Sporozoiten i.v. infiziert. 7 Tage nach der Infektion wurde die Parasitämie (A) analysiert. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=7) dargestellt. Die Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach peptidspezifischer Restimulation wurde 7 Tage nach Infektion in (B) Milz und (C) Leber bestimmt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=5) dargestellt.

In keiner der Mäuse wurde eine sterile Immunität vermittelt und auch die Parasitämie 7 Tage nach Infektion war nicht unterschiedlich zwischen mit anti-Fc $\mu$ R B68 und RIgG behandelten Mäusen (Abb. 4.5 A).

Es wurde zudem analysiert, ob die Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach antigenspezifischer Restimulation bei mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen im Vergleich zu mit RIgG behandelten Mäusen erhöht ist. Dies war sowohl in der Milz als auch in der Leber zu beobachten (Abb. 4.5 B und C).

Dementsprechend konnte, obwohl die CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen eine erhöhte Immunantwort bei Infektion mit dem Parasiten zeigten, kein steriler Schutz vermittelt werden.

Um zu analysieren, ob mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelte, ACT-CSP-immunisierte Mäuse den Parasiten in der Frühphase der Infektion besser bekämpfen können, wurde die Parasitenlast in der Leber 30 Stunden nach Infektion mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt. Hierbei wurde die PbA 18S rRNA in Relation zu der Maus GAPDH-mRNA quantifiziert (Abb. 4.6). Die Parasitenlast in mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen im Vergleich zu mit RIgG behandelten Mäusen war vermindert. Somit induzierte die Applikation von anti-Fc $\mu$ R B68 einen erhöhten Schutz in der Frühphase der Infektion, welcher jedoch nicht ausreichend war, um das Auftreten einer Blutphaseninfektion zu verhindern.



**Abb. 4.6: Parasitenlast in der Leber 30 Stunden nach der Infektion ACT-CSP-vakzinierter Mäuse mit PbA Sporozoiten**

BALB/c Mäuse wurden mit ACT-CSP immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung wurde den Mäusen i.p. 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG als Kontrolle injiziert. 7 Tage nach Vakzinierung wurden die Mäuse mit 1000 PbA Sporozoiten i.v. infiziert. 30 Stunden nach der Infektion wurde die Parasitenlast in der Leber mittels Real-Time PCR durch Quantifizierung von PbA 18S rRNA und Maus GAPDH-mRNA analysiert. Die zusammengefassten Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit je n=3 sind gezeigt. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney Test analysiert und sind als Mittelwert  $\pm$  dem interquartilen Bereich dargestellt.

## **4.2 Die Vermittlung der Verstärkung der vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort bei anti-FcμR Antikörper-Applikation durch B-Zellen**

### **4.2.1 Starke Expression des FcμR in der murinen Milz nur auf B-Zellen**

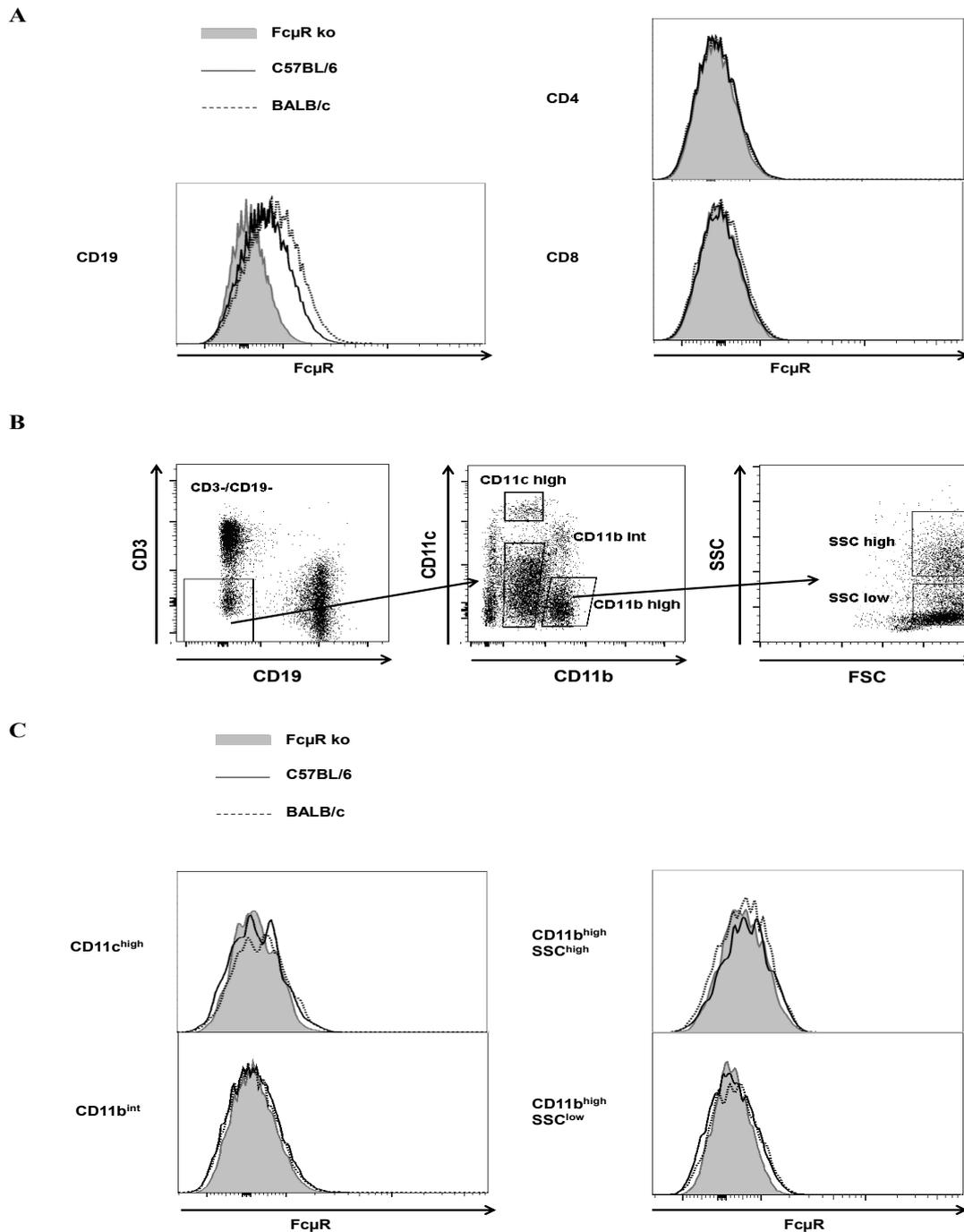
Um zu untersuchen, ob die erhöhte Frequenz vakzineinduzierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der anti-FcμR-Applikation durch eine direkte Wirkung des Antikörpers auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder eine indirekte Wirkung über andere Zellen vermittelt sein könnte, wurde die Expression des FcμR auf verschiedenen Zellpopulationen in der Milz von BALB/c und C57BL/6 Mäusen analysiert (Abb. 4.7). FcμR ko Mäuse wurden hierbei als Negativkontrolle verwendet.

Nur CD19<sup>+</sup> B-Zellen exprimierten den FcμR in größeren Mengen. Die FcμR Expression auf BALB/c B-Zellen war höher im Vergleich zu C57BL/6 B-Zellen. Im Vergleich zu CD19<sup>+</sup> Zellen war die FcμR Expression auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD11c<sup>high</sup>, CD11b<sup>int</sup>, CD11b<sup>high</sup>SSC<sup>high</sup> und CD11b<sup>high</sup>SSC<sup>low</sup> Zellen marginal oder nicht vorhanden und zeichnete sich nicht durch eine deutliche Fluoreszenzintensitätsverschiebung von wt Zellen im Vergleich zu FcμR ko Zellen aus.

### **4.2.2 Förderung der Zytokinproduktion vakzineinduzierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch B-Zellen**

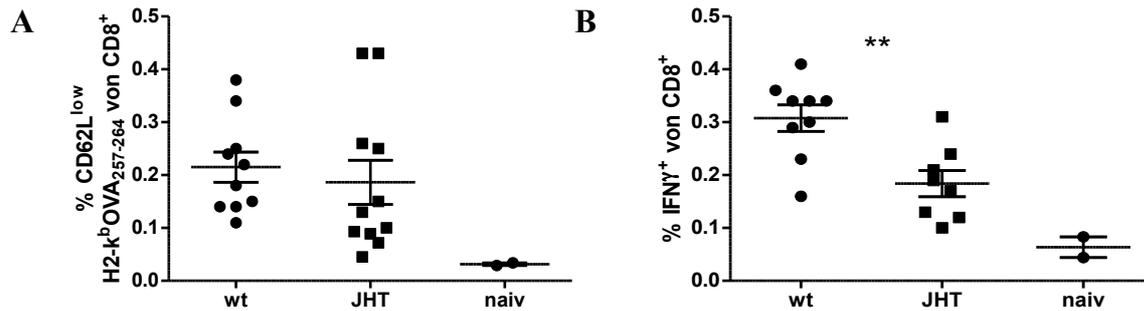
Da B-Zellen die den FcμR am höchsten exprimierende Zellpopulation darstellen, ist eine Wirkung dieser Zellen als Mediatoren von durch die anti-FcμR Behandlung verursachten Effekten naheliegend. Daher wurde ihre Rolle bei der ACT-Vakzinierung analysiert. Hierzu wurden B-Zell-defiziente C57BL/6 JHT Mäuse verwendet. Da ein CSP-Epitop für das MHC-I Kb Allel der C57BL/6 Mäuse nicht bekannt ist, wurde die Vakzine ACT-OVA als Modellvakzine für die Induktion OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet.

Um festzustellen, ob die Anwesenheit von B-Zellen einen Einfluss auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort hat, wurde die Induktion OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in JHT und C57BL/6 wt Mäusen verglichen. Dazu wurde eine MHC-I Multimerfärbung (Abb. 4.8 A) sowie eine peptidspezifische Restimulation von Milzzellen 7 Tage nach Vakzinierung (Abb. 4.8 B) durchgeführt.



**Abb. 4.7: Expression des Fc $\mu$ R auf Immunzellpopulationen in der Milz**

Milzzellen aus Fc $\mu$ R ko, C57BL/6 und BALB/c Mäusen wurden mit fluorochrommarkierten Antikörpern gegen den Fc $\mu$ R (anti-Fc $\mu$ R B68) sowie die Oberflächenmarker CD4, CD8, CD3, CD19, CD11b und CD11c gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Die Expression von Fc $\mu$ R auf CD19, CD4 und CD8 exprimierenden Zellen ist als repräsentativer Histogrammplot dargestellt. **(B)** Die Identifikation von Subpopulationen CD11c und/oder CD11b exprimierender Zellen ist dargestellt. CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> Zellen wurden identifiziert und die Subpopulationen CD11c<sup>high</sup>, CD11b<sup>int</sup> (mit CD11c<sup>low/int</sup>), CD11b<sup>high</sup>SSC<sup>high</sup> und CD11b<sup>high</sup>SSC<sup>low</sup> definiert. **(C)** Die Expression von Fc $\mu$ R auf CD11c<sup>high</sup>, CD11b<sup>int</sup>, CD11b<sup>high</sup>SSC<sup>high</sup> und CD11b<sup>high</sup>SSC<sup>low</sup> Zellen ist als repräsentativer Histogrammplot dargestellt. In den Histogrammen sind jeweils Daten dargestellt, die repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit Fc $\mu$ R ko n=2 (grau unterlegte Graphen), C57BL/6 n=4 (schwarze Linie) und BALB/c n=4 (gestrichete Linie) sind.



**Abb. 4.8: Vergleich der ACT-OVA induzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort in C57BL/6 wt und JHT Mäusen**  
C57BL/6 wt und JHT Mäuse wurden mit ACT-OVA immunisiert. 7 Tage nach Vakzinierung wurden die OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz über eine MHC-I Multimerfärbung (A) und nach peptidspezifischer Restimulation über die Produktion von IFN $\gamma$  (B) identifiziert. Es sind zusammengefasste Daten zweier Experimente mit je n=3-6 bzw. naïv je n=1 gezeigt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

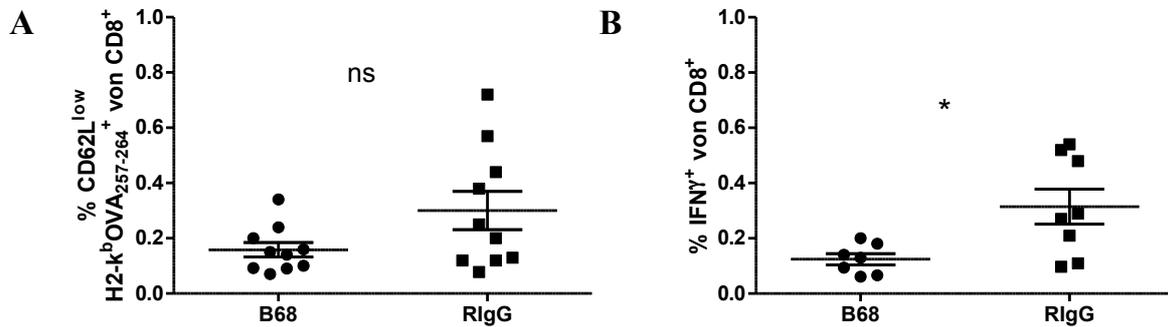
Die Frequenz OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen war in den vakzinieren C57BL/6 Mäusen deutlich geringer als die Frequenz CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen in mit ACT-CSP vakzinieren BALB/c Mäusen (Vergleich Abb. 4.1 B), jedoch war eine Induktion OVA-spezifischer Zellen im Vergleich zu naiven Kontrolltieren deutlich erkennbar (Abb. 4.8 A). Die Frequenz OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen in JHT Mäusen unterschied sich nicht deutlich von der in C57BL/6 wt Mäusen. Allerdings war in den JHT Mäusen nach peptidspezifischer Restimulation die IFN $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermindert, was auf einen Beitrag von B-Zellen zur Zytokinsekretion vakzineinduzierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen hindeutet.

#### 4.2.3 Keine Verstärkung der vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort durch anti-Fc $\mu$ R Antikörper-Applikation in B-Zell-defizienten JHT Mäusen

Um festzustellen, ob B-Zellen bei der Vakzinierung für die erhöhte Induktion von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der anti-Fc $\mu$ R-Applikation verantwortlich sind, wurde der Effekt der anti-Fc $\mu$ R Antikörperbehandlung bei Vakzinierung von JHT Mäusen untersucht (Abb. 4.9).

Die Applikation von anti-Fc $\mu$ R B68 führte in JHT Mäusen weder zu einer erhöhten Frequenz antigenspezifischer MHC-I Multimer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen noch zu einer erhöhten Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach peptidspezifischer Restimulation. Im

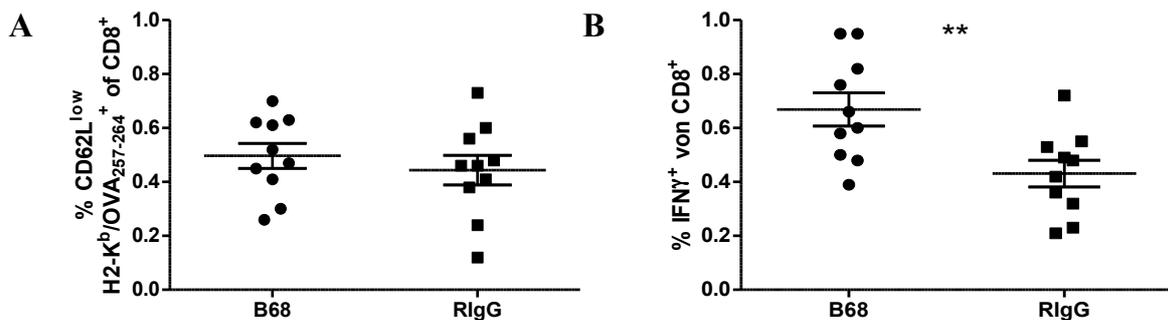
Gegenteil, die Applikation von anti-Fc $\mu$ R B68 schien die Entwicklung einer vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort sogar zu behindern.



**Abb. 4.9: Effekt von anti-Fc $\mu$ R B68 in mit ACT-OVA immunisierten B-Zell-defizienten JHT Mäusen**

JHT Mäuse wurden mit ACT-OVA immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung erfolgte die i.p. Applikation von je 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG. 7 Tage nach Vakzinierung wurden die OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz über eine MHC-I Multimerfärbung (A) und nach peptidspezifischer Restimulation über die Produktion von IFN $\gamma$  (B) identifiziert. Es sind jeweils zusammengefasste Daten zweier Experimente mit n=3-5 gezeigt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

Um zu zeigen, dass die Applikation des anti-Fc $\mu$ R B68 Antikörpers in C57BL/6 Mäusen zu einer Verbesserung der vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort führt, wurden C57BL/6 wt Mäuse mit ACT-OVA immunisiert, mit anti-Fc $\mu$ R B68 bzw. RIgG behandelt und die vakzineinduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort 7 Tage nach Vakzinierung analysiert (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10: Effekt von anti-Fc $\mu$ R B68 in mit ACT-OVA immunisierten C57BL/6 wt Mäusen**

C57BL/6 wt Mäuse wurden mit ACT-OVA immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung erfolgte die i.p. Applikation von je 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG. 7 Tage nach Vakzinierung wurden die OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz über eine MHC-I Multimerfärbung (A) und nach peptidspezifischer Restimulation über die Produktion von IFN $\gamma$  (B) identifiziert. Es sind jeweils zusammengefasste Daten zweier Experimente mit n=5 gezeigt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.

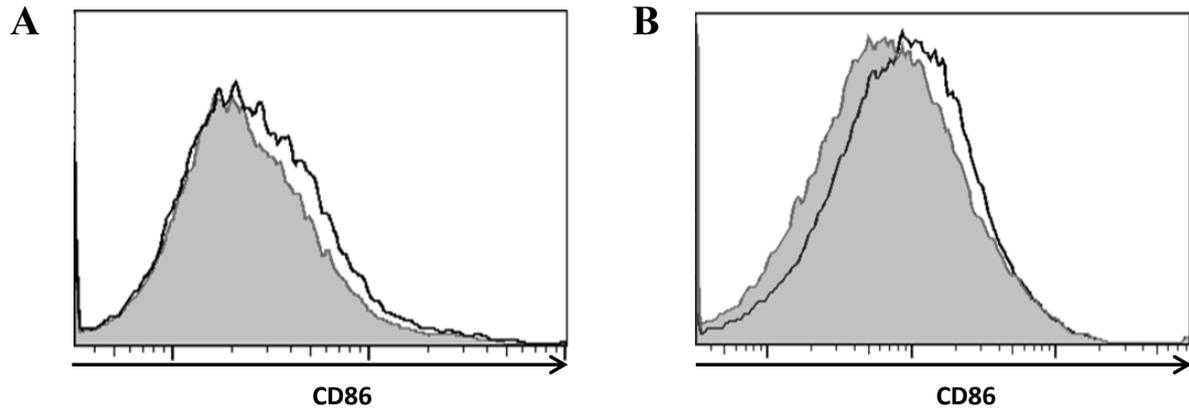
Es konnten keine Unterschiede in der Frequenz MHC-I Multimer-spezifischer CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen zwischen mit anti-Fc $\mu$ R B68 und mit RIgG behandelten C57BL/6 wt Mäusen festgestellt werden (Abb. 4.10 A). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von dem bei BALB/c Mäusen beobachteten Effekt einer erhöhten Frequenz MHC-I Multimer-spezifischer Zellen bei anti-Fc $\mu$ R B68-Applikation (Abb. 4.1 B). Dennoch konnte bei vakzinieren C57BL/6 Mäusen ebenso wie zuvor bei BALB/c Mäusen bei anti-Fc $\mu$ R B68 Behandlung im Vergleich zur Behandlung mit RIgG eine erhöhte Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation festgestellt werden (Vergleich Abb. 4.10 B und Abb. 4.2 C).

Somit konnte gezeigt werden, dass die stimulatorischen Effekte der anti-Fc $\mu$ R B68 Applikation bei der Vakzinierung von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu BALB/c Mäusen zwar verringert, aber dennoch nachweisbar waren. Im Gegensatz zu C57BL/6 wt Mäusen waren in den B-Zell-defizienten JHT Mäusen jedoch keinerlei stimulatorische Effekte der Behandlung mit anti-Fc $\mu$ R B68 zu beobachten.

### **4.2.4 Erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf B-Zellen vakzinierter Mäuse bei anti-Fc $\mu$ R Antikörper-Applikation**

B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen exprimieren das kostimulatorische Molekül CD86, welches zugleich einen Aktivierungsmarker darstellt. Um den Aktivierungszustand von B-Zellen bei Applikation von anti-Fc $\mu$ R B68 zu untersuchen, wurde die CD86 Expression auf B-Zellen 7 Tage nach Vakzinierung von BALB/c bzw. C57BL/6 Mäusen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 4.11).

Die CD86 Expression von B-Zellen der mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäuse war im Vergleich zu der CD86 Expression von B-Zellen der mit RIgG behandelten Mäusen erhöht. Dieser Effekt trat sowohl in C57BL/6 Mäusen als auch in BALB/c Mäusen auf.



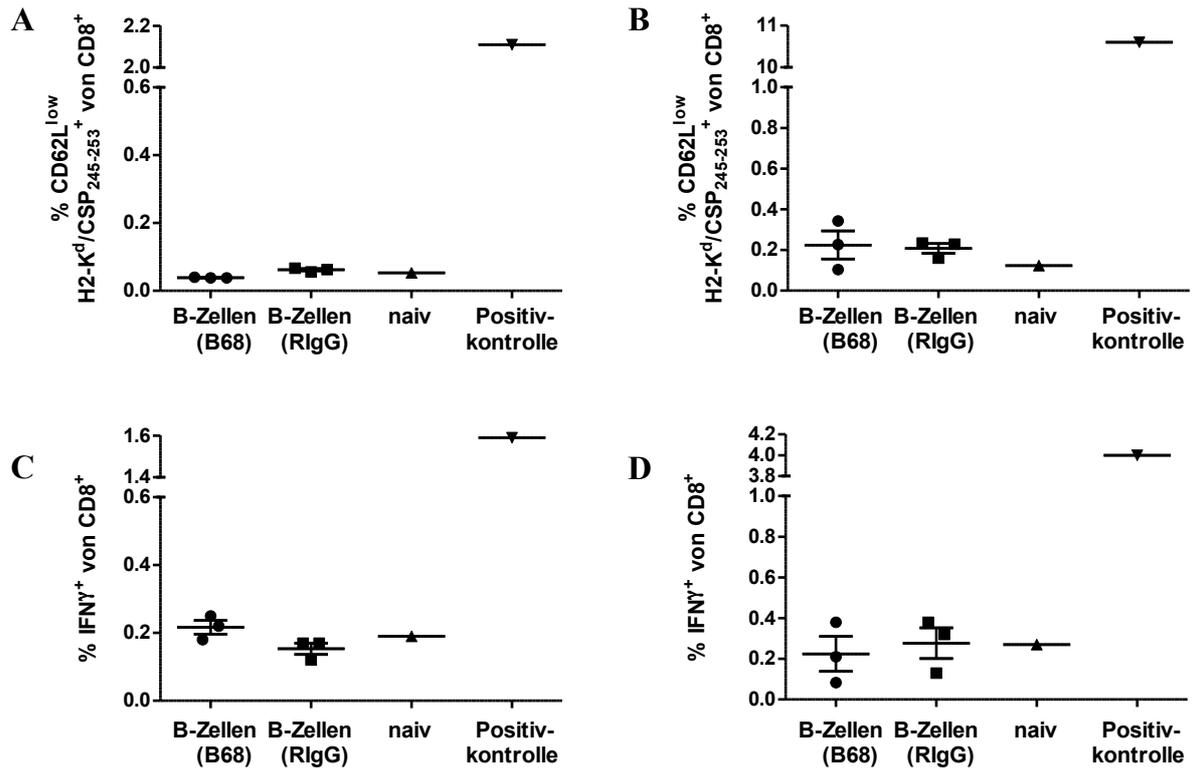
**Abb. 4.11: Einfluss von anti-Fc $\mu$ R B68 auf die Expression von CD86 auf B-Zellen**

BALB/c Mäuse (A) oder C57BL/6 Mäuse (B) wurden mit ACT-CSP bzw. ACT-OVA immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung erfolgte die i.p. Applikation von je 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RlgG. 7 Tage nach Vakzinierung wurden die Milzzellen mit CD19 und CD86 Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Ein repräsentatives Histogramm der CD86-Expression von CD19<sup>+</sup> Zellen bei RlgG-Applikation (grau unterlegt) und anti-Fc $\mu$ R B68-Applikation (schwarze durchgezogene Linie) ist gezeigt. (A): n=3-4; (B): Die Daten sind repräsentativ für 2 Experimente mit je n=5.

#### 4.2.5 Untergeordnete Rolle von B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen bei der ACT-CSP Vakzinierung

Um herauszufinden, ob B-Zellen bei der ACT-Vakzinierung eine Rolle als APZ spielen und ob eine mögliche Funktion von B-Zellen als APZ durch die anti-Fc $\mu$ R B68 Behandlung beeinflusst werden kann, wurde ein B-Zell-Transferexperiment durchgeführt (Abb. 4.12).

Hierzu wurden B-Zellen aus vakzinierten und mit anti-Fc $\mu$ R B68 oder RlgG behandelten Donormäusen am Tag 5 nach Immunisierung der Donormäuse mit ACT-CSP in Rezipientenmäuse transferiert. Vor dem Zelltransfer wurden sie zunächst zusätzlich mit CSP-Peptid inkubiert. 7 Tage nach Zelltransfer wurde die Induktion einer CSP-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort in einer MHC-I Multimerfärbung (Abb. 4.12 A und B) sowie durch die Messung der IFN $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach antigenspezifischer Stimulation in Milz und Leber bestimmt (Abb. 4.12 C und D).



**Abb. 4.12: Die Rolle von B-Zellen als APZ bei der ACT-CSP Immunisierung**

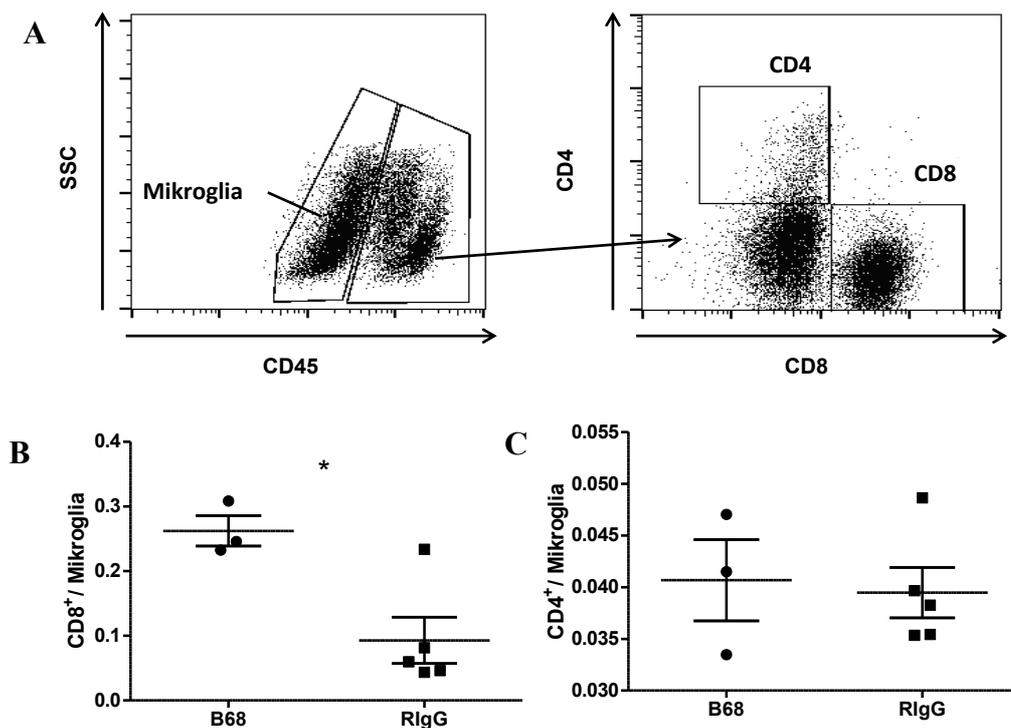
BALB/c Donormäuse wurden mit ACT-CSP immunisiert. 4 Stunden vor Immunisierung sowie 4 Tage nach Immunisierung erfolgte die i.p. Applikation von je 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG. 5 Tage nach Vakzinierung wurden die B-Zellen aus den Milzen der Mäuse aufgereinigt und die Milzzellen der jeweiligen Gruppen vereinigt (anti-Fc $\mu$ R B68 n=2, RIgG n=3). Die B-Zellen wurden zusätzlich mit CSP-Peptid inkubiert. Es wurden je  $1,5 \times 10^6$  B-Zellen i.v. in BALB/c Rezipientenmäuse transferiert. Eine naive Kontrollmaus erhielt PBS i.p. und eine weitere Maus wurde i.p. mit ACT-CSP immunisiert und als Positivkontrolle verwendet. 7 Tage später wurde die Frequenz CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch eine MHC-I Multimerfärbung in Milz (**A**) und Leber (**B**) sowie durch die Bestimmung der IFN $\gamma$ -Produktion nach antigenspezifischer Restimulation in Milz (**C**) und Leber (**D**) bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=3, naive Kontrolle und Positivkontrolle n=1).

Der Transfer von B-Zellen immunisierter Mäuse induzierte weder in der Milz noch in der Leber von Rezipientenmäusen die Expansion CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, da die Frequenzen der MHC-I Multimer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> T-Zellen und der IFN $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach antigenspezifischer Restimulation im Vergleich zur Frequenz einer naiven Maus gar nicht oder nur marginal erhöht waren.

### 4.3 Der Einfluss des Fc $\mu$ R auf die Entwicklung der experimentellen zerebralen Malaria

#### 4.3.1 Verstärkte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort und erhöhte Inzidenz experimenteller zerebraler Malaria bei Applikation von anti-Fc $\mu$ R B68

Im Modell der experimentellen zerebralen Malaria (EZM) sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Vermittlung einer zerebralen Pathologie bei suszeptiblen C57BL/6 Mäusen maßgeblich beteiligt. Es wurde analysiert, ob die Behandlung mit anti-Fc $\mu$ R B68, wie für die ACT-Vakzinierung gezeigt, auch in diesem Modell zu einer Verstärkung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort führt. Die Infektion der C57BL/6 Mäuse erfolgte i.p. mit PbA Blutphaseparasiten. Bei dieser Infektion findet im Gegensatz zu einer Infektion mit Sporoziten keine Leberphase statt. Zusätzlich zur Infektion mit PbA wurde den Mäusen 4 Stunden vor Infektion sowie 4 Tage nach Infektion anti-Fc $\mu$ R B68 bzw. RIgG injiziert.



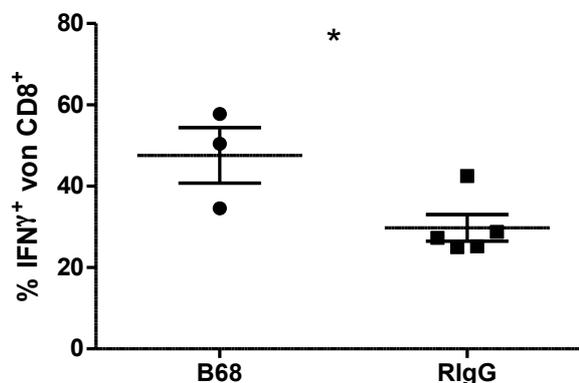
**Abb. 4.13: Effekt von anti-Fc $\mu$ R B68 auf die Akkumulation von T-Zellen im Gehirn von C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit PbA Blutphaseparasiten**

C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit PbA infiziert. 4 Stunden vor Infektion sowie 4 Tage nach Infektion erfolgte die Applikation von je 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG. Am Tag des Auftretens von zerebralen Symptomen wurden Leukozyten aus den Gehirnen isoliert und mit CD4, CD8 und CD45 Antikörpern gefärbt, um das Verhältnis von T-Zellen zu Mikrogliazellen zu ermitteln. Die Identifikation von Mikrogliazellen erfolgte im SSC/CD45 Dot-Plot. Nicht als Mikrogliazellen definierte CD4 oder CD8 exprimierende Zellen wurden identifiziert. Eine exemplarische Abbildung ist dargestellt (A). Das Verhältnis zwischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Mikrogliazellen (B) sowie zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Mikrogliazellen (C) wurde ermitteln. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3-5).

Da die EZM mit der Akkumulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn assoziiert ist, wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Verhältnis zu den im Hirn befindlichen Mikrogliazellen quantifiziert (Abb. 4.13 B). CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit derselben Methode quantifiziert (Abb. 4.13 C).

Die Frequenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Relation zu Mikrogliazellen unterschied sich in PbA infizierten anti-FcμR B68 behandelten Mäusen nicht von der Frequenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen der mit RIgG behandelten Mäuse. Die Frequenz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Relation zu Mikrogliazellen war jedoch in anti-FcμR B68 behandelten Mäusen erhöht.

Die Produktion von IFN $\gamma$  durch aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Gehirnen PbA infizierter Mäuse nach Restimulation mit PMA/Ionomycin wurde ermittelt (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14: Effekt von anti-FcμR B68 auf die IFN $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn von C57BL/6 Mäusen bei einer Infektion mit PbA Blutphaseparasiten**

C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit PbA infiziert. 4 Stunden vor Infektion sowie 4 Tage nach Infektion erfolgte die i.p. Applikation von je 200  $\mu$ g anti-FcμR B68 oder RIgG. Am Tag des Auftretens von zerebralen Symptomen wurden die Leukozyten aus den Gehirnen isoliert und mit PMA/Ionomycin restimuliert. Anschließend wurde die IFN $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3-5).

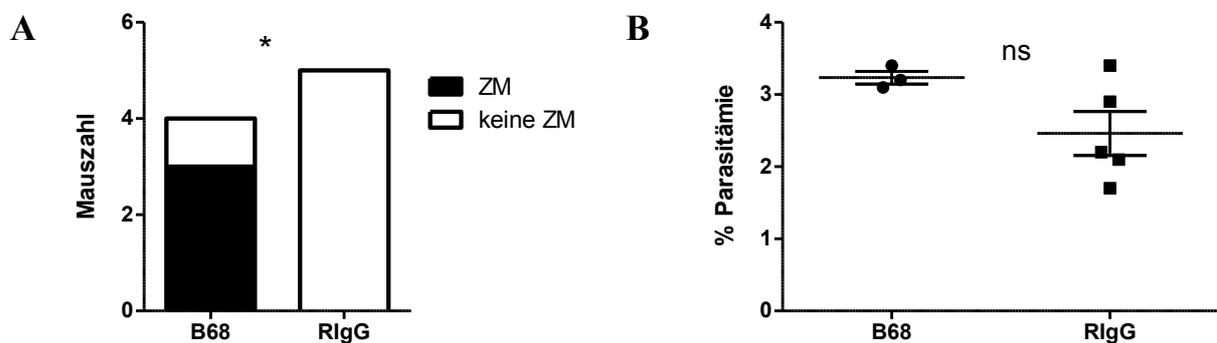
Ein größerer Anteil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Gehirnen infizierter und mit anti-FcμR B68 behandelter Mäuse produzierte im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Gehirnen von mit RIgG behandelten Mäusen IFN $\gamma$ .

Somit war in mit PbA infizierten Mäusen bei anti-FcμR Behandlung nicht nur die Anzahl der im Gehirn befindlichen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhöht, zudem produzierte auch ein höherer Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation IFN $\gamma$ .

Um zu analysieren, ob auch das Auftreten von EZM in mit PbA infizierten anti-FcμR B68 behandelten Mäusen im Vergleich zu mit RIgG behandelten Mäusen erhöht ist, wurde die Inzidenz der EZM am Tag des ersten Auftretens von EZM Symptomen bestimmt (Abb.

4.15 A). Im Einklang mit der erhöhten Akkumulation aktivierter  $CD8^+$  T-Zellen in den Gehirnen von mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen zeigten diese Mäuse auch eine erhöhte Inzidenz zerebraler Symptome.

Um auszuschließen, dass beobachtete Effekte durch eine unterschiedliche Konzentration antigenen Materials verursacht werden, wurde die Parasitämie der Mäuse bestimmt (Abb. 4.15 B). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parasitämien von mit PbA infizierten und mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen im Vergleich zu infizierten mit RIgG behandelten Mäusen.

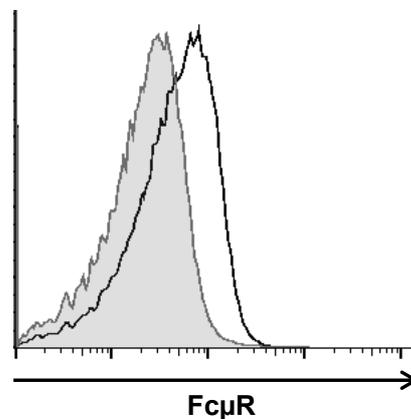


**Abb. 4.15: Einfluss von anti-Fc $\mu$ R B68 auf die Inzidenz der EZM von C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit PbA Blutphaseparasiten**

C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit PbA infiziert. 4 Stunden vor Infektion sowie 4 Tage nach Infektion erfolgte die Applikation von je 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R B68 oder RIgG. Am Tag des Auftretens von zerebralen Symptomen wurde die Inzidenz zerebraler Symptome bestimmt (**A**). Die Daten wurden mit dem Fisher's exact Test ausgewertet (n=4-5). Außerdem wurde die Parasitämie im Blut der Mäuse ermittelt (**B**). Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=3-5).

### 4.3.2 Verstärkte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort und erhöhte Inzidenz experimenteller zerebraler Malaria bei Applikation von anti-Fc $\mu$ R A96

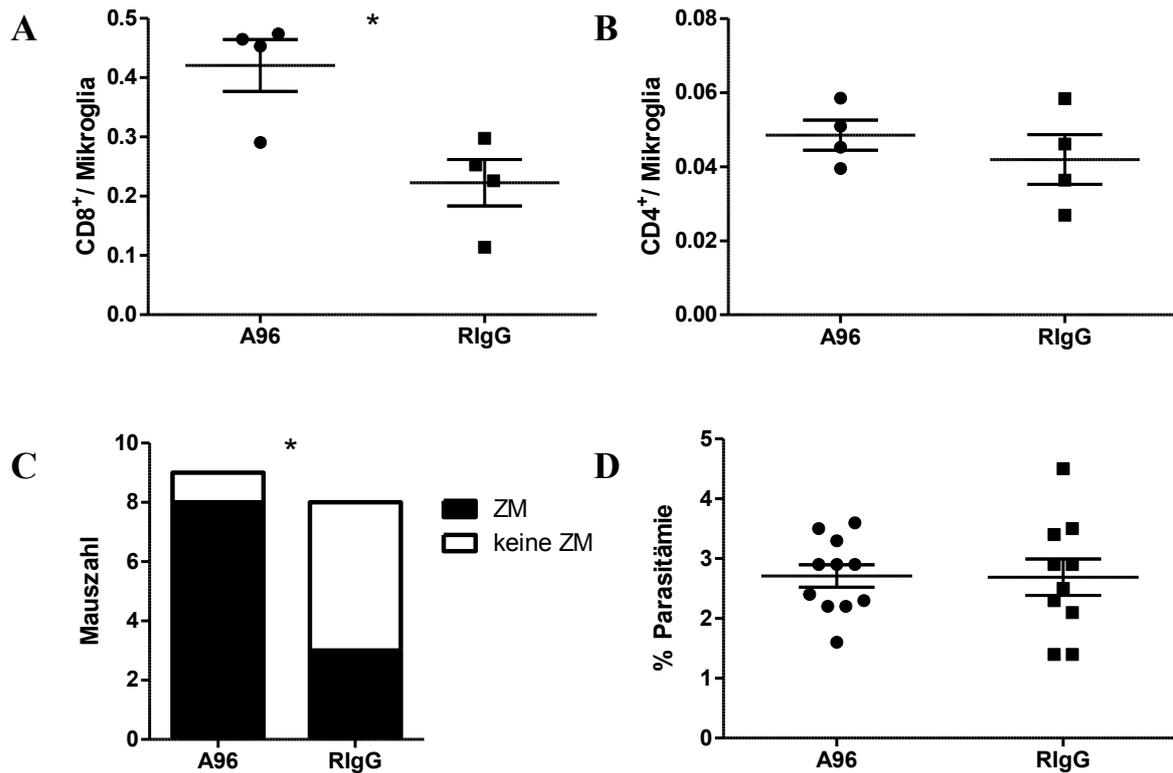
Der monoklonale Antikörper A96 ist wie der monoklonale Antikörper B68 ein an den Fc $\mu$ R bindender Antikörper. Um die Bindung von anti-Fc $\mu$ R A96 an den Fc $\mu$ R exprimierende Milzzellen nachzuweisen, wurden Milzzellen von Fc $\mu$ R ko sowie C57BL/6 wt Mäusen zunächst mit anti-Fc $\mu$ R A96 und anschließend mit einem flurochrommarkierten anti-RIgG Antikörper inkubiert (Abb. 4.16). Die Bindung des anti-Fc $\mu$ R A96 an den Fc $\mu$ R zeigte sich durch die deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität bei wt Zellen im Vergleich zu Fc $\mu$ R ko Zellen.



**Abb. 4.16: Bindung des Antikörperklons A96 an Fc $\mu$ R exprimierende Milzzellen**

Fc $\mu$ R ko Milzzellen (grau unterlegt) und C57BL/6 wt Milzzellen (schwarze durchgezogene Linie) wurden zunächst mit anti-Fc $\mu$ R A96 und anschließend mit einem fluorochrommarkiertem anti-RIgG Antikörper inkubiert. Es folgte eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen.

Um zu testen, ob anti-Fc $\mu$ R A96 ähnliche Effekte hervorruft wie anti-Fc $\mu$ R B68 wurde der anti-Fc $\mu$ R Antikörper A96 im Modell der EZM eingesetzt. Dazu wurde am ersten Tag des Auftretens zerebraler Symptome wie zuvor bei der Verwendung von anti-Fc $\mu$ R B68 die Quantifizierung von T-Zellen im Gehirn und die Bestimmung der Inzidenz der EZM sowie der Parasitämie der Mäuse durchgeführt (Abb. 4.17).



**Abb. 4.17: Einfluss von anti-Fc $\mu$ R A96 auf die Akkumulation von T-Zellen im Gehirn sowie auf die Parasitämie und zerebrale Symptomatik von C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit PbA Blutphasenparasiten**

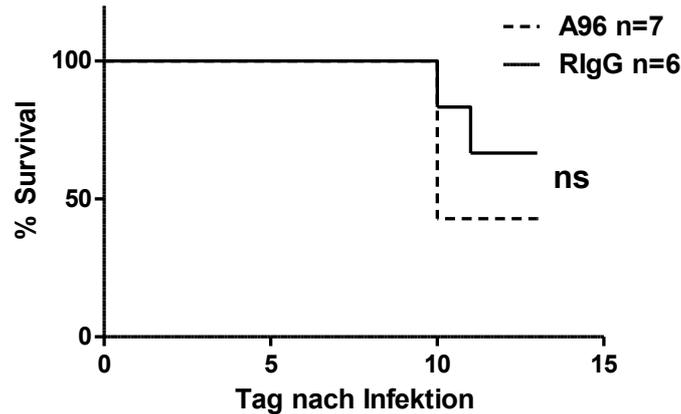
C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit PbA infiziert. 4 Stunden vor Infektion sowie 4 Tage nach Infektion erfolgte die i.p. Applikation von je 200  $\mu$ g anti-Fc $\mu$ R A96 oder RIgG. Am Tag des Auftretens von zerebralen Symptomen wurden die Leukozyten aus den Gehirnen isoliert und mit CD4, CD8 und CD45 Antikörpern gefärbt. Das Verhältnis zwischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Mikrogliazellen (**A**) sowie zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Mikrogliazellen (**B**) wurde ermittelt. Die Daten wurden mit dem Student's *t*-Test (unpaired) ausgewertet und sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=4). Die Inzidenz zerebraler Symptome (**C**) wurde bestimmt. Die Daten wurden mit dem Fisher's exact Test ausgewertet (n=8-9). Die Parasitämie der Mäuse wurde analysiert (**D**). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt (n=10-11).

In mit PbA infizierten und mit anti-Fc $\mu$ R A96 behandelten Mäusen war ebenso wie in mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelten Mäusen eine erhöhte Akkumulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber nicht von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn im Vergleich zu mit RIgG behandelten Mäusen zu beobachten (Abb. 4.17 A und B). Ebenso war die Inzidenz der EZM von anti-Fc $\mu$ R A96 behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren, welchen RIgG appliziert wurde, erhöht (Abb. 4.17 C). Es ergaben sich keine Unterschiede in der Parasitämie zwischen anti-Fc $\mu$ R A96 und RIgG behandelten Mäusen (Abb. 4.17 D).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Antikörper anti-Fc $\mu$ R A96 und anti-Fc $\mu$ R B68 bei der Infektion mit PbA ähnliche Effekte zeigten. Beide bewirkten eine erhöhte

Inzidenz der EZM und eine erhöhte Akkumulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Gehirnen infizierter Mäuse.

Des Weiteren wurde ein Survival-Experiment durchgeführt, um die Entwicklung der Pathologie über den ersten Tag der zerebralen Symptome hinaus verfolgen zu können (Abb. 4.18).



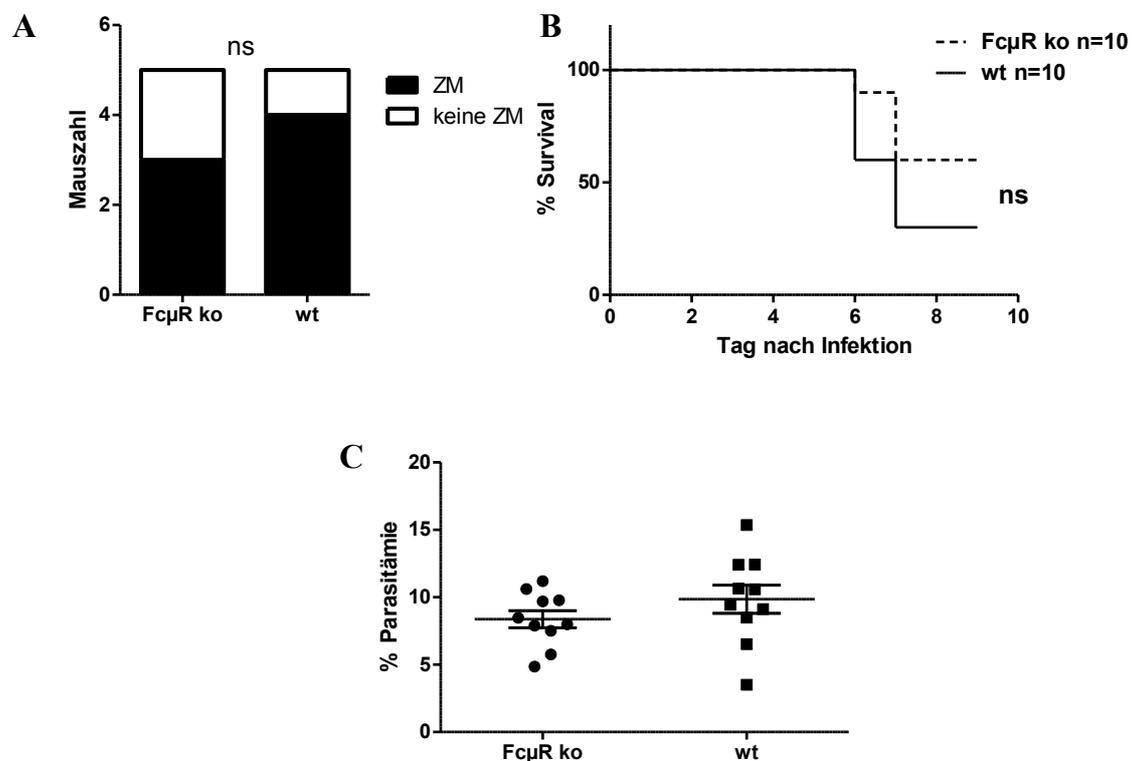
**Abb. 4.18: Auswirkung von anti-FcμR A96 auf das Survival von C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit PbA Blutphaseparasiten**

C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit PbA infiziert. 4 Stunden vor Infektion sowie 4 Tage nach Infektion erfolgte die i.p. Applikation von je 200 μg anti-FcμR A96 oder RIgG. Das Überleben der Mäuse wurde zeitlich verfolgt. Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Log-rank (Mantel-Cox) Test durchgeführt (n=6-7).

Mit anti-FcμR A96 behandelte Mäuse zeigten ein geringeres Überleben im Vergleich zu mit RIgG behandelten Mäusen, dieser Effekt war jedoch, möglicherweise aufgrund der geringen Anzahl verwendeter Versuchstiere, nicht statistisch signifikant. Der beobachtete Effekt passt zu den Beobachtungen eines vermehrten Auftretens der Symptome der EZM am ersten Tag der auftretenden Pathologie (Abb. 4.17 C).

### 4.3.3 Das Auftreten von experimenteller zerebraler Malaria in Fc $\mu$ R-defizienten Mäusen

Aus den Ergebnissen der anti-Fc $\mu$ R-Behandlung kann gefolgert werden, dass eine Modulation der über Fc $\mu$ R vermittelten Signale die Pathologie der EZM beeinflussen könnte. Literaturdaten legen nahe, dass Fc $\mu$ R-vermittelte Signale stimulatorisch wirken (27). Um festzustellen, ob die Abwesenheit des Fc $\mu$ R das Auftreten der EZM beeinflusst, wurden Fc $\mu$ R ko Mäuse und wt Mäuse mit PbA infiziert und die Inzidenz der EZM am ersten Tag des Auftretens der EZM (Abb. 4.19 A) sowie in einem weiteren Experiment das Überleben verfolgt (Abb. 4.19 B). Zudem wurde die Parasitämie beider Gruppen verglichen (Abb. 4.19 C).



**Abb. 4.19: Einfluss der Defizienz des Fc $\mu$ R auf die zerebrale Symptomatik von C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit PbA Blutphaseparasiten**

C57BL/6 wt und C57BL/6 Fc $\mu$ R koMäuse wurden i.p. mit PbA infiziert und die Inzidenz von EZM am ersten Tag des Auftretens zerebraler Symptomatik analysiert (A). Die Daten wurden mit dem Fisher's exact Test ausgewertet (n=5). In einem weiteren Experiment wurde das Überleben der Mäuse zeitlich verfolgt (B). Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Log-rank (Mantel-Cox) Test durchgeführt (n=10). Die Parasitämie der Mäuse wurde am Tag 6 nach Infektion bestimmt (n=10) (C).

Für die Infektion mit PbA wurden nicht wie in den vorherigen Experimenten mit der Applikation der anti-Fc $\mu$ R Antikörper zuvor in flüssigem Stickstoff eingefrorene, sondern frisch aus infizierten Mäusen isolierte Blutphaseparasiten verwendet. Diese verursachen eine höhere Inzidenz von EZM und ein früheres Auftreten der Pathologie und scheinen damit

geeignet, um eine mögliche Milderung von Symptomen bei Fc $\mu$ R ko Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 wt Mäusen festzustellen.

Die Abwesenheit von Fc $\mu$ R bei der PbA-Infektion führte zu einer höheren Überlebensrate von 60 % bei Fc $\mu$ R ko Mäusen im Vergleich zu 30 % bei wt Kontrollmäusen. In einem weiteren Experiment wurde am Tag des Auftretens von EZM eine Inzidenz von 60 % (3/5) bei Fc $\mu$ R ko Mäusen sowie von 80 % (4/5) bei wt Kontrollmäusen festgestellt. Die beobachteten Unterschiede sind in beiden Experimenten jedoch nicht statistisch signifikant. Die Parasitämie zwischen wt und Fc $\mu$ R ko Mäusen war nicht unterschiedlich.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit des Fc $\mu$ R das Auftreten von EZM nicht verhindern konnte. Die Inzidenz der EZM war leicht, aber nicht signifikant verringert.

## 5. Diskussion

Das Immunsystem hat die Aufgabe, Pathogene zu erkennen und zu bekämpfen. Zwar ist eine effektive Pathogenabwehr essentiell, jedoch kommt es durch die ausgelösten Effektor-mechanismen oft auch zur Schädigung von Zellen und Geweben des Wirtes. Dies ist besonders für  $CD8^+$  T-Zell-Antworten relevant, da  $CD8^+$  T-Zellen bei Aktivierung zu zytotoxischen T-Lymphozyten differenzieren, die infizierte Wirtszellen töten und somit ein hohes Potential für die Auslösung einer Immunpathologie besitzen.

Bei der Immunreaktion im Verlauf einer Infektion mit *Plasmodium* sind  $CD8^+$  T-Zellen sowohl in in der Leberphase als auch in der Blutphase von Bedeutung. Während  $CD8^+$  T-Zellen in der Leberphase bei Erkennung infizierter Hepatozyten antiparasitäre Mechanismen ausüben und damit maßgeblich für die Vermittlung der Immunität sind (36), sind sie in der Blutphase Mediatoren einer Entzündungsreaktion im Gehirn, die tödlich verlaufen kann (49). Für die Entwicklung von Impfstoffen oder immunregulatorischen Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten wie der Malaria ist ein Verständnis der Prozesse, über die Immunzellen reguliert werden, von zentraler Bedeutung.

Die Immunantwort durch  $CD8^+$  T-Zellen wird von vielfältigen Faktoren beeinflusst. Zum einen ist das Organ, in dem diese stattfindet, von Bedeutung. Die Leber ist beispielsweise ein Organ, das aufgrund seiner Anatomie durch die Pfortader mit vielen Nahrungsmittelantigenen in Kontakt kommt. Damit es nicht zu einer Aktivierung des Immunsystems durch harmlose Nahrungsmittelantigene kommt, herrscht in der Leber ein tolerogenes Milieu, in dem eine effiziente Induktion von T-Zell-Antworten supprimiert wird (69). Des Weiteren spielt bei einer Infektion auch das Pathogen selbst eine Rolle (70). Aktiviert werden  $CD8^+$  T-Zellen von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie dendritischen Zellen (DZ), die kostimulatorische Signale bereitstellen müssen, um eine Aktivierung der T-Zellen zu ermöglichen. Jedoch können auch andere Zelltypen hierbei eine Rolle spielen. So helfen  $CD4^+$  T-Zellen DZ bei der Aktivierung von  $CD8^+$  T-Zellen, insbesondere in Abwesenheit einer starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Auch B-Zellen beeinflussen die Stärke von T-Zell-Antworten und sind z. B. für eine T-Zell-vermittelte Tumor-Immunität wichtig (7). Dadurch, dass T-Zellen Signale verschiedenen Ursprungs integrieren können, gestaltet sich die Regulation von T-Zell-Antworten sehr komplex.

Der Fc $\mu$ R ist ein Molekül, das kürzlich als Rezeptor für IgM identifiziert wurde (13, 16). Fc $\mu$ R vermittelte Signale beeinflussen den Aktivierungszustand der Fc $\mu$ R exprimierenden Zelle, wie die Proliferation und das Überleben von B-Zellen (22). Natürliche Antikörper wirken im Modell der Leishmaniose als Adjuvantien für vakzineinduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten (9), und der IgM Rheumafaktor bei der rheumatoiden Arthritis korreliert mit der Anzahl von Memory CD8<sup>+</sup> T-Zellen (10). Daher ist es denkbar, dass über den Fc $\mu$ R vermittelte Signale Einfluss auf CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten haben. Dies wurde, wie im Folgenden diskutiert, im Modell der murinen Malaria-Vakzinierung und –Infektion durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern untersucht.

### **5.1 Die Steigerung der vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper**

Zunächst sollte der Einfluss der Applikation des Antikörpers anti-Fc $\mu$ R B68 bei der experimentellen Malaria-Vakzinierung untersucht werden. Für die Vakzinierung wurde die detoxifizierte Adenylatzyklase (ACT) von *Bordetella pertussis* als Carrier verwendet, die ein Targeting an CD11b/CD18 exprimierende Zellen wie myeloide dendritische Zellen bedingt (62). Der Vakzine-Carrier ACT-CSP enthält das H-2K<sup>d</sup> restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop des Circumsporozoitenproteins (CSP), eines Leberphasenantigens (68).

7 Tage nach Vakzinierung von BALB/c Mäusen mit ACT-CSP wurde über eine MHC-I Multimerfärbung die Frequenz vakzineinduzierter CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen von mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäusen im Vergleich zur mit Ratten-IgG (RIgG) behandelten Kontrollgruppe bestimmt. Diese war bei mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäusen in der Milz und Leber etwa verdoppelt. Zudem produzierte auch ein höherer Anteil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Milzen der mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäuse nach antigenspezifischer Restimulation IFN $\gamma$ . Dieser Effekt konnte auch in der Leber beobachtet werden, erreichte aber in diesem Organ keine statistische Signifikanz. Die vakzineinduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort war jedoch nicht langanhaltend und schon 14 Tage nach der Vakzinierung war die Frequenz CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch MHC-I Multimerfärbung detektiert wurden, stark abgefallen. Dieser Effekt konnte unabhängig davon, ob die Mäuse mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper oder RIgG behandelt worden waren, sowohl in der Milz als auch in der Leber beobachtet werden. Trotzdem wurde in den Lebern der mit anti-

Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäuse zu diesem Zeitpunkt noch eine höhere Frequenz CSP-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer MHC-I Multimerfärbung detektiert als in den Lebern der mit RIgG behandelten Mäuse. Auch die IFN $\gamma$ -Produktion nach CSP-spezifischer Restimulation war in den mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäusen erhöht, dieser Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz.

In C57BL/6 Mäusen führte die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper im Vergleich zur Applikation von RIgG 7 Tage nach Vakzinierung mit der Modellvakzine ACT-OVA ebenfalls zur Bildung einer erhöhten Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Frequenz MHC-I Multimer-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen war jedoch nicht erhöht. Dieser Unterschied zu den in den BALB/c Mäusen beobachteten Effekten könnte durch die geringere Expression von Fc $\mu$ R auf B-Zellen von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu B-Zellen von BALB/c Mäusen bedingt sein. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass in Mäusen B-Zellen die den Fc $\mu$ R am stärksten exprimierenden Zellen sind (13, 18).

Es ist auffallend, dass in C57BL/6 Mäusen, die mit ACT-OVA behandelt wurden, eine geringere Frequenz antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen als in den mit ACT-CSP vakzinierten BALB/c Mäusen induziert wurde. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass die Aminosäuren, welche die Epitope flankieren, bzw. die Position des Peptids im Vakzine-Carrier die Antigenpräsentation beeinflussen (71).

Die in vakzinierten, mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäusen induzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen übten antiparasitäre Funktionen aus. Dies ist durch die Verminderung der Parasitenlast in der Leber dieser Mäuse 30 Stunden nach der Infektion mit *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) Sporozoiten im Vergleich zu mit RIgG behandelten vakzinierten Mäusen ersichtlich. Jedoch wurde unabhängig davon, ob die Mäuse mit RIgG oder anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelt worden waren, kein steriler Schutz vermittelt und alle nach der Vakzinierung mit Sporozoiten infizierten Mäuse entwickelten eine Blutphasenparasitämie. Die Entwicklung einer sterilen Immunität durch Vakzinierung gegen das Leberstadium ist jedoch schwer zu erzielen, da die Infektion eines einzigen Hepatozyten durch einen Sporozoiten bei nicht erfolgreicher Bekämpfung des Parasiten durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausreichend ist, um zehntausende Merozoiten freizusetzen.

Die Induktion von steriler Immunität benötigt daher meist eine Boost-Immunisierung. Selbst bei einer Prime/Boost-Vakzinierung mit ACT-CSP kann jedoch kein steriler Schutz

vermittelt werden (68). Die Vermittlung eines kompletten Schutzes durch ACT-CSP gelingt erst bei Anwendung in einer heterologen Prime/Boost-Immunisierung in Kombination mit attenuierten Salmonellen, welche das entsprechende CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop tragen (65). Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Antikörper-Applikation auch in einer homologen ACT-CSP Prime/Boost-Vakzinierung ein partieller Schutz vermittelt werden kann. Verwendet wurde hierzu ein blockierender Antikörper gegen den Koinhibitor CTLA-4 (68). Es wäre von Interesse zu untersuchen, ob im Zusammenhang mit einer Prime/Boost-Immunisierung durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper ebenfalls ein Schutz vermittelt werden kann. Hierbei wäre es möglich, dass im Gegensatz zur Gabe von anti-CTLA-4 Antikörper eine Antikörpergabe bei der Prime-Immunisierung sinnvoll ist, da durch diese Arbeit bereits ein Effekt der Gabe des Antikörpers bei der initialen Immunisierung gezeigt wird.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es 7 Tage nach Vakzinierung von BALB/c Mäusen mit ACT-CSP bzw. von C57BL/6 Mäusen mit ACT-OVA bei Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper zu einer verstärkten vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort im Vergleich zu einer Applikation von RIGG kam. 14 Tage nach Vakzinierung von BALB/c Mäusen war die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort jedoch bereits stark zurückgegangen, auch wenn die Mäuse mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelt worden waren. Die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper führte in vakzinierten BALB/c Mäusen 30 Stunden nach einer Infektion mit PbA Sporoziten zu einer Senkung der Parasitenlast in der Leber, konnte aber keinen sterilen Schutz vermitteln.

### **5.2 B-Zellen als Mediatoren der durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper verstärkten vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort**

In dieser Arbeit konnte durch Färbung von Milzzellen mit einem direkt fluorochrommarkierten anti-Fc $\mu$ R Antikörper bestätigt werden, dass der Fc $\mu$ R in Mäusen nur auf B-Zellen in größeren Mengen exprimiert wird (13, 18). Die Expression auf CD4, CD8, CD11b und/oder CD11c exprimierenden Zellen war, falls vorhanden, sehr gering und führte zu keiner deutlichen Fluoreszenzintensitätsverschiebung im Vergleich zu Fc $\mu$ R ko Zellen. Diese Ergebnisse stehen ebenfalls im Einklang mit Literaturdaten, obwohl die Expression von Fc $\mu$ R auf Makrophagen und Granulozyten umstritten ist (19, 20). In einer Publikation wurde ebenfalls eine Expression auf murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben, die nach CD3/CD28

Stimulation erhöht war (27). Andere Publikationen jedoch widersprechen einer Expression des Fc $\mu$ R auf murinen T-Zellen und zeigen keine Induzierbarkeit seiner Expression durch anti-CD3 Stimulation (13, 18, 30). Auf humanen T-Zellen wird der Fc $\mu$ R exprimiert und die Expression von Fc $\mu$ R-mRNA ist bei Stimulation mit anti-CD3 Antikörper oder IL-2 verringert (29).

Das Fehlen einer deutlichen Expression des murinen Fc $\mu$ R auf anderen Zellen als B-Zellen legt nahe, dass B-Zellen für die Vermittlung von anti-Fc $\mu$ R Antikörper-Effekten verantwortlich sind.

Zur Untersuchung der Rolle von B-Zellen in dem verwendeten Vakzinierungsmodell wurde zunächst die vakzineinduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort von B-Zell-defizienten JHT und wt C57BL/6 Mäusen verglichen. In der MHC-I Multimerfärbung konnte kein Unterschied in der Frequenz der vakzineinduzierten antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen wt und JHT Mäusen festgestellt werden, jedoch war die Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach peptidspezifischer Restimulation in wt Mäusen erhöht. Dementsprechend war die Anwesenheit von B-Zellen bei der durch ACT vermittelten Vakzinierung nicht erforderlich für die Induktion einer CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunantwort, jedoch unterstützte ihre Anwesenheit die Zytokinproduktion. Ähnliche Beobachtungen wurden in einem viralen Modell gemacht, in dem die Fähigkeit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Zytokine zu produzieren, in B-Zell-defizienten Mäusen mit der Zeit abnahm, obwohl die Frequenz spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit einer MHC-I Multimerfärbung detektiert wurden, vergleichbar mit wt Mäusen war (72).

Es sollte weiterhin geklärt werden, ob B-Zellen für die vom anti-Fc $\mu$ R Antikörper vermittelten Effekte verantwortlich sind. Dazu wurde der Einfluss der anti-Fc $\mu$ R Antikörper-Behandlung im Vergleich zur Behandlung mit RIgG in vakzinierten JHT Mäusen untersucht. In den mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten JHT Mäusen war die Frequenz IFN $\gamma$ -exprimierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach antigenspezifischer Restimulation nicht erhöht. Daher scheinen B-Zellen die Mediatoren der stimulatorischen Wirkung des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers zu sein.

Die Wirkung des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers über die den Fc $\mu$ R exprimierenden B-Zellen scheint aufgrund der Tatsache, dass diese Zellen die einzigen Zellen in Mäusen sind, die eine starke Fc $\mu$ R Expression aufweisen, sehr plausibel. Diese Hypothese wird durch die Aufhebung der stimulatorischen Wirkung auf die vakzineinduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort in B-Zell-

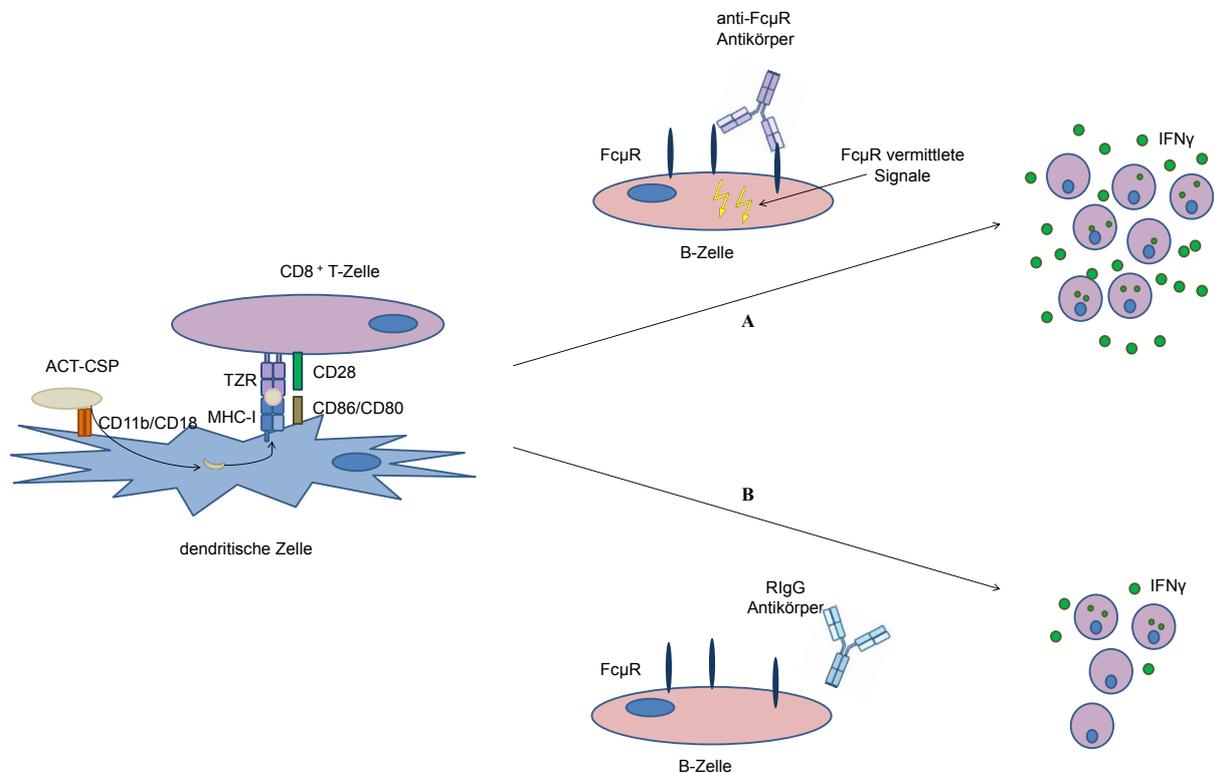
defizienten Mäusen weiter gestützt. Ein Problem bei der Verwendung B-Zell-defizienter Mäuse zur Analyse des Einflusses von B-Zellen auf Immunantworten ist jedoch eine Involvierung von B-Zellen bei der Ausbildung der Architektur der lymphoiden Organe (5). Die Depletion von B-Zellen durch Antikörper ist ein alternativer Ansatz, der eine normale Entwicklung der lymphoiden Organe ermöglicht. Um einen noch umfassenderen Beweis für die Involvierung von B-Zellen bei der Vermittlung der anti-Fc $\mu$ R Antikörper bedingten Effekte zu erbringen, könnten ergänzend zu den bisherigen Studien B-Zell-Depletionsexperimente durchgeführt werden, in denen der Einfluss der anti-Fc $\mu$ R Antikörper-Behandlung auf B-Zell-depletierte Mäuse untersucht wird.

Eine Funktion von B-Zellen als APZ scheint in diesem Vakzinierungsmodell eher unwahrscheinlich, da die Adenylatzyklase das Antigen vorwiegend in CD11b/CD18 exprimierende Zellen transloziert (62). CD11b/CD18 wird von Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen exprimiert (73), aber auch von den professionellen antigenpräsentierenden myeloiden dendritischen Zellen. In der murinen Milz exprimieren nur wenige B-Zellen CD11b/CD18 (74). Dass B-Zellen bei der ACT-CSP Vakzinierung tatsächlich nicht als wichtige APZ fungierten wurde dadurch gezeigt, dass ein Transfer von B-Zellen aus vakzinierten Donormäusen in Rezipientenmäuse keine nennenswerte Induktion einer spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort bewirkte.

Somit schienen B-Zellen die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort, die von anderen APZ induziert wurde, zu beeinflussen, was zu einer erhöhten Zytokinproduktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation bei wt Mäusen im Vergleich zu B-Zell-defizienten Mäusen führte.

In vakzinierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen, die mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelt wurden, konnte eine erhöhte Expression des kostimulatorischen Moleküls und Aktivierungsmarkers CD86 im Vergleich zu mit RIgG behandelten Mäusen nachgewiesen werden. Eine erhöhte Aktivierung von B-Zellen legt agonistische Effekte des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers nahe (Abb. 5), da die Expression von Fc $\mu$ R die Aktivierung stimulatorischer Signalwege, wie des Erk- und NF- $\kappa$ B-Signalwegs, fördern kann (27). Für einen anderen anti-Fc $\mu$ R Antikörperklon wurden bereits stimulatorische Effekte auf B-Zellen nachgewiesen, die sich durch eine erhöhte Proliferation und ein erhöhtes Überleben der Zellen zeigten (22). Um zu untersuchen, ob tatsächlich eine postulierte agonistische Wirkung des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers auf B-Zellen stattfindet, könnte untersucht werden, ob in B-Zellen nach Zugabe

von anti-Fc $\mu$ R Antikörper Moleküle von Signalwegen, wie z.B. dem NF- $\kappa$ B Signalweg, phosphoryliert werden. Die Detektion der phosphorylierten Moleküle könnte dabei durch einen Western-Blot erfolgen.



**Abb. 5: Hypothese zur Wirkung des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers bei der Vermittlung einer erhöhten vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort**

Der Vakzine-Carrier ACT-CSP transloziert das Antigen bevorzugt in CD11b/CD18 exprimierende Zellen, wie die professionellen antigenpräsentierenden myeloiden dendritischen Zellen. Diese induzieren eine CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort.

**(A)** In Anwesenheit des putativ agonistischen anti-Fc $\mu$ R Antikörpers erhalten B-Zellen stimulatorische Signale und fördern über einen unbekanntem Mechanismus die Generierung einer hohen Frequenz antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die funktionell sind und IFN $\gamma$  produzieren.

**(B)** In Anwesenheit des unspezifischen R1gG erhalten die B-Zellen keine stimulatorischen Signale über den Fc $\mu$ R und es entsteht eine geringere Frequenz antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

In anderen Studien wurde ebenfalls beobachtet, dass B-Zellen stimulatorisch auf T-Zell-Antworten wirken können, teilweise durch eine Funktion als APZ (7, 8, 11, 72, 75). Allerdings gibt es auch Studien, die z.B. bei Tumorerkrankungen einen negativen Effekt von B-Zellen auf CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten zeigen (76, 77). So wurde in einer der Studien die IL-10 Produktion von B-Zellen mit einer verminderten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort in Verbindung

gebracht (77). Um eine Wirkung des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers über von regulatorischen B-Zellen produziertes IL-10 auszuschließen, könnten B-Zell-spezifische IL-10 ko Mäuse verwendet werden. Diese könnten vakziniert und mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper oder RIgG behandelt werden. Wenn der Effekt von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern nicht auf der Beeinflussung der IL-10 Produktion von B-Zellen beruht, sollte in B-Zell-spezifischen IL-10 ko Mäusen, ähnlich wie in wt Mäusen, ein stimulatorischer Effekt der Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern im Vergleich zur Applikation von RIgG zu beobachten sein.

Für die Vermittlung einer stimulatorischen Wirkung von B-Zellen auf T-Zell-Antworten sind verschiedene Mechanismen möglich. So konnte gezeigt werden, dass B-Zellen die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch ihre Expression von IL-15 steigern können (11). In einem Modell, in dem B-Zellen die antivirale T-Zell-Antwort förderten, wurde über einen möglichen aktivierenden Einfluss der Expression des Moleküls CD70 auf B-Zellen spekuliert (72). Es ist bekannt, dass bei der Verwendung des in dieser Arbeit benutzten ACT-CSP in einer heterologen Prime/Boost-Immunisierung die induzierten antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen den Liganden von CD70, CD27, stark exprimieren (66). Damit wäre eine Regulation des Aktivierungsstatus von T-Zellen über eine kostimulatorische Interaktion zwischen CD70 und CD27 möglich. In weiteren Experimenten könnte untersucht werden, ob eine Behandlung von vakzinierten Mäusen mit anti-Fc $\mu$ R Antikörpern zu einer verstärkten Expression von CD70 auf B-Zellen führt, was eine verstärkte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort bedingen könnte.

Es konnte außerdem durch den Transfer von Überständen aktivierter B-Zellen gezeigt werden, dass von B-Zellen produzierte lösliche Mediatoren die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Proliferation erhöhen. Bei der Vermittlung dieses Effektes spielen offenbar Lymphotoxin und TNF $\alpha$  eine Rolle, da die Zugabe von anti-Lymphotoxin und anti-TNF $\alpha$  Antikörpern diesen Effekt teilweise aufheben konnte (78). Ähnliche *in vitro* Experimente könnten Aufschluss darüber geben, ob mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelte B-Zellen eine T-Zell-Antwort über sekretierte Zytokine beeinflussen können. Wenn es bei einer Inkubation von stimulierten T-Zellen mit Überständen von mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper inkubierten B-Zellen zu einer erhöhten Aktivierung der T-Zellen im Vergleich zur Zugabe von Überständen von mit RIgG inkubierten B-Zellen kommt, nachweisbar z.B. über eine verstärkte Proliferation der T-Zellen, könnte untersucht werden, ob dieser Effekt durch die Zugabe von zytokinblockierenden Antikörpern aufgehoben werden kann. Alternativ wären Untersuchungen zur Auswirkung der

anti-Fc $\mu$ R Applikation bei vakzinierten B-Zell-spezifisch zytokine-defizienten Mäusen möglich.

Falls der Einfluss des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers nicht auf von B-Zellen sekretierten Zytokinen beruht, könnte durch eine direkte Koinkubation von B- und T-Zellen untersucht werden, ob ein durch Zell-Zell-Kontakt vermittelter Mechanismus eine Rolle spielt.

Überraschenderweise führte die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper in den B-Zell-defizienten JHT Mäusen sogar zur Verminderung von IFN $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach peptidspezifischer Restimulation. Dies könnte darauf hindeuten, dass andere Zellen als B-Zellen, wie Makrophagen oder Granulozyten, ebenfalls durch die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper beeinflusst werden. Im Gegensatz zur Wirkung auf B-Zellen könnten durch die sehr geringen Expressionslevel des Fc $\mu$ R auf diesen Zellen jedoch antagonistische Effekte mit inhibitorischer Wirkung ausgelöst werden. Eine Expression von Fc $\mu$ R auf diesen Zellen ist in der Literatur umstritten und konnte auch in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden (19, 20).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Applikation des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers sich positiv auf die Generierung einer vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort auswirkte. Hierfür waren offenbar B-Zellen verantwortlich, die einzigen Zellen, die in Mäusen den Fc $\mu$ R stark exprimieren. Die Effekte des Antikörpers könnten durch eine agonistische Wirkung des Antikörpers vermittelt werden, die eine erhöhte Aktivierung der B-Zellen verursacht. Diese unterstützen dann die von anderen APZ induzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort.

### **5.3 Die Rolle des Fc $\mu$ R bei der Entwicklung der experimentellen zerebralen Malaria**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper eine vakzineinduzierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort verstärkt, sollte nun analysiert werden, ob die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper auch den Verlauf der experimentellen zerebralen Malaria (EZM) beeinflusst. Bei der EZM sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Entwicklung einer zerebralen Symptomatik maßgeblich (49). In diesem Modell findet eine Antigenpräsentation durch DZ statt, was im Modell der ACT-induzierten Vakzinierung aufgrund der CD11b/CD18

Expression der myeloiden dendritischen Zellen ebenfalls postuliert werden kann. Dabei ist die Präsentation von Antigen durch DZ bei der EZM entscheidend für die Entwicklung einer Pathologie (79, 80). B-Zellen scheinen als APZ nicht zwingend benötigt zu werden, da B-Zell-defiziente Mäuse suszeptibel für die Entwicklung von EZM sind. Jedoch trat bei den B-Zell-defizienten JHD Mäusen im Vergleich zu wt Mäusen eine verringerte Inzidenz der EZM auf (49). Diese Ergebnisse schließen eine essentielle Beteiligung von B-Zellen an der Initiierung der EZM aus, weisen aber dennoch auf eine mögliche Beteiligung an der Vermittlung der Pathologie hin. B-Zellen scheinen jedoch ebenfalls eine regulatorische Funktion bei der EZM ausüben zu können, da IL-10 produzierende B-Zellen einen mildernden Einfluss auf die Ausbildung einer Pathologie haben, in einem normalen Infektionsverlauf reicht die Induktion jedoch nicht zur Vermeidung einer Pathologie aus (81).

Für die Untersuchung des Effekts von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern bei der Malaria-Infektion wurden zwei verschiedene Klone von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern verwendet, die Klone B68 und A96. Die EZM-suszeptiblen C57BL/6 Mäuse wurden mit PbA Blutphaseparasiten infiziert. Die Infektion wurde mit zuvor in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Blutphaseparasiten durchgeführt, die im Vergleich zu einer Infektion mit frisch isolierten Blutphaseparasiten einen milderen und verspäteten Krankheitsverlauf zeigen. Da aufgrund der Ergebnisse der Vakzinierungsexperimente eine Verschlimmerung der Pathologie bei der Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper vermutet werden kann, könnte durch dieses Infektionsmodell ein solcher Unterschied zwischen mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäusen und Kontrolltieren möglicherweise besser dargestellt werden.

In den Gehirnen der mit anti-Fc $\mu$ R B68 oder anti-Fc $\mu$ R A96 behandelten Mäuse war im Vergleich zu denen von mit RIgG behandelten Mäusen eine verstärkte Akkumulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu beobachten. Dieser Effekt schien spezifisch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu sein, da kein Unterschied zwischen der Akkumulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Gehirnen der mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper bzw. mit RIgG behandelten Mäuse festgestellt wurde. Des Weiteren wurde die IFN $\gamma$ -Produktion der aus den Gehirnen isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Restimulation mit PMA/Ionomycin bestimmt. Die Produktion von IFN $\gamma$  bei der Infektion ist wesentlich für die Ausprägung einer zerebralen Symptomatik, wie aus einer Studie mit IFN $\gamma$  neutralisierenden Antikörpern hervorgeht (82). Dabei kann IFN $\gamma$  zur Hochregulation der MHC-I Expression auf Hirnendothelzellen beitragen (52). Die Expression von IFN $\gamma$  durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist aber nicht notwendig für die Entwicklung der EZM (51). Die IFN $\gamma$

Expression von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche aus Gehirnen infizierter Mäuse isoliert wurden, die mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelt worden waren, war erhöht im Vergleich zu der von mit RIgG behandelten Mäusen. Dies weist auf eine erhöhte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen hin. Somit fand nicht nur eine höhere Akkumulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Gehirnen PbA infizierter und mit anti-Fc $\mu$ R B68 behandelter Mäuse statt, sondern die rekrutierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wiesen auch einen aktivierteren Phänotyp auf.

In Übereinstimmung mit der erhöhten Akkumulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Gehirnen von mit PbA infizierten Mäusen, die mit anti-Fc $\mu$ R Antikörpern behandelt worden waren, war die Inzidenz der EZM am Tag des initialen Auftretens der Symptomatik erhöht, was ebenfalls auf eine verstärkte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort hinweist. Die erhöhte Inzidenz von EZM in anti-Fc $\mu$ R A96 behandelten Mäusen wurde auch in einem Survival-Experiment bestätigt, das jedoch, möglicherweise aufgrund der geringen Anzahl der verwendeten Mäuse, keine statistisch signifikanten Unterschiede ergab.

Die Applikation der Antikörper anti-Fc $\mu$ R B68 und anti-Fc $\mu$ R A96 wirkte sich dagegen nicht auf die entwickelte Parasitämie der Mäuse im Vergleich zu mit RIgG behandelten Mäusen aus. Dadurch können Effekte durch einen unterschiedlichen Infektionsverlauf und einer damit einhergehenden unterschiedlichen Konzentration antigenen Materials ausgeschlossen werden. Der Mechanismus, über den die anti-Fc $\mu$ R Antikörper zu einer verstärkten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort im Modell der EZM führen, ist nicht bekannt. Basierend auf den Ergebnissen der Vakzinierungsexperimente kann aber auch hier eine agonistische Wirkung mit stimulatorischem Effekt auf B-Zellen angenommen werden.

Bei der Infektion von Menschen mit *Plasmodium falciparum* können natürliche IgM-Antikörper an infizierte Erythrozyten binden, und die Bindung von IgM korreliert mit der Schwere einer Malaria-Erkrankung und der Bildung von Erythrozyten-Rosetten durch Bildung von Aggregaten aus infizierten und nicht infizierten Erythrozyten (53). Es wurde darüber spekuliert, dass die Bindung von IgM an infizierte Erythrozyten die Interaktion des IgM mit dem Fc $\mu$ R beeinflussen und zur Aktivierung von B-Zellen führen könnte (54). Auch bei einer Infektion mit dem in dieser Arbeit verwendeten Parasitenstamm PbA können Mäuse parasitenspezifisches IgM bilden (83). Daher scheint es durchaus möglich, dass von IgM Antikörpern über den Fc $\mu$ R ausgeübte Effekte bei der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit PbA eine Rolle spielen und diese möglicherweise die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort beeinflussen. Dies konnte durch die vorherigen Experimente nicht ermittelt werden, da bei Verwendung

von agonistischen Antikörpern artifizielle Signale ausgelöst werden und nicht ersichtlich ist, ob die entsprechenden Signalwege in einer Infektion normalerweise relevant sind. Um dies zu untersuchen, wurde die Inzidenz der EZM in Fc $\mu$ R ko und wt Mäusen verglichen. Dabei wäre eine verringerte Inzidenz der EZM in Fc $\mu$ R ko Mäusen denkbar, da in diesen Mäusen keine stimulatorischen Signale durch den Fc $\mu$ R vermittelt werden können.

Die Infektion der Mäuse erfolgte durch eine Frischblutinfektion, die einen schnellen Verlauf und eine hohe Inzidenz der EZM zeigt, da bei der Infektion mit eingefrorenen Blutphaseparasiten, welche in wt Mäusen nur eine geringe Inzidenz der EZM verursachen, EZM mildernde Effekte des Fc $\mu$ R ko möglicherweise schlechter zu beobachten sind. Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Abwesenheit des Fc $\mu$ R nicht vor EZM schützte. Dies ist nicht überraschend, da B-Zellen in Mäusen die einzigen Zellen sind, welche den Fc $\mu$ R stark exprimieren, B-Zell-defiziente Mäuse aber noch eine Suszeptibilität für EZM aufweisen (49).

Die Parasitämie von wt und Fc $\mu$ R ko Mäusen war nicht unterschiedlich, es zeigte sich jedoch eine verringerte Inzidenz der EZM in Fc $\mu$ R ko Mäusen, die aber nicht statistisch signifikant war und aufgrund der geringen Anzahl von Mäusen möglicherweise zufällig beobachtet worden sein könnte. Um eine fundierte Aussage treffen zu können, werden daher weitere Experimente benötigt. Eine verringerte Inzidenz von EZM in Fc $\mu$ R ko Mäusen würde darauf hindeuten, dass B-Zellen bei der Malaria-Infektion über den Fc $\mu$ R stimulatorische Signale erhalten und einen positiven Einfluss auf CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten nehmen. In diesem Fall wäre es denkbar, dass bei einer Infektion mit eingefrorenen Blutphaseparasiten aufgrund des mildereren Verlaufes dieser Infektion die Entwicklung der EZM in Fc $\mu$ R ko Mäusen vollständig unterbleibt.

Zur Erbringung eines Beweises für die Beeinflussung von CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten durch antigenspezifisches IgM in der Malaria-Infektion könnte IgM aus PbA-infizierten Donormäusen bzw. naiven Kontrolltieren aufgereinigt und in Rezipientenmäuse transferiert werden. Anschließend würde eine Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort und der Inzidenz zerebraler Pathologie nach Infektion der Mäuse durchgeführt werden. Das Auftreten einer erhöhten Inzidenz der EZM bei Transfer parasitenspezifischen IgMs in wt Mäuse im Vergleich zum Transfer unspezifischen IgMs in wt Mäuse würde eine Involvierung

antigenspezifischen IgMs bei der Ausbildung von zerebralen Symptomen nahelegen. Bei einer spezifischen Wirkung parasitenspezifischen IgMs über den Fc $\mu$ R dürfte eine Verschlimmerung der EZM durch den Transfer von parasitenspezifischem IgM im Vergleich zu unspezifischem IgM in Fc $\mu$ R ko Rezipienten nicht oder nur stark vermindert auftreten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern bei der Infektion mit *Plasmodium berghei* ANKA zu einer Verschlimmerung der zerebralen Symptomatik führte, die von einer übermäßigen Akkumulation aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn begleitet war. Basierend auf den Ergebnissen der Vakzinierungsstudien ist ein agonistischer Effekt des anti-Fc $\mu$ R Antikörpers auf Fc $\mu$ R-exprimierende B-Zellen denkbar, welche anschließend die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort beeinflussten. Fc $\mu$ R ko Mäuse waren suszeptibel für EZM und wiesen nur eine geringfügig und nicht statistisch signifikant niedrigere Inzidenz auf, sodass über den Fc $\mu$ R vermittelte Signale bei einer Infektion normalerweise möglicherweise eine untergeordnete Rolle für die Entwicklung von EZM spielen.

### 5.4 Ausblick

Die Anwendung von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern zur Steigerung einer protektiven CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort im Menschen ist grundsätzlich denkbar. Eine solche Verstärkung von CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten ist in vielen Kontexten wünschenswert, z.B. bei Vakzinierungen oder Infektionen, in denen CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Schutz vermitteln, wie z.B. bei Viruserkrankungen.

Bei dem Transfer von im Mausmodell gewonnenen immunologischen Erkenntnissen auf den Menschen ist jedoch prinzipiell zu beachten, dass Immunreaktionen zwischen Menschen und Mäusen nicht immer vergleichbar ablaufen. In dieser Arbeit waren die bei der anti-Fc $\mu$ R Applikation beobachteten Effekte selbst bei der Verwendung verschiedener Mausstämme unterschiedlich, da die in vakzinieren BALB/c Mäusen beobachtete erhöhte Frequenz antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in C57BL/6 Mäusen nicht auftrat. In diesen Mäusen kam es nur zu der in BALB/c Mäusen ebenfalls beobachteten erhöhten Zytokinproduktion von vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper. Im Falle einer Behandlung von Menschen mit einem anti-Fc $\mu$ R Antikörper wäre zusätzlich zu bedenken, dass in der Maus nur B-Zellen den Fc $\mu$ R stark exprimieren, im Menschen jedoch auch T-Zellen und damit die Zielzellen einer potentiellen Behandlung eine deutliche Expression des Fc $\mu$ R zeigen (16). Dadurch ist eine völlig andere Beeinflussung der Immunreaktion möglich. Bei stimulatorischer Wirkung des applizierten Antikörpers auf den Fc $\mu$ R exprimierende B- und T-Zellen wäre beispielsweise die Induktion einer sehr starken CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort denkbar. Diese könnte sich vorteilhaft auswirken und eine erhöhte Protektion durch pathogenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingen, bei einer überschießenden Immunantwort wäre aber ebenfalls das Auftreten von Immunpathologien denkbar. In diesem Zusammenhang konnte in dieser Arbeit bereits für das Mausmodell der zerebralen Malaria gezeigt werden, dass die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper die Ausprägung von Erkrankungen, bei denen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Vermittlung einer Immunpathologie beteiligt sind, verstärken kann.

Es wäre außerdem interessant zu untersuchen, ob starke Signale durch Bindung von IgM an den Fc $\mu$ R im natürlichen Verlauf von Erkrankungen an der Ausprägung von Immunpathologien beteiligt sein können. In diesem Fall wäre ein therapeutischer Einsatz von den Fc $\mu$ R blockierenden Antikörpern denkbar.

## 6. Literatur

1. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
2. Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and S. Pillai. 2012. *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders.
3. Chavez-Galan, L., M. C. Arenas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chavez, and R. Lascurain. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & molecular immunology* 6: 15-25.
4. Harty, J. T., A. R. Tvinnereim, and D. W. White. 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology* 18: 275-308.
5. Crowley, M. T., C. R. Reilly, and D. Lo. 1999. Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. *J Immunol* 163: 4894-4900.
6. DiLillo, D. J., T. Matsushita, and T. F. Tedder. 2010. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183: 38-57.
7. DiLillo, D. J., K. Yanaba, and T. F. Tedder. 2010. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol* 184: 4006-4016.
8. Ma, Y., D. Xiang, J. Sun, C. Ding, M. Liu, X. Hu, G. Li, G. Kloecker, H. G. Zhang, and J. Yan. 2013. Targeting of Antigens to B Lymphocytes via CD19 as a Means for Tumor Vaccine Development. *J Immunol* 190: 5588-5599.
9. Stager, S., J. Alexander, A. C. Kirby, M. Botto, N. V. Rooijen, D. F. Smith, F. Brombacher, and P. M. Kaye. 2003. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *Nature medicine* 9: 1287-1292.
10. Neidhart, M., K. Fehr, F. Pataki, and B. A. Michel. 1996. The levels of memory (CD45RA-, RO+) CD4+ and CD8+ peripheral blood T-lymphocytes correlate with IgM rheumatoid factors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 15: 201-209.
11. Schneider, R., A. N. Mohebiany, I. Ifergan, D. Beauseigle, P. Duquette, A. Prat, and N. Arbour. 2011. B cell-derived IL-15 enhances CD8 T cell cytotoxicity and is increased in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 187: 4119-4128.
12. Lund, F. E., and T. D. Randall. 2010. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nature reviews. Immunology* 10: 236-247.
13. Shima, H., H. Takatsu, S. Fukuda, M. Ohmae, K. Hase, H. Kubagawa, J. Y. Wang, and H. Ohno. 2010. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *International immunology* 22: 149-156.
14. Brandtzaeg, P., and H. Prydz. 1984. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature* 311: 71-73.
15. Shibuya, A., N. Sakamoto, Y. Shimizu, K. Shibuya, M. Osawa, T. Hiroyama, H. J. Eyre, G. R. Sutherland, Y. Endo, T. Fujita, T. Miyabayashi, S. Sakano, T. Tsuji, E. Nakayama, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and H. Nakauchi. 2000. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nature immunology* 1: 441-446.
16. Kubagawa, H., S. Oka, Y. Kubagawa, I. Torii, E. Takayama, D. W. Kang, G. L. Gartland, L. F. Bertoli, H. Mori, H. Takatsu, T. Kitamura, H. Ohno, and J. Y. Wang.

2009. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. *The Journal of experimental medicine* 206: 2779-2793.
17. Vire, B., A. David, and A. Wiestner. 2011. TOSO, the Fcmicro receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation. *J Immunol* 187: 4040-4050.
  18. Honjo, K., Y. Kubagawa, D. M. Jones, B. Dizon, Z. Zhu, H. Ohno, S. Izui, J. F. Kearney, and H. Kubagawa. 2012. Altered Ig levels and antibody responses in mice deficient for the Fc receptor for IgM (FcmuR). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 15882-15887.
  19. Lang, K. S., P. A. Lang, A. Meryk, A. A. Pandya, L. M. Boucher, V. I. Pozdeev, M. W. Tusche, J. R. Gothert, J. Haight, A. Wakeham, A. J. You-Ten, D. R. McIlwain, K. Merches, V. Khairnar, M. Recher, G. P. Nolan, Y. Hitoshi, P. Funkner, A. A. Navarini, A. Verschoor, N. Shaabani, N. Honke, L. Z. Penn, P. S. Ohashi, D. Haussinger, K. H. Lee, and T. W. Mak. 2013. Involvement of Toso in activation of monocytes, macrophages, and granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 2593-2598.
  20. Honjo, K., Y. Kubagawa, and H. Kubagawa. 2013. Is Toso/IgM Fc receptor (FcmuR) expressed by innate immune cells? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
  21. Choi, S. C., H. Wang, L. Tian, Y. Murakami, D. M. Shin, F. Borrego, H. C. Morse, 3rd, and J. E. Coligan. 2013. Mouse IgM Fc Receptor, FCMR, Promotes B Cell Development and Modulates Antigen-Driven Immune Responses. *J Immunol* 190: 987-996.
  22. Ouchida, R., H. Mori, K. Hase, H. Takatsu, T. Kurosaki, T. Tokuhisa, H. Ohno, and J. Y. Wang. 2012. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B-cell survival, and humoral immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E2699-2706.
  23. Pallasch, C. P., A. Schulz, N. Kutsch, J. Schwamb, S. Hagist, H. Kashkar, A. Ultsch, C. Wickenhauser, M. Hallek, and C. M. Wendtner. 2008. Overexpression of TOSO in CLL is triggered by B-cell receptor signaling and associated with progressive disease. *Blood* 112: 4213-4219.
  24. Proto-Siqueira, R., R. A. Panepucci, F. P. Careta, A. Lee, A. Clear, K. Morris, C. Owen, E. G. Rizzatti, W. A. Silva, Jr., R. P. Falcao, M. A. Zago, and J. G. Gribben. 2008. SAGE analysis demonstrates increased expression of TOSO contributing to Fas-mediated resistance in CLL. *Blood* 112: 394-397.
  25. Li, F. J., Y. Kubagawa, M. K. McCollum, L. Wilson, T. Motohashi, L. F. Bertoli, J. C. Barton, S. Barnes, R. S. Davis, and H. Kubagawa. 2011. Enhanced levels of both the membrane-bound and soluble forms of IgM Fc receptor (FcmuR) in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118: 4902-4909.
  26. Hitoshi, Y., J. Lorens, S. I. Kitada, J. Fisher, M. LaBarge, H. Z. Ring, U. Francke, J. C. Reed, S. Kinoshita, and G. P. Nolan. 1998. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* 8: 461-471.
  27. Nguyen, X. H., P. A. Lang, K. S. Lang, D. Adam, G. Fattakhova, N. Foger, M. A. Kamal, P. Prilla, S. Mathieu, C. Wagner, T. Mak, A. C. Chan, and K. H. Lee. 2011. Toso regulates the balance between apoptotic and nonapoptotic death receptor signaling by facilitating RIP1 ubiquitination. *Blood* 118: 598-608.
  28. Honjo, K., Y. Kubagawa, and H. Kubagawa. 2012. Is Toso an antiapoptotic protein or an Fc receptor for IgM? *Blood* 119: 1789-1790.

29. Murakami, Y., S. Narayanan, S. Su, R. Childs, K. Krzewski, F. Borrego, J. Weck, and J. E. Coligan. 2012. Toso, a functional IgM receptor, is regulated by IL-2 in T and NK cells. *J Immunol* 189: 587-597.
30. Ouchida, R., H. Mori, H. Ohno, and J. Y. Wang. 2013. FcμR (Toso/Faim3) is not an inhibitor of Fas-mediated cell death in mouse T and B cells. *Blood* 121: 2368-2370.
31. Nguyen, X. H., G. Fattakhova, P. A. Lang, K. S. Lang, D. Adam, N. Foger, and K. H. Lee. 2012. Antiapoptotic function of Toso (Faim3) in death receptor signaling. *Blood* 119: 1790-1791.
32. Mota, M. M., G. Pradel, J. P. Vanderberg, J. C. Hafalla, U. Frevert, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, and A. Rodriguez. 2001. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 291: 141-144.
33. Tuteja, R. 2007. Malaria - an overview. *The FEBS journal* 274: 4670-4679.
34. Crompton, P. D., S. K. Pierce, and L. H. Miller. 2010. Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of clinical investigation* 120: 4168-4178.
35. Chakravarty, S., I. A. Cockburn, S. Kuk, M. G. Overstreet, J. B. Sacci, and F. Zavala. 2007. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nature medicine* 13: 1035-1041.
36. Weiss, W. R., M. Sedegah, R. L. Beaudoin, L. H. Miller, and M. F. Good. 1988. CD8<sup>+</sup> T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 573-576.
37. Seguin, M. C., F. W. Klotz, I. Schneider, J. P. Weir, M. Goodbary, M. Slayter, J. J. Raney, J. U. Aniagolu, and S. J. Green. 1994. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8<sup>+</sup> T cells. *The Journal of experimental medicine* 180: 353-358.
38. Butler, N. S., N. W. Schmidt, and J. T. Harty. 2010. Differential effector pathways regulate memory CD8 T cell immunity against Plasmodium berghei versus P. yoelii sporozoites. *J Immunol* 184: 2528-2538.
39. Trimmell, A., A. Takagi, M. Gupta, T. L. Richie, S. H. Kappe, and R. Wang. 2009. Genetically attenuated parasite vaccines induce contact-dependent CD8<sup>+</sup> T cell killing of Plasmodium yoelii liver stage-infected hepatocytes. *J Immunol* 183: 5870-5878.
40. Klotz, F. W., L. F. Scheller, M. C. Seguin, N. Kumar, M. A. Marletta, S. J. Green, and A. F. Azad. 1995. Co-localization of inducible-nitric oxide synthase and Plasmodium berghei in hepatocytes from rats immunized with irradiated sporozoites. *J Immunol* 154: 3391-3395.
41. Depinay, N., J. F. Franetich, A. C. Gruner, M. Mauduit, J. M. Chavatte, A. J. Luty, G. J. van Gemert, R. W. Sauerwein, J. M. Siksik, L. Hannoun, D. Mazier, G. Snounou, and L. Renia. 2011. Inhibitory effect of TNF-alpha on malaria pre-erythrocytic stage development: influence of host hepatocyte/parasite combinations. *PloS one* 6: e17464.
42. Terzakis, J. A., J. P. Vanderberg, D. Foley, and S. Shustak. 1979. Exoerythrocytic merozoites of Plasmodium berghei in rat hepatic Kupffer cells. *The Journal of protozoology* 26: 385-389.
43. Sturm, A., R. Amino, C. van de Sand, T. Regen, S. Retzlaff, A. Rennenberg, A. Krueger, J. M. Pollok, R. Menard, and V. T. Heussler. 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313: 1287-1290.
44. Krishnegowda, G., A. M. Hajjar, J. Zhu, E. J. Douglass, S. Uematsu, S. Akira, A. S. Woods, and D. C. Gowda. 2005. Induction of proinflammatory responses in

- macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *The Journal of biological chemistry* 280: 8606-8616.
45. Parroche, P., F. N. Lauw, N. Goutagny, E. Latz, B. G. Monks, A. Visintin, K. A. Halmen, M. Lamphier, M. Olivier, D. C. Bartholomeu, R. T. Gazzinelli, and D. T. Golenbock. 2007. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1919-1924.
  46. Cohen, S., G. I. Mc, and S. Carrington. 1961. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 192: 733-737.
  47. Rovira-Vallbona, E., G. Moncunill, Q. Bassat, R. Aguilar, S. Machevo, L. Puyol, L. Quinto, C. Menendez, C. E. Chitnis, P. L. Alonso, C. Dobano, and A. Mayor. 2012. Low antibodies against *Plasmodium falciparum* and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children: a case-control study. *Malaria journal* 11: 181.
  48. Villegas-Mendez, A., R. Greig, T. N. Shaw, J. B. de Souza, E. Gwyer Findlay, J. S. Stumhofer, J. C. Hafalla, D. G. Blount, C. A. Hunter, E. M. Riley, and K. N. Couper. 2012. IFN-gamma-producing CD4<sup>+</sup> T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8<sup>+</sup> T cell accumulation within the brain. *J Immunol* 189: 968-979.
  49. Yanez, D. M., D. D. Manning, A. J. Cooley, W. P. Weidanz, and H. C. van der Heyde. 1996. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J Immunol* 157: 1620-1624.
  50. Potter, S., T. Chan-Ling, H. J. Ball, H. Mansour, A. Mitchell, L. Maluish, and N. H. Hunt. 2006. Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *International journal for parasitology* 36: 485-496.
  51. Haque, A., S. E. Best, K. Unosson, F. H. Amante, F. de Labastida, N. M. Anstey, G. Karupiah, M. J. Smyth, W. R. Heath, and C. R. Engwerda. 2011. Granzyme B expression by CD8<sup>+</sup> T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 186: 6148-6156.
  52. Monso-Hinard, C., J. N. Lou, C. Behr, P. Juillard, and G. E. Grau. 1997. Expression of major histocompatibility complex antigens on mouse brain microvascular endothelial cells in relation to susceptibility to cerebral malaria. *Immunology* 92: 53-59.
  53. Rowe, J. A., J. Shafi, O. K. Kai, K. Marsh, and A. Raza. 2002. Nonimmune IgM, but not IgG binds to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and correlates with rosetting and severe malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 66: 692-699.
  54. Czajkowsky, D. M., A. Salanti, S. B. Ditlev, Z. Shao, A. Ghumra, J. A. Rowe, and R. J. Pleass. 2010. IgM, Fc mu Rs, and malarial immune evasion. *J Immunol* 184: 4597-4603.
  55. Harte, P. G., A. Cooke, and J. H. Playfair. 1983. Specific monoclonal IgM is a potent adjuvant in murine malaria vaccination. *Nature* 302: 256-258.
  56. Miller, L. H., H. C. Ackerman, X. Z. Su, and T. E. Wellems. 2013. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature medicine* 19: 156-167.
  57. Nussenzweig, R. S., J. Vanderberg, H. Most, and C. Orton. 1967. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *plasmodium berghei*. *Nature* 216: 160-162.

58. Mueller, A. K., M. Labaied, S. H. Kappe, and K. Matuschewski. 2005. Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* 433: 164-167.
59. Nagel, A., M. Prado, A. Heitmann, S. Tartz, T. Jacobs, C. Deschermeier, S. Helm, R. Stanway, and V. Heussler. 2013. A new approach to generate a safe double-attenuated Plasmodium liver stage vaccine. *International journal for parasitology* 43: 503-514.
60. Coppi, A., R. Natarajan, G. Pradel, B. L. Bennett, E. R. James, M. A. Roggero, G. Corradin, C. Persson, R. Tewari, and P. Sinnis. 2011. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *The Journal of experimental medicine* 208: 341-356.
61. Olotu, A., J. Lusingu, A. Leach, M. Lievens, J. Vekemans, S. Msham, T. Lang, J. Gould, M. C. Dubois, E. Jongert, P. Vansadia, T. Carter, P. Njuguna, K. O. Awuondo, A. Malabeja, O. Abdul, S. Gesase, N. Mturi, C. J. Drakeley, B. Savarese, T. Villafana, D. Lapierre, W. R. Ballou, J. Cohen, M. M. Lemnge, N. Peshu, K. Marsh, E. M. Riley, L. von Seidlein, and P. Bejon. 2011. Efficacy of RTS,S/AS01E malaria vaccine and exploratory analysis on anti-circumsporozoite antibody titres and protection in children aged 5-17 months in Kenya and Tanzania: a randomised controlled trial. *The Lancet infectious diseases* 11: 102-109.
62. Guermonprez, P., N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. Ricciardi-Castagnoli, N. Guiso, D. Ladant, and C. Leclerc. 2001. The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine* 193: 1035-1044.
63. Gueirard, P., A. Druilhe, M. Pretolani, and N. Guiso. 1998. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during Bordetella pertussis infection in vivo. *Infection and immunity* 66: 1718-1725.
64. Friedman, R. L., R. L. Fiederlein, L. Glasser, and J. N. Galgiani. 1987. Bordetella pertussis adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infection and immunity* 55: 135-140.
65. Tartz, S., H. Russmann, J. Kamanova, P. Sebo, A. Sturm, V. Heussler, B. Fleischer, and T. Jacobs. 2008. Complete protection against P. berghei malaria upon heterologous prime/boost immunization against circumsporozoite protein employing Salmonella type III secretion system and Bordetella adenylate cyclase toxoid. *Vaccine* 26: 5935-5943.
66. Tartz, S., C. Deschermeier, S. Retzlaff, V. Heussler, P. Sebo, B. Fleischer, and T. Jacobs. 2013. Plasmodium berghei sporozoite challenge of vaccinated BALB/c mice leads to the induction of humoral immunity and improved function of CD8(+) memory T cells. *European journal of immunology* 43: 693-704.
67. Mackova, J., J. Stasikova, L. Kutinova, J. Masin, P. Hainz, M. Simsova, P. Gabriel, P. Sebo, and S. Nemeckova. 2006. Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 55: 39-46.
68. Tartz, S., J. Kamanova, M. Simsova, P. Sebo, S. Bolte, V. Heussler, B. Fleischer, and T. Jacobs. 2006. Immunization with a circumsporozoite epitope fused to Bordetella pertussis adenylate cyclase in conjunction with cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade confers protection against Plasmodium berghei liver-stage malaria. *Infection and immunity* 74: 2277-2285.
69. Crispe, I. N. 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nature reviews. Immunology* 3: 51-62.

70. Wong, P., and E. G. Pamer. 2003. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annual review of immunology* 21: 29-70.
71. Osicka, R., A. Osickova, T. Basar, P. Guermonprez, M. Rojas, C. Leclerc, and P. Sebo. 2000. Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by Bordetella pertussis adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infection and immunity* 68: 247-256.
72. Christensen, J. P., S. O. Kauffmann, and A. R. Thomsen. 2003. Deficient CD4+ T cell priming and regression of CD8+ T cell functionality in virus-infected mice lacking a normal B cell compartment. *J Immunol* 171: 4733-4741.
73. Arnaout, M. A. 1990. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1050.
74. Jacobson, A. C., K. M. Roundy, J. J. Weis, and J. H. Weis. 2009. Regulation of murine splenic B cell CR3 expression by complement component 3. *J Immunol* 183: 3963-3970.
75. Leung, C. S., M. A. Maurer, S. Meixlsperger, A. Lippmann, C. Cheong, J. Zuo, T. A. Haigh, G. S. Taylor, and C. Munz. 2013. Robust T-cell stimulation by Epstein-Barr virus-transformed B cells after antigen targeting to DEC-205. *Blood* 121: 1584-1594.
76. Shah, S., A. A. Divekar, S. P. Hilchey, H. M. Cho, C. L. Newman, S. U. Shin, H. Nechustan, P. M. Challita-Eid, B. M. Segal, K. H. Yi, and J. D. Rosenblatt. 2005. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 117: 574-586.
77. Inoue, S., W. W. Leitner, B. Golding, and D. Scott. 2006. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer research* 66: 7741-7747.
78. Bar-Or, A., L. Fawaz, B. Fan, P. J. Darlington, A. Rieger, C. Ghorayeb, P. A. Calabresi, E. Waubant, S. L. Hauser, J. Zhang, and C. H. Smith. 2010. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Annals of neurology* 67: 452-461.
79. deWalick, S., F. H. Amante, K. A. McSweeney, L. M. Randall, A. C. Stanley, A. Haque, R. D. Kuns, K. P. MacDonald, G. R. Hill, and C. R. Engwerda. 2007. Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 178: 6033-6037.
80. Piva, L., P. Tetlak, C. Claser, K. Karjalainen, L. Renia, and C. Ruedl. 2012. Cutting edge: Clec9A+ dendritic cells mediate the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 189: 1128-1132.
81. Liu, Y., Y. Chen, Z. Li, Y. Han, Y. Sun, Q. Wang, B. Liu, and Z. Su. 2013. Role of IL-10-producing regulatory B cells in control of cerebral malaria in Plasmodium berghei-infected mice. *European journal of immunology*.
82. Grau, G. E., H. Heremans, P. F. Piguet, P. Pointaire, P. H. Lambert, A. Billiau, and P. Vassalli. 1989. Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 5572-5574.
83. Legorreta-Herrera, M., R. O. Meza, and L. Moreno-Fierros. 2010. Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of Plasmodium-infected CBA/Ca mice. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010: 198921.

## 7. Anhang

### 7.1 Zusammenfassung

Der Fc $\mu$ R, auch als Toso oder Faim3 bezeichnet, ist der einzige bekannte Fc-Rezeptor mit exklusiver Spezifität für IgM (13, 16). Er wird stark auf B-Zellen exprimiert, die in Mäusen den einzigen Zelltyp mit einer hohen Expression des Fc $\mu$ R darstellen (13, 18). Fc $\mu$ R vermittelte Signale beeinflussen die B-Zell-Aktivierung. Dies wurde gezeigt durch Studien, in denen anti-Fc $\mu$ R Antikörper bzw. Fc $\mu$ R ko Mäuse verwendet wurden und ein Effekt auf die B-Zell-Proliferation und das Überleben festgestellt wurde (22). Des Weiteren wurde eine Funktion von natürlichen Antikörpern als Adjuvantien bei der vakzineinduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen Leishmanien gezeigt (9).

In dieser Arbeit wurde ein potentieller Einfluss der Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort bei der experimentellen Malaria-Vakzinierung und –Infektion untersucht. In dem Vakzinierungsmodell detektieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen infizierte Hepatozyten und üben antiparasitäre Funktionen aus, während sie bei der Blutphaseninfektion eine zerebrale Pathologie vermitteln.

Zur Vakzinierung wurde eine detoxifizierte Variante des Adenylatzyklasetoxoids verwendet, die ein CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitop des *Plasmodium* Circumsporozoitenproteins, eines Leberphasenantigens, enthält. In vakzinierten Mäusen, die mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelt wurden, kam es zu einer höheren Induktion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen als in Kontrolltieren. Die induzierten Zellen waren funktional. Dies konnte durch die Senkung der Parasitenlast in der Leber nach einer Infektion mit Sporozoiten bei den mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren gezeigt werden. In Experimenten mit B-Zell-defizienten Mäusen konnte jedoch keine verstärkte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort bei Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper beobachtet werden, was darauf hinweist, dass B-Zellen als Mediatoren des stimulatorischen Effektes fungierten. Zudem war die Expression des Aktivierungsmarkers CD86 in mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäusen erhöht, was auf eine höhere Aktivierung der B-Zellen in diesen Mäusen hindeutet. Diese Ergebnisse weisen auf eine agonistische Wirkung des Antikörpers hin, da gezeigt wurde, dass die Expression des Fc $\mu$ R die Aktivierung stimulatorischer intrazellulärer Signalwege, wie die

des NF- $\kappa$ B Signalwegs, mediiert werden kann (27). Eine direkte Funktion von B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Bei der Malaria-Blutphaseninfektion der für die Entwicklung experimenteller zerebraler Malaria suszeptiblen C57BL/6 Mäuse mit *Plasmodium berghei* ANKA führte die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörper zu einer Verschlimmerung der Erkrankung. Die erhöhte Inzidenz zerebraler Symptome von mit anti-Fc $\mu$ R Antikörper behandelten Mäusen wurde von einer erhöhten Akkumulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Gehirnen dieser Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren begleitet. Fc $\mu$ R ko Mäuse waren suszeptibel für die Entwicklung einer zerebralen Pathologie. Dies zeigt, dass Fc $\mu$ R vermittelte Signale nicht ursächlich an der Entwicklung einer zerebralen Pathologie beteiligt sind, aber dennoch die Stärke einer bestehenden Entzündung, die von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mediiert wird, beeinflussen können.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern in den Modellen der experimentellen Malaria-Vakzinierung und –Infektion zu einer verstärkten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort führt. Das Fehlen eines stimulatorischen Effekts in B-Zell-defizienten Mäusen zeigt, dass B-Zellen diesen Effekt vermittelten und durch den Fc $\mu$ R vermittelte Signale bei der Interaktion zwischen B- und T-Zellen eine Rolle spielen. Die Ergebnisse implizieren, dass sich die Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern in anderen Infektions- und Vakzinierungsmodellen, in denen CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Vermittlung eines Schutzes benötigt werden, als vorteilhaft erweisen könnte.

Ein positiver Effekt der Applikation von anti-Fc $\mu$ R Antikörpern auf CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten im Menschen ist ebenfalls denkbar, weil auch hier eine starke Expression des Fc $\mu$ R auf B-Zellen vorliegt. Eine direkte Vergleichbarkeit mit dem Mausmodell ist jedoch möglicherweise nicht gegeben, da im Menschen der Einfluss der anti-Fc $\mu$ R Behandlung aufgrund der endogenen Fc $\mu$ R Expression der humanen T-Zellen unterschiedlich ausfallen könnte.

## 7.2 Summary

The Fc $\mu$ R, also known as Toso or Faim3, is the only known exclusive Fc receptor specific for IgM (13, 16). It is highly expressed on B cells, the only cell type in mice expressing Fc $\mu$ R at high amounts (13, 18). Fc $\mu$ R mediated signals influence B cell activation, as studies with Fc $\mu$ R ko mice or anti-Fc $\mu$ R antibodies indicate an influence on B cell proliferation and survival (22). Furthermore, natural antibodies have been shown to have adjuvant function in vaccination-induced CD8<sup>+</sup> T cell responses in the model of experimental leishmaniasis (9).

In this study, a potential influence of the application of anti-Fc $\mu$ R antibody on the CD8<sup>+</sup> T cell response in experimental malaria vaccination and infection was investigated. In the vaccination model, CD8<sup>+</sup> T cells detect infected hepatocytes and exert antiparasitic functions, whereas they mediate cerebral pathology in the malaria blood stage infection.

For vaccination, the detoxified adenylate cyclase toxoid containing a CD8<sup>+</sup> T cell epitope of the *Plasmodium* circumsporozoite protein, a liver stage antigen, was used. In vaccinated mice treated with an anti-Fc $\mu$ R antibody, there was a higher induction of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells than in control animals. These cells were functional, as upon infection with sporozoites, the liver parasite burden was reduced in anti-Fc $\mu$ R antibody treated mice in comparison to control mice. However, in vaccination experiments with B cell deficient mice, the application of anti-Fc $\mu$ R antibody did not enhance the induced CD8<sup>+</sup> T cell response, suggesting that B cells acted as the mediators of the stimulatory effect on the CD8<sup>+</sup> T cell response. The expression of the activation marker CD86 was enhanced on B cells after anti-Fc $\mu$ R antibody treatment, suggesting that B cells were more activated in those mice. These findings suggest that the anti-Fc $\mu$ R antibody might exert its effects via an agonistic mechanism, as the expression of Fc $\mu$ R can mediate an activation of intracellular signaling pathways like the NF- $\kappa$ B pathway (27). A direct function of B cells as antigen presenting cells, however, was not observed.

In the malaria *Plasmodium berghei* ANKA blood stage infection of C57BL/6 mice, which are susceptible to the development of experimental cerebral malaria, the application of anti-Fc $\mu$ R antibody exacerbated the disease. The enhanced incidence of cerebral symptoms in anti-Fc $\mu$ R antibody treated mice was accompanied by an enhanced accumulation of activated CD8<sup>+</sup> T cells in the brains of these mice compared to control animals. Fc $\mu$ R ko mice were susceptible to the development of cerebral pathology. This indicates that Fc $\mu$ R mediated

effects are not required for the development of cerebral pathology, but nevertheless can influence the severity of an ongoing inflammation mediated by CD8<sup>+</sup> T cells.

Taken together, it could be shown that anti-Fc $\mu$ R antibody treatment leads to an enhanced CD8<sup>+</sup> T cell response in the models of malaria vaccination and infection. The lack of a stimulatory effect in B cell deficient mice indicates that B cells were mediating this effect and that signals mediated by the Fc $\mu$ R play a role in the interaction between B and T cells. The results indicate that the treatment with anti-Fc $\mu$ R antibodies might be beneficial in other infection or vaccination models where CD8<sup>+</sup> T cells are required for protection.

A positive effect of the application of anti-Fc $\mu$ R antibodies on CD8<sup>+</sup> T cell responses in humans might also be possible, as human B cells also express high amounts of the Fc $\mu$ R. A direct comparison to the murine model can, however, possibly not be drawn as in humans, the influence of anti-Fc $\mu$ R treatment might be different due to the endogenous Fc $\mu$ R expression by human T cells.