

Untersuchung koinhibitorischer Moleküle in der humanen Malaria

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Annemieke Abel

Hamburg, September 2016

Diese Arbeit wurde in der Laborgruppe von Priv.-Doz. Dr. Thomas Jacobs am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin angefertigt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Julia Kehr

Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

Biozentrum Klein Flottbek

Molekulare Pflanzengenetik

Ohnhorststraße 18

22609 Hamburg

2. Gutachter:

Priv.-Doz. Dr. Thomas Jacobs

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Abteilung Immunologie

Bernhard-Nocht-Straße 74

20359 Hamburg

Disputationstermin: 16.12.2016

Hamburg, den 02.01.2017

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.

Hamburg, den 02.01.2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'A. All'.

Unterschrift

Abkürzungen

(D)PBS	(Dulbecco's) Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACT	Artemisinin-basierte Kombinationstherapie
AIH	Autoimmunhepatitis
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSP	<i>Plasmodium falciparum-derived circumsporozoite protein</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grb-2	<i>Growth Factor1 Receptor Bound Protein 2</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBsAG	Hepatitis-B-Virus Oberflächenantigen
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICAM1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon

IL	Interleukin
iRBC	infizierte rote Blutkörperchen
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i>
ITSM	<i>Immuno Tyrosine-Based Switch Motif</i>
Ki-67	Kiel-67
L	Liter
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
MACS	<i>Magnetic activated cell separation</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute
mL	Milliliter
ng	Nanogramm
NK Zelle	Natürliche Killer Zelle
NO	Stickstoffmonoxid
OPD	<i>Outpatient department</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBC	<i>Primär biliäre Cholangitis</i>
PBMC	mononukleäre Zelle aus dem peripheren Blut
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>P. falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Hydrogen Ionen
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PSC	<i>Primär sklerosierende Cholangitis</i>
RBC/RBZ	Rotes Blutkörperchen (Erythrozyt)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
(c)RPMI	(komplettes) Zellkulturmedium „Roswell Park Memorial Institute“
SEM	Standardfehler

SHP-1/2	<i>Src Homology 2 Domain Containing Phosphatase 1/2</i>
SPICE	<i>Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
Tab.	Tabelle
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
T _H	T-Helferzelle
TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
Tim-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Tr1 Zelle	Regulatorische T-Zelle Typ 1
TZR	T-Zell-Rezeptor
WHO	<i>World health organization</i>
ZM	Zerebrale Malaria
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
α	anti-
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter

Danksagung

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

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Julia Kehr für ihre Bereitschaft die Begutachtung meiner Arbeit zu übernehmen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. Christoph Schramm und PD Dr. Julian Schulze zur Wiesch für die Bereitstellung von Proben und die Betreuung im Graduiertenkolleg bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei allen Teilnehmern der Studie, seien es Patienten oder gesunde Probanden, bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die Bereitstellung von *Plasmodium falciparum* Kulturen danke ich Ann-Katrin Ullrich.

Auch meinen Kollegen im Labor danke ich herzlich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und ihre große Hilfsbereitschaft. Hervorheben möchte ich dabei Dr. Maria Mackroth für die Einarbeitung in das Projekt und ihre große Unterstützung, Christiane Steeg für ihre ständige Hilfsbereitschaft vor allem auch während des Projektes in Ghana sowie Birgit Hüsing und Hannes Michelsen für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mit uns zusammen in die in Ghana durchgeführte Teilstudie involviert waren. Besonders hervorheben möchte ich hier Ellis Owusu-Dabo, Francis Aminkiah, Eric Fomevor und Isaac Boakye.

Ein großer Dank geht auch an meine Familie und insbesondere an meine Eltern, die mich jederzeit mit allen möglichen Mitteln unterstützt haben und ohne die eine solch lange Ausbildungszeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	2
1.2	Koinhibitorische Rezeptoren	4
1.2.1	CTLA-4	6
1.2.2	PD-1	7
1.2.3	LAG-3	8
1.2.4	Tim-3	9
1.2.5	BTLA	9
1.2.6	TIGIT	11
1.2.7	Tr1 Zellen	12
1.3	Malaria	12
1.3.1	Der <i>Plasmodium falciparum</i> Lebenszyklus	13
1.3.2	Krankheitsbild und Behandlung	15
1.3.3	Die Immunantwort auf Infektionen mit Plasmodien und Pathologie	17
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material	20
2.1	Laborgeräte	20
2.2	Glas- und Plastikwaren	21
2.3	Chemikalien	21
2.4	Material für zellbiologische Arbeiten	22
2.4.1	Reagenzien für zellbiologische Arbeiten	22
2.4.2	Kits für zellbiologische Arbeiten	22
2.5	Kulturmedium, Puffer und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten	23
2.6	Antikörper für die Durchflusszytometrie	24
2.7	Arbeiten mit Vollblut	25
2.7.1	Materialien für Arbeiten mit Vollblut	25
2.7.2	Probanden	25
2.7.3	Ethik	28
2.8	Software	28

3	Methoden.....	29
3.1	Zellbiologische Methoden.....	29
3.1.1	Isolation von humanen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut.....	29
3.1.2	Aufreinigung humaner CD4 ⁺ T-Zellen	29
3.1.3	Durchflusszytometrie	29
3.1.4	Isolierung humaner CD4 ⁺ PD-1 ⁺ Zellen.....	30
3.1.5	Proliferationsversuche.....	31
3.1.6	Herstellung von Schizontenextrakt	31
3.1.7	Bestimmung von Zytokinkonzentrationen im Plasma	32
3.2	Diagnostische Methoden.....	32
3.2.1	Malaria Schnelltest.....	32
3.2.2	Ermittlung der Parasitämie.....	32
3.3	Statistische Analysen.....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Hierarchisches Expressionsmuster der Koinhibitoren.....	34
4.2	Erhöhte Expression von Koinhibitoren auf CD4⁺ T-Zellen in <i>Pf</i> Malaria	36
4.3	CD4⁺ T-Zellen in der <i>Pf</i> Malaria weisen einen aktivierten Phänotyp auf	38
4.4	Der Grad der Koexpression ist abhängig von der Schwere der Symptome einer <i>Pf</i> Malaria.....	40
4.5	Unterschiedliche Kinetik der Expressionsmuster der Koinhibitoren	41
4.6	Erhöhte Zytokinspiegel im Plasma von Patienten mit <i>Pf</i> Malaria.....	43
4.7	PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen supprimieren autologe CD4⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>.....	45
4.8	CD4⁺ T-Zellen in der <i>Pf</i> Malaria weisen einen zytotoxischen Phänotyp auf.....	47
4.9	Keine Induktion von CD49b während der <i>Pf</i> Malaria	49
4.10	LAG-3 und Tim-3 zeigen ihre höchste Induktion in milder <i>Pf</i> Malaria, PD-1 und CTLA-4 werden in Infektionen mit schwereren Symptomen höher exprimiert	51
4.11	Korrelation zwischen Parasitämie und PD-1⁺ sowie CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen.....	55
4.12	Höhere Expression von Aktivierungsmarkern von CD4⁺ T-Zellen in milder <i>Pf</i> Malaria als in Infektionen mit schwereren Symptomen	56
4.13	Keine Unterschiede in den Plasma Zytokin Spiegel von milder oder schwererer <i>Pf</i> Malaria.....	58

5	<i>Diskussion</i>	59
5.1	Erhöhte Expression von Koinhibitoren und Aktivierungsmarkern während der <i>Pf</i> Malaria	59
5.2	Suppression CTLA-4+PD-1+ CD4+ T-Zellen auf autologe CD4+ T-Zellen	66
5.3	Abwesenheit von CD49b auf CD4+ T-Zellen in der <i>Pf</i> Malaria	67
5.4	Expression von Koinhibitoren in Abhängigkeit von der Schwere der Symptome.....	69
5.5	Modell	72
5.6	Ausblick	73
6	<i>Literatur</i>	75
7	<i>Anhang</i>	85
7.1	Zusammenfassung.....	85
7.2	Summary.....	86

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: In dieser Arbeit untersuchte koinhibitorische Moleküle und deren Liganden.</i>	6
<i>Abb. 2: Weltweite Verbreitung von Malariainfektionen.</i>	13
<i>Abb. 3: Lebenszyklus von Plasmodium falciparum.</i>	15
<i>Abb. 4: Hierarchisches Expressionsmuster der koinhibitorischen Rezeptoren während einer Pf Malaria.</i>	35
<i>Abb. 5: Malaria-spezifische hohe Expression von PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 auf CD3⁺CD4⁺ T-Zellen.</i>	37
<i>Abb. 6: CD3⁺CD4⁺ T-Zellen weisen während der Pf Malaria eine hohe Aktivierung auf.</i>	39
<i>Abb. 7: Höhere Koexpression von Koinhibitoren in schwerer Malaria als in milder Malaria in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.</i>	41
<i>Abb. 8: Koinhibitorische Rezeptoren weisen eine unterschiedliche Kinetik auf.</i>	42
<i>Abb. 9: Höhere Zytokin Konzentrationen im Plasma von Pf Malaria Patienten als von Kontrollen.</i>	44
<i>Abb. 10: PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen inhibieren die Proliferation von autologen CD4⁺ T-Zellen.</i>	46
<i>Abb. 11: Hohe Expression von zytotoxischen Markern in CD4⁺ T-Zellen in der Pf Malaria.</i>	48
<i>Abb. 12: Koinhibitoren sind angereichert in CD25-CD127⁻ CD4⁺ T- Zellen.</i>	50
<i>Abb. 13: Charakterisierung der für die Ghana Studie rekrutierten Probanden.</i>	52
<i>Abb. 14: Malaria Erkrankungen mit milden Symptomen führen zu einer hohen Induktion von LAG-3 und Tim-3 wohingegen PD-1 und CTLA-4 in der Pf Malaria mit schwereren Symptomen höher induziert werden.</i>	54
<i>Abb. 15: Prozente an PD-1⁺ und CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen korrelieren mit der Parasitämie.</i>	55
<i>Abb. 16: Aktivierungsmarker werden in milder Pf Malaria höher induziert als in schwereren Infektionen.</i>	57
<i>Abb. 17: Die Plasma Zytokin Level unterscheiden sich zwischen symptomfreien Gruppen und Gruppen, die mit Pf infiziert sind.</i>	58
<i>Abb. 18: Modell zu der Regulierung von T-Zellen während der Pf Malaria.</i>	73

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Laborgeräte</i>	20
<i>Tab. 2: Glas- und Plastikwaren</i>	21
<i>Tab. 3: Reagenzien für zellbiologische Arbeiten</i>	22
<i>Tab. 4: Kits für zellbiologische Arbeiten</i>	22
<i>Tab. 5: Kulturmedien, Puffer und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten</i>	23
<i>Tab. 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie</i>	24
<i>Tab. 7: Materialien für Arbeiten mit Vollblut</i>	25
<i>Tab. 8: In die Analyse der Koinhibitoren und Aktivierungsmarker eingeschlossenen Pf Malaria Patienten.</i>	26
<i>Tab. 9: In die Analyse potentieller Zytotoxizität eingeschlossenen Pf Malaria Patienten.</i>	26
<i>Tab. 10: In die Analyse von Tr1 Zellen eingeschlossenen Pf Malaria Patienten.</i>	27
<i>Tab. 11: Software</i>	28
<i>Tab. 12: Überblick der deskriptiven Daten der eingeschlossenen Probanden.</i>	52

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Wort „immunis“ kommt aus dem Lateinischen und bedeutet „frei sein von“ (SCHÜTT & BRÖKER, 2011). Der heute gebräuchliche Begriff Immunität leitet sich von dieser Bezeichnung ab. Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor eindringenden Pathogenen wie Bakterien, Pilze und Viren aber auch vor entarteten körpereigenen Zellen zu schützen und diese abzuwehren. Von großer Bedeutung ist dabei die Entscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd. Zellen, die körpereigen sind, müssen toleriert werden, körperfremde Zellen wie Pathogene müssen dagegen bekämpft werden. Essentiell ist bei diesem Vorgang eine genaue Feinabstimmung der Aktivierung des Immunsystems. Das Immunsystem besteht aus drei großen Elementen; frei bewegliche Zellen, lösliche Serumbestandteile und lymphatische Organe. Diese Elemente werden den zwei großen Komponenten des Immunsystems zugeordnet: dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem hat die wichtige Aufgabe, Pathogene sofort nach deren Eindringen in den Körper durch die mechanischen Barrieren wie die Haut oder Schleimhäute zu bekämpfen. Die zellulären und humoralen Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems versuchen die Verbreitung des eingedrungenen Pathogens zu verhindern und verschaffen auf diese Weise der Aktivierung des adaptiven Immunsystems Zeit. Die wichtigsten Komponenten des angeborenen Immunsystems sind phagozytierende Zellen. Zu den phagozytierenden Zellen gehören Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die sich im Bindegewebe und in verschiedenen Organen wie der Milz, der Leber und der Lunge befinden. Phagozytierende Zellen erkennen Pathogene an deren stark konservierten molekularen Oberflächenstrukturen, den *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Diese PAMPs werden von *Pattern*

Einleitung

recognition receptors (PRRs) erkannt. Nach erfolgter Bindung von PRRs an PAMPs werden die phagozytierenden Zellen aktiviert, sie können die Pathogene phagozytieren. Die Phagozytose ist ein Vorgang, bei dem markierte Pathogene von phagozytierenden Zellen aufgenommen und durch toxische Radikalverbindungen abgetötet werden. Neben der Phagozytose besitzen Makrophagen noch weitere Effektormechanismen. So können sie pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL-) 6 und IL-1 ausschütten, die Entzündungsreaktionen unterstützen und so eine weitere Immunreaktion vorantreiben. Einer der initiierten Immunmechanismen ist das Komplementsystem. Es besteht vornehmlich aus löslichen Serumbestandteilen und aktiviert neutrophile Granulozyten, Phagozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zelltypen töten Pathogene zum Beispiel durch Induktion von Apoptose durch die Ausschüttung zytotoxischer Granula aus. Eine weitere wichtige Aufgabe von phagozytierenden Zellen wie Dendritischen Zellen (DZ) ist die Antigen-Präsentation. Haben diese Zellen Pathogene phagozytiert, prozessieren sie diese intrazellulär und präsentieren Fragmente der Pathogene als Antigene über Haupthistokompatibilitätskomplexe II (*Major histocompatibility complex II*; MHC II). Über diese Antigenpräsentation können DZ das adaptive Immunsystem aktivieren und verbinden somit das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird durch das angeborene Immunsystem initiiert und hat die spezifische und selektive Erkennung von Pathogenen zur Aufgabe. Darüber hinaus steuert es die Feinabstimmung des Immunsystems und bildet den Erinnerungseffekt des Immunsystems. Die adaptive Komponente des Immunsystems besteht wie das angeborene Immunsystem aus zellulären und humoralen Mechanismen. Zu den Zelltypen des adaptiven Immunsystems gehören vor allem B- und T-Zellen, die humoralen Komponenten sind vor allem die von B-Zellen produzierten Antikörper. B- und T-Zellen entstammen den gleichen pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark, ihr jeweiliger Name entspricht dem Ort ihrer Reifung. B-Zellen reifen im Knochenmark aus (*bone marrow*), T-Zellen dagegen im Thymus. Die Reifung von B-Zellen durchläuft verschiedenen Stadien, die geprägt sind von der Umordnung

Einleitung

verschiedener Gene für den B-Zell-Rezeptor (BZR) und damit einhergehender Veränderungen der Gene des BZR. Hat der BZR seinen endgültigen Zustand erreicht, wandert die reife aber noch naive B-Zelle in periphere lymphatische Gewebe, um dort ihre Aufgaben zu erfüllen.

T-Zellen wandern dagegen für ihre Reifung in den Thymus. Im Thymus findet ein Kontakt zu Stroma Zellen statt, wodurch die unreifen T-Zellen differenzieren. Genau wie der BZR durchläuft auch der T-Zell-Rezeptor (TZR) im Zuge seiner Reifung verschiedene Umordnungen seiner Gene. Des Weiteren bildet sich während der T-Zell-Reifung der T-Zell-Rezeptor-Komplex aus. Der T-Zell-Rezeptor-Komplex besteht aus dem TZR selbst, dem Oberflächenmolekül *Cluster of differentiation* (CD) 3 und einem Korezeptor, der die Subklasse der T-Zellen bestimmt (CD4 oder CD8). Während der Reifung erfährt der T-Zell-Rezeptor-Komplex vor Eintritt in die Peripherie eine funktionelle Überprüfung. In dieser funktionellen Überprüfung, der positiven und der negativen Selektion, soll eine zu starke oder zu schwache Interaktion des Komplexes mit MHC-Molekülen von Zellen wie Epithelzellen oder Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) verhindert werden. Ist die Stärke der Interaktion nicht angemessen, führt dieses zu dem programmierten Zelltod der entsprechenden T-Zelle. Die Zellen, die diese Selektion überstehen, wandern in sekundäre lymphatische Organe, wo ihre endgültige Reifung durch den Kontakt zu APZ erfolgt.

B- und T-Zellen können sich darüber hinaus auch gegenseitig beeinflussen und ihre jeweilige Funktionalität verbessern. Wie bereits angedeutet, gibt es bei den T-Zellen verschiedene Subklassen. T-Zellen, die den Korezeptor CD4 tragen, werden T-Helferzellen (T_H) genannt. Sie sind in die Aktivierung von B-Zellen involviert. Bindet der TZR an ein Antigen, das von MHC II Molekülen auf APZ wie DZ, Makrophagen oder auch B-Zellen präsentiert wird, und erkennt dieses, so wird diese $CD4^+$ T-Zelle aktiviert. Auch bei den T_H -Zellen gibt es verschiedene Subklassen, die durch die Ausschüttung bestimmter Zytokine charakterisiert werden. Die zwei am besten untersuchten Subklassen sind die T_H1 - und die T_H2 -Zellen. T_H1 -Zellen produzieren nach Aktivierung vor allem Interferon- γ ($IFN-\gamma$) und aktivieren Makrophagen und die zytotoxischen, $CD8^+$ T-Zellen. T_H2 -Zellen dagegen produzieren vor allem IL-4 und IL-2 und hemmen so die Makrophagenaktivität. Zu den T-Helferzellen gehören auch regulatorische T-Zellen

Einleitung

(T_{reg}). Die Aufgabe von T_{regs} ist die Regulation oder Hemmung von Immunreaktionen. T_{regs} verhindern so überschießende inflammatorische Vorgänge mit einhergehenden Schädigungen von Organen oder Geweben des Wirts. Spezifisch für diese Subpopulation ist die Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead box P3* (FoxP3).

Neben $CD4^+$ T-Helferzellen gibt es auch $CD8^+$ T-Zellen, die auch zytotoxische T-Zellen genannt werden. $CD8^+$ T-Zellen erkennen Antigene, die auf MHC I Molekülen präsentiert werden. MHC I Moleküle werden auf jeder kernhaltigen Zelle des Organismus exprimiert und werden mit Antigenen aus dem Zytosol beladen. $CD8^+$ T-Zellen können einerseits Zytokine wie IFN- γ und TNF- α sekretieren und so Immunreaktionen vorantreiben. Andererseits können zytotoxische T-Zellen über die Ausschüttung von Effektormolekülen wie Perforin und Granzym B andere Zellen töten.

Neben der spezifischen Eliminierung von Pathogenen hat das adaptive Immunsystem eine weitere wichtige Aufgabe; das immunologische Gedächtnis. Dieses Gedächtnis besteht aus einer kleinen Anzahl zirkulierender Zellen, die während einer Immunantwort ausgereift wurden. Nach erfolgreicher Eliminierung des Pathogens verbleibt dieser kleine Teil der spezifischen Zellen im Organismus. Gelangt dasselbe Pathogen ein weiteres Mal in den Organismus, können diese spezifischen Gedächtniszellen schneller expandieren und das Pathogen effizient und frühzeitig beseitigen. Meist ist dieser Vorgang so schnell, dass es zu keiner Schädigung durch das Pathogen kommt. (KURTZ, 2004; GRAY, 2000; VEIGA-FERNANDES *et al.*, 2000) Diese Geschwindigkeit kommt zustande, da Aktivierung, Differenzierung und Proliferation der adaptiven Immunzellen durch die vorhandenen Gedächtniszellen nicht mehr nötig sind.

1.2 Koinhibitorische Rezeptoren

Eine vollständige Aktivierung von B- und T-Zellen erfordert drei Signale. Das erste Signal ist die bereits beschriebene Interaktion des TZR und einem auf MHC Molekülen präsentierten Peptid. Ein zweites Signal zur Aktivierung der Zellen erfolgt über kostimulatorische und koinhibitorische Moleküle. Das dritte Signal wird durch Zytokine vermittelt. Qualität, Quantität und Dauer der Immunantwort werden vor allem durch die

Einleitung

Balance zwischen stimulierenden und inhibitorischen, sekundären Signalen vermittelt (MURPHY *et al.*, 2006). Entfällt eines der drei Signale, kann keine korrekte Aktivierung der Zellen stattfinden, die hinreichende Balance zwischen protektiven Immunreaktionen und der Aufrechterhaltung von Toleranz und der Vermeidung von Autoimmun Reaktionen bleibt aus.

Das bedeutendste kostimulatorische Signal wird von der B7 Familie vermittelt. Zu dieser Familie gehören CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), die beide von CD28 gebunden werden. CD28 ist ein kostimulatorisches Molekül, das von T-Zellen exprimiert wird, CD80 und CD86 sind dazugehörige Liganden, die auf der Oberfläche von aktivierten DZ zu finden sind. Kommt eine CD28⁺, ausgereifte und unerfahrene T-Zelle in Kontakt mit CD80⁺ oder CD86⁺ APZ, so wird die T-Zelle durch dieses kostimulatorische Signal ebenfalls aktiviert. APZ exprimieren CD86 in geringem Maße konstitutiv, im Falle einer Infektion wird die Expression von CD86 jedoch stark hochreguliert. Dagegen wird CD80 etwas verzögert und erst einige Tage nach der Aktivierung der APZ verstärkt exprimiert. (WALUNAS *et al.*, 1994; HATHCOCK *et al.*, 1994)

Neben einigen Kostimulatoren gibt es auch viele Koinhibitoren. In der vorliegenden Arbeit wurden die koinhibitorischen Moleküle *Programmed cell death 1* (PD-1), *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4), *Lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3), *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3* (Tim-3), *B- and T-lymphocyte attenuator* (BTLA) und *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) thematisiert. Jedes der sechs Moleküle wird unter anderem von T-Zellen exprimiert und besitzt Liganden, die größtenteils auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden (Abb. 1). Im Folgenden werden diese koinhibitorischen Moleküle weiterführend beschrieben.

Einleitung

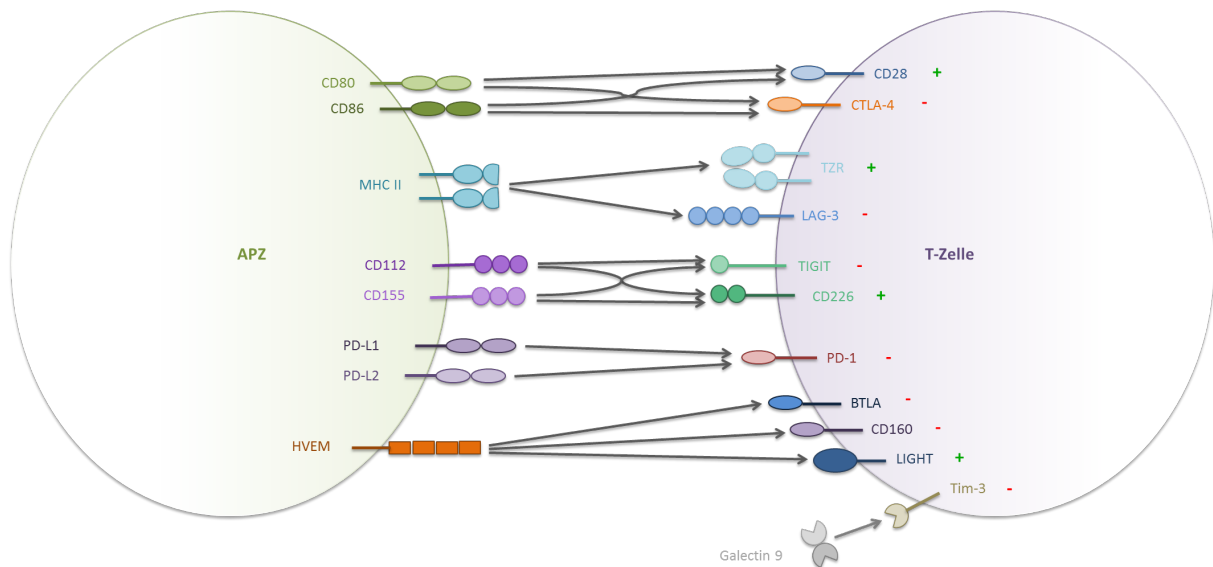


Abb. 1: In dieser Arbeit untersuchte koinhibitorische Moleküle und deren Liganden.

T-Zellen exprimieren eine große Anzahl koinhibitorischer Moleküle. Ihre Liganden werden größtenteils auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) exprimiert. In dieser Arbeit wurden die Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3, BTLA und TIGIT untersucht.

1.2.1 CTLA-4

Im Verlaufe der T-Zell-Aktivierung erfolgt eine Induktion des mit CD28 verwandten CTLA-4 (CD152). Aufgrund seiner höheren Affinität zu CD80 und CD86 verdrängt CTLA-4 CD28 von seinen Liganden. Im Gegensatz zu CD28 ist CTLA-4 jedoch ein koinhibitorisches Molekül, was die Aktivierung der T-Zelle inhibiert. In der Folge zeigt die T-Zelle eine verminderte Sensitivität, sie sekretiert weniger IL-2 und die klonale Expansion wird verringert. (WALUNAS *et al.*, 1996) CTLA-4 wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Eine besondere Eigenschaft von CTLA-4 ist die ständige Endozytose, die das Molekül erfährt. So befindet sich jedes CTLA-4-Molekül in einem ständigen Wechsel zwischen Zelloberfläche und intrazellulären Vesikeln (LINSLEY *et al.*, 1996). Die genauen Signalwege, die an der inhibitorischen Wirkung von CTLA-4 beteiligt sind, sind noch nicht genau verstanden. Bekannt ist lediglich, dass die Serin/Threonin Phosphatase PP2A in diesen Signalweg involviert ist (TEFT *et al.*, 2009). CTLA-4 defiziente T-Zellen zeigen eine verstärkte Proliferation und Zytokinproduktion, was die inhibitorische Funktion von CTLA-4 unterstreicht. CTLA-4^{-/-} Mäuse weisen lymphoproliferative Erkrankungen auf, die 2 bis 3 Wochen nach der Geburt tödlich enden. Darüber hinaus

Einleitung

spielt CTLA-4 eine wichtige Rolle in der Regulation peripherer Toleranz. Eine *in vivo* Blockade von CTLA-4 verbessert die Abwehr gegen Tumore und verschlimmert Autoimmun-Reaktionen. (rezensiert in SHARPE & FREEMAN, 2002)

1.2.2 PD-1

PD-1 (CD279) ist ein weiteres koinhibitorisches Molekül, das der B7-Familie zuzuordnen ist und auf aktivierten T-Zellen, regulatorischen T-Zellen, auf B-Zellen, NK-Zellen und aktivierten Makrophagen exprimiert wird. PD-1 besitzt zwei Liganden: *Programmed Death Ligand-1* und *Programmed Death Ligand-2* (PD-L1 und PD-L2). (FREEMAN *et al.*, 2000; VIBHAKAR *et al.*, 1997) PD-L1 (auch B7-H1 oder CD274) wird konstitutiv auf B-Zellen, DZ, Makrophagen und T-Zellen exprimiert und bei deren Aktivierung heraufreguliert. Darüber hinaus ist PD-L1 auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie dem Endothel und dem Epithel zu finden. IFN- α , - β und - γ können die Expression von PD-L1 auf APZ, Endothel und Epithel erhöhen. Auch viele solide Tumore zeigen eine PD-L1-Expression wobei die Expression mit einer schlechten Krankheitsprognose korreliert. Der zweite Ligand von PD-1, PD-L2 (B7-DC oder CD273) ist induzierbar auf DZ und Makrophagen. (KEIR *et al.*, 2008; ISHIDA *et al.*, 2002; LIANG *et al.*, 2003) Dieses differierende Expressionsmuster führt zu einem komplexen System der Modulation des Immunsystems. PD-1 besitzt zwei Tyrosin-Signal-Motive in seiner zytoplasmatischen Domäne, wovon eines ein *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif* (ITIM) darstellt. Diese werden nach der Ligation phosphoryliert, wodurch die Tyrosin-Phosphatase *Src Homology 2 Domain Containing Phosphatase 2* (SHP-2) rekrutiert wird. Daraufhin werden Signalmoleküle ZAP70, PKC θ , and CD3 ζ der TZR-Signalkaskade dephosphoryliert und diese Signalkaskade inhibiert die PD-1-exprimierende Zelle in ihrer Proliferation und Funktion. Eine Blockade der Interaktion von PD-1 und PD-L1 kann die inhibierte Proliferation und Zytokinproduktion wieder herstellen. (rezensiert in SHARPE & FREEMAN, 2002)

Die inhibierenden Eigenschaften von PD-1 wurden auch in einigen *in vitro* und *in vivo* Modellen dargestellt. So zeigen PD-1^{-/-} Mäuse eine Splenomegalie und eine Zunahme an myeloiden Zellen und B-Zellen sowie CD8⁺ T-Zellen. PD-1^{-/-} B-Zellen reagieren stärker

Einleitung

auf Kreuzvernetzung von α -IgM und myeloide PD-1^{-/-} Zellen zeigen eine verstärkte Antwort auf eine Stimulation durch den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF). PD-1^{-/-} C57BL/6 Mäuse entwickeln mit der Zeit eine Arthritis und Lupus-ähnliche Glomerulonephritis, PD-1^{-/-} BALB/c Mäuse zeigen dagegen eine Kardiomyopathie. (rezensiert in SHARPE & FREEMAN, 2002) Darüber hinaus exprimieren verschiedene Tumore den Liganden PD-L1. Da aktivierte T-Zellen PD-1 tragen, können Tumorzellen durch die Expression seiner Liganden die spezifischen T-Zellen inhibieren und sich so vor einer Eliminierung durch das Immunsystem des Wirts schützen. Eine Blockade der PD-1 – PD-L1 – Interaktion durch Antikörper gegen PD-1 oder PD-L1 wird bereits in der Tumorthherapie aber auch in der Therapie gegen chronische Viruserkrankungen genutzt (HAMID *et al.*, 2013; TOPALIAN *et al.*, 2014; WOLCHOK *et al.*, 2013; BONI *et al.*, 2007; PENNA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008).

1.2.3 LAG-3

LAG-3 (CD223), exprimiert von aktivierten T-Zellen und NK Zellen, ist ebenfalls ein koinhibitorischer Rezeptor und ist strukturell sehr ähnlich zu CD4 (TRIEBEL *et al.*, 1990). Darüber hinaus gilt LAG-3 als wichtiger Marker für regulatorische T-Zellen Typ 1 (Tr1) (GAGLIANI *et al.*, 2013). Genau wie CD4 bindet LAG-3 an MHC II, weist jedoch eine höhere Affinität zu dem Liganden auf. In seiner zytoplasmatischen Domäne befindet sich ein KIEELE Motiv, durch das CD4-abhängige T-Zell-Funktionen inhibiert werden. (WORKMANN *et al.*, 2002) Eine Blockade von LAG-3 über Antikörper erhöht die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen und deren IL-2 Produktion. Des Weiteren inhibiert die Blockade von LAG-3 die Induktion von T_{regs} und fördert die Entstehung von T_{H1} Zellen. (DURHAM *et al.*, 2014) LAG-3-defiziente Zellen sind resistenter gegenüber *in vitro* Suppression. (DURHAM *et al.*, 2014) Im Gegensatz zu CTLA-4^{-/-} Mäusen oder PD-1^{-/-} Mäusen weisen LAG-3^{-/-} Mäuse keinen allgemeinen Immundefizit auf. In einem suszeptiblen *nonobese diabetic* Hintergrund zeigen LAG-3^{-/-} Mäuse aber eine beschleunigte Entstehung von Typ 1 Diabetes auf. Darüber hinaus sorgt eine Defizienz von LAG-3 in PD-1^{-/-} Mäusen für eine lethale Myokarditis. (OKAZAKI *et al.*, 2011)

1.2.4 Tim-3

Ein weiterer, in dieser Arbeit untersuchter Koinhibitor ist Tim-3 (CD366). Tim-3 wird auf aktivierten T-Zellen, dabei vor allem auf T_H1 Zellen aber auch auf T_H17 Zellen und zytotoxischen T-Zellen Typ 1, Monozyten, DZ und NK Zellen exprimiert (HAN *et al.*, 2013; HASTINGS *et al.*, 2009). Galectin 9 wurde als Ligand von Tim-3 beschrieben (HAN *et al.*, 2013). Tim-3 besitzt kein klassisches Signalmotiv, sein zytoplasmatischer Teil hat aber fünf konservierte Tyrosin Reste (ANDERSON *et al.*, 2016). Seine Expression steht in Verbindung mit Autoimmun Erkrankungen, Virusinfektionen und Tumor Erkrankungen (HAN *et al.*, 2013), im peripheren Blut von Patienten mit Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis und Psoriasis ist Tim-3 dagegen wenig exprimiert (ANDERSON *et al.*, 2016). In chronischen Infektionen mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) sind Virus-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit geringster Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen Tim-3⁺ (JIN *et al.*, 2010) Die Blockade von Tim-3 durch einen agonistischen Antikörper erhöht die T-Zell Antwort (HAN *et al.*, 2013; ANDERSON *et al.*, 2016). Darüber hinaus wurde nach Blockade von Tim-3 eine erhöhte Produktion von IFN- γ , IL-17, IL-2 und IL-6 aber nicht IL-10, IL-4 oder TNF- α beschrieben (HASTINGS *et al.*, 2009), was seine inhibitorische Wirkung unterstreicht. Ein α -Tim-3 Antikörper verstärkt ebenfalls die Symptome im Mausmodell für experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (MONNEY *et al.*, 2002) Eine simultane Blockade von Tim-3 und PD-1 erhöht darüber hinaus die T-Zell-Antwort in Hepatitis-C-Virus (HCV), Hepatitis-B-Virus (HBV) und LCMV Infektionen (MCMAHAN *et al.*, 2010; NEBBIA *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2010).

1.2.5 BTLA

BTLA (CD272) gehört der Ig Superfamilie an (HAN *et al.*, 2004), ist ein Typ I Membranglykoprotein mit einer C-Typ Ig Domäne (MURPHY & MURPHY, 2010). Eine Expression von BTLA konnte auf DZ, Makrophagen, NK-Zellen und auf B- und T-Zellen vor allem im aktivierten Zustand nachgewiesen werden (MURPHY *et al.*, 2006; HURCHLA *et al.*, 2007; TAO *et al.*, 2005). Gedächtnis-T-Zellen exprimieren dagegen kein BTLA (MURPHY *et al.*, 2006). Ligation von BTLA mit seinem Liganden löst inhibitorische Signal aus (HURCHLA *et al.*, 2007; TAO *et al.*, 2005; MCGRATH & NAJAFIAN, 2012). jedoch sind in der

Einleitung

Literatur ebenfalls Hinweise auf eine kostimulatorische Wirkung von BTLA zu finden (TAO *et al.*, 2005; HURCHLA *et al.*, 2007).

Die Struktur von BTLA ist sehr konserviert zwischen den verschiedenen Spezies. Es besitzt eine extrazelluläre Ig-Domäne und 6 N-Glycosilierungsstellen. (MURPHY & MURPHY, 2010) Die zytosolische Domäne enthält ein ITIM und ein ITSM (*Immuno Tyrosine-Based Switch Motif*) sowie eine Grb-2 (*Growth Factor1 Receptor Bound Protein*) Bindungsstelle. Nach einer Tyrosinphosphorylierung treten diese Motive in Interaktion mit den Phosphatasen SHP-1 und SHP-2. (HURCHLA *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 2003; TAO *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 2004) In Folge der Aktivierung werden Proliferation sowie IL-2-Produktion und somit eine weitere Aktivierung von BTLA-exprimierenden Zellen abgeschwächt (WATANABE & NAKAJIMA, 2012). Der einzige bisher bekannte Ligand von BTLA ist HVEM (GONZALEZ *et al.*, 2005; HURCHLA *et al.*, 2007). Diese Interaktion ist das erste entdeckte Zusammenspiel zwischen einem Mitglied der Ig-Superfamilie (BTLA) und einem Mitglied der TNF Superfamilie (HVEM) (WATTS, 2005). Expression von HVEM wurde auf B-Zellen, T-Zellen, DZ, NK-Zellen und parenchymalen Zellen (DEL RIO *et al.*, 2010) gezeigt, jedoch verläuft die Expression entgegen der des Expressionsverlaufs von BTLA während der T-Zell-Aktivierung (MURPHY & MURPHY, 2010).

Die Funktion von BTLA wurde vornehmlich an BTLA-defizienten Mäusen erforscht, deren T-Zellen in verschiedenen Modellen verstärkte Aktivierung und Proliferation zeigen (MURPHY *et al.*, 2006; WARE & SEDY, 2011; DEL RIO *et al.*, 2010; MCGRATH & NAJAFIAN, 2012), Des Weiteren produzieren BTLA^{-/-} Mäuse vermehrt Autoantikörper (OYA *et al.*, 2008) und neigen zu Autoimmun Erkrankungen (GONZALEZ *et al.*, 2005). Herztransplantate werden in BTLA^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen schneller abgestoßen (MURPHY *et al.*, 2006). Darüber hinaus sind die Symptome von experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis (MURPHY *et al.*, 2006) und ConA-induzierter Hepatitis (IWATA *et al.*, 2010) in BTLA-defizienten Mäusen ausgeprägter. In Modellen für Hypersensitivität der Atemwege ist die Lunge von BTLA^{-/-} Tieren im Vergleich zu Wildtyp Mäusen länger entzündet. Dieses deutet darauf hin, dass BTLA nicht nur in die primäre T-Zell-Aktivierung involviert ist sondern auch im späteren Verlauf aktiv ist. (MURPHY *et al.*, 2006; TAO *et al.*, 2005) Auch an der Homöostase von DZ ist BTLA beteiligt. Dieses ist an der höheren Anzahl von DZ in der Milz von BTLA^{-/-}

Einleitung

Mäusen zu sehen. (MURPHY & MURPHY, 2010) Neben den Mausmodellen wurde auch in *in vitro* Stimulationen die inhibitorische Wirkung von BTLA verdeutlicht. Stimulationen mit agonistischen α -CD3 Antikörpern zeigten eine stark gehemmte Proliferation und auch eine geringere Sekretion von IL-2 (KRIEG *et al.*, 2005; LEPENIES *et al.*, 2007).

1.2.6 TIGIT

TIGIT gehört wie CTLA-4 zu der CD28 Familie und wird auf aktivierten T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen, NK Zellen und T_{regs} exprimiert. Beschrieben wurde TIGIT auch unter den Namen Vstm3, Vsig9 und WUCAM (ANDERSON *et al.*, 2016). Genau wie BTLA besitzt TIGIT ein ITIM Motiv und hat eine inhibitorische Wirkung. (LEVIN *et al.*, 2011) Bisher wurden zwei Liganden von TIGIT beschrieben: CD155 und CD112 (LEVIN *et al.*, 2011). Wie CTLA-4 besitzt TIGIT ebenfalls einen kostimulatorischen Gegenspieler, der mit TIGIT um die Bindung an CD155 und CD112 konkurriert. Dieses kostimulatorische Molekül ist CD226 (LEVIN *et al.*, 2011). TIGIT, CD226 und ihr Ligand CD155 werden nach der Aktivierung von T-Zellen heraufreguliert. In einer Stimulation mit einem agonistischen α -TIGIT Antikörper sind T-Zellen weniger aktiviert, proliferieren weniger und produzieren weniger Zytokine, was die inhibitorische Wirkung von TIGIT unterstreicht. (LOZANO *et al.*, 2011)

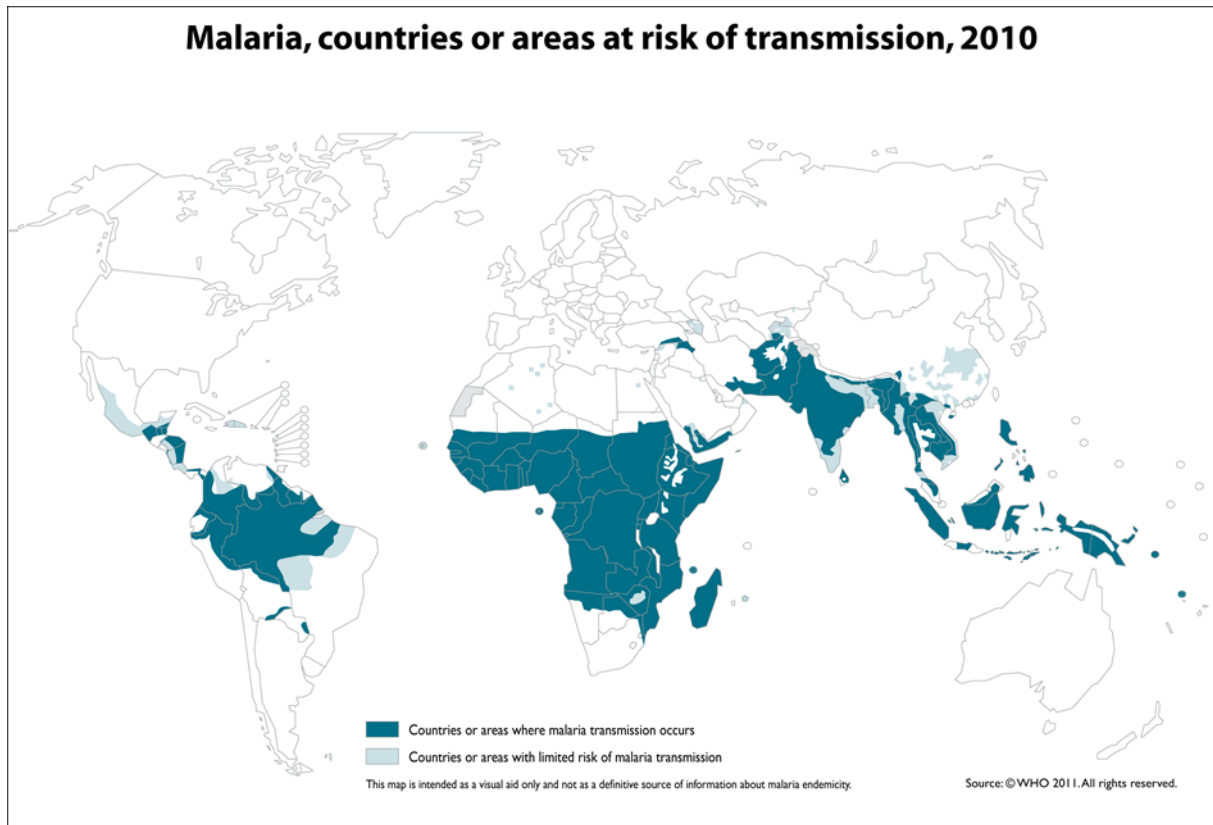
Für die Charakterisierung der Wirkungsweisen von TIGIT wurden verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt. Zum einen inhibieren α -TIGIT Antikörper die Proliferation und die Induktion von CD25 in Stimulationen von T-Zellen. In einem *in vivo* Modell für Collagen-induzierte Arthritis verringert lösliches TIGIT die Schwere der Erkrankung. TIGIT^{-/-} Mäuse entwickeln stärkere Symptome von Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis wohingegen transgene Mäuse für TIGIT vor Symptomen geschützt sind. Darüber hinaus überleben TIGIT-defiziente Zellen weniger lange als Wildtyp Zellen in einem Modell für *Graft-versus-Host* Erkrankungen. (LEVIN *et al.*, 2011)

1.2.7 Tr1 Zellen

Regulatorische T-Zellen Typ 1 (Tr1 Zellen) gehören zu den regulatorischen T-Zellen, weisen jedoch keine Expression von FoxP3 auf. Trotzdem sind sie in der Lage über die Ausschüttung von IL-10 und TGF- β T_H1- und T_H2-Zellen zu supprimieren (BACCHETTA *et al.*, 2002; GROUX *et al.*, 1997; KITANI *et al.*, 2000). Darüber hinaus exprimieren Tr1 Zellen Koinhibitoren wie CTLA-4 und LAG-3 sowie Effektormoleküle wie die Ektonukleotidase CD39 (BONO *et al.*, 2015) und das Apoptose-auslösendes Enzym Granzym B (BLINK *et al.*, 1999) (BACCHETTA *et al.*, 2002; KITANI *et al.*, 2000; SCHULER *et al.*, 2014; GROSSMAN *et al.*, 2004).

1.3 Malaria

Malaria ist mit seinen weltweit etwa 250 Millionen Infektionen pro Jahr eine der bedeutendsten Infektionserkrankungen. Jährlich erliegen etwa 500 000 bis 800 000 Menschen der Infektion. Besonders betroffen sind dabei Kinder unter 5 Jahren. Es gibt 5 humanpathogene Erreger; *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium knowlesi*. *Plasmodium falciparum* (Pf) ist dabei der gefährlichste Erreger und verursacht die gravierendsten Symptome und meisten Todesfälle. (WHO, 2016) Infektionen mit Plasmodien kommen vor allem in Teilen Afrikas südlich der Sahara vor, aber auch Teile Südamerikas und Asiens sind betroffen (Abb. 2).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.



Abb. 2: Weltweite Verbreitung von Malariainfektionen.

Malariainfektionen erfolgen hauptsächlich in Gebieten in Afrika südlich der Sahara aber auch in Teilen Südamerikas und Asiens. Quelle: WHO

1.3.1 Der *Plasmodium falciparum* Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* (Abb. 3) beginnt mit der Blutmahlzeit einer weiblichen infizierten *Anopheles* Mücke. Während dieser Blutmahlzeit gelangen Sporozoiten aus den Speicheldrüsen der Mücke in den Blutkreislauf des Wirts. Auf diesem Weg erreichen die Sporozoiten die Leber, wo sie in Hepatozyten eindringen und durch mehrere Hepatozyten migrieren, bis sie in einer Zelle verweilen und sich in der sogenannten exoerythrozytären Schizogenie vermehren (MOTA *et al.*, 2001). So entstehen in einem Hepatozyten in mehreren Tagen mehrere Tausend Merozoiten, die in die Blutbahn gelangen und die Blutphase initiieren. Während dieser Phase infizieren Merozoiten zunächst Erythrozyten. In den Erythrozyten befinden sich die Merozoiten in

Einleitung

einer membrangebundenen, sogenannten parasitophoren Vakuole, in der sie sich während der sogenannten erythrozytären Schizogenie vermehren. In diesem Vorgang nimmt der Parasit zunächst die Ringform an, wird zum Trophozoiten, woraufhin sich nach mehreren Teilungsschritten Schizonten bilden. Reife Schizonten enthalten etwa 20 Merozoiten, die nach dem Platzen des Schizonten wiederum in den Blutstrom entlassen werden und weitere Erythrozyten infizieren können. Die erythrozytäre Schizogenie verläuft synchronisiert und etwa alle 2 bis 3 Tage gelangen neue Merozoiten in die Blutbahn. Vermutlich kommen auf diese Weise die wiederkehrenden Fieberschübe während der Erkrankung, die vornehmlich auf die Produktion von TNF- α zurückzuführen ist, zustande. (TUTEJA, 2007) Während der Blutphase kommt es darüber hinaus zu der Bildung von weiblichen und männlichen Gametozyten. Diese werden bei einer erneuten Blutmahlzeit einer *Anopheles* Mücke aufgenommen. In der Mücke findet daraufhin die sexuelle Vermehrung der Gametozyten statt; es entstehen neue Sporozoiten. Die Sporozoiten wiederum wandern in die Speicheldrüsen der Mücke und der Kreislauf schließt sich. Nimmt eine infizierte Mücke eine Blutmahlzeit an einem neuen Wirt, gelangen die Sporozoiten in die Blutbahn und können erneut Hepatozyten infizieren.

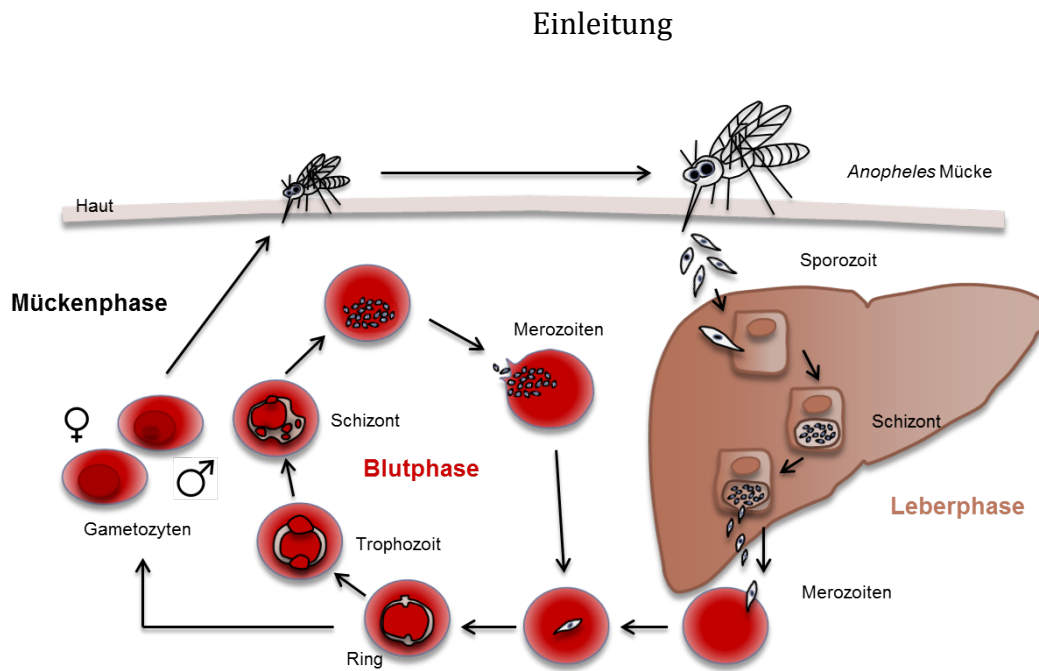


Abb. 3: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*.

Die Infektion beginnt mit der Blutmahlzeit einer infizierten weiblichen Anopheles Mücke. Infektiöse Sporozoiten gelangen über den Blutstrom in die Leber, infizieren Hepatozyten und starten so die Leberphase. Nach erfolgter Vermehrung verlassen die gebildeten Merozoiten die Leber, gelangen wieder in den Blutstrom, infizieren Erythrozyten und starten die Blutphase. In den Erythrozyten erfolgt die weitere Entwicklung über das Ring Stadium, Trophozoiten und Schizonten bis zu neuen Merozoiten. Diese können weitere Erythrozyten infizieren. Während der Blutphase entstehen darüber hinaus männliche und weibliche Gametozyten, die bei der Blutmahlzeit einer weiteren Mücke aufgenommen werden und sich in der Mücke zu neuen Sporozoiten entwickeln. Mit einer erneuten Blutmahlzeit an einem gesunden Wirt kann die infizierte Mücke eine erneute Infektion auslösen.

1.3.2 Krankheitsbild und Behandlung

Das Krankheitsbild der *Plasmodium falciparum* Malaria unterscheidet sich zunächst nicht von anderen Infektionserkrankungen. Typische Symptome sind Fieber, Schüttelfrost, Unwohlsein, Husten, Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen, wässriger Durchfall und Übelkeit. Darüber hinaus führt die Infektion zu Anämie. Die ersten Symptome treten dabei etwa eine Woche nach dem Stich der infizierten Mücke auf. In schwereren Infektionen oder bei verzögerter oder gar ausbleibender Behandlung treten schwerere Symptome auf, die hauptsächlich durch die Sequestration von infizierten Erythrozyten in den verschiedenen Organen hervorgerufen werden. In der sogenannten komplizierten Malaria kommt es zu Atemnot und Bewusstseinsstörungen, die bis zum Koma und gar dem Tod führen können. (TUTEJA, 2007) Eine sehr gefährliche, komplizierte Entwicklung in der *Pf* Malaria ist die zerebrale Malaria (ZM). Während der

Einleitung

ZM kommt es zu Lähmungen und Krampfanfällen, die in vielen Fällen zum Tod des Patienten führen.

Aufgrund der unspezifischen Symptome ist eine korrekte Diagnostik zur Feststellung einer Infektion mit Plasmodien und vor allem für die gezielte Behandlung von großer Bedeutung. Für die Diagnostik können einerseits Schnelltests herangezogen werden. Meistens erfolgt die Diagnostik jedoch über Mikroskopie, bei der gleichzeitig auch die Parasitämie im peripheren Blut festgestellt werden kann. (TUTEJA, 2007)

Erfolgt die Behandlung zeitnah nach der Infektion, ist diese auch erfolgreich. Chloroquin galt lange Zeit als gut geeignet für die Behandlung von *Plasmodium falciparum* Malaria. Dabei verhindert Chloroquin die Kristallisierung des Hämozoins, eines Abbauprodukt des Häms. Da Hämozoin toxisch auf *Pf* wirkt, stirbt der Parasit. Im Laufe der Jahre haben sich in vielen für Malaria endemischen Gebieten Resistenzen gegen Chloroquin entwickelt. Als Konsequenz haben sich Kombinationspräparate etabliert, die meistens als einen der Bestandteile Artemisinin enthalten (Artemisinin-basierte Kombinationstherapie; ACT) (TUTEJA, 2007). Artemisinin sorgt für die Bildung von Radikalen in Erythrozyten, die wiederum den Parasiten schädigen. Durch die Kombination von Artemisinin mit anderen Wirkstoffen kann die Bildung von Resistenzen gegen diese Medikamente zwar verzögert werden, verhindert werden kann sie jedoch nicht. Erste Resistenzen gegen Artemisinin werden bereits verzeichnet (ASHLEY *et al.*, 2014).

Um Infektionen mit Plasmodien zu verhindern, ist die Entwicklung von Vakzinen von großer Bedeutung. Bis heute ist es jedoch nicht gelungen, einen effizienten Impfstoff zu entwickeln, der dazu noch den betroffenen Menschen zur Verfügung gestellt werden kann. Ein vielversprechender Kandidat für ein effektives Vakzin ist RTS,S (KASLOW & BIERNAUX, 2015). RTS,S enthält Teile des *Plasmodium falciparum-derived circumsporozoite protein* (CSP), Partikel des Hepatitis-B-Virus Oberflächenantigens (HBsAG) und ein Adjuvant. Da CSP das wichtigste Oberflächenmolekül von Plasmodien Sporozoiten ist, setzt dieses Vakzin in der Leberphase an und soll die weitere Entwicklung der Parasiten und die Entstehung von Symptomen vermeiden. Das Vakzin wurde bereits in klinischen Studien getestet und hat dabei vielversprechende

Einleitung

Ergebnisse erzielt. Der beste und einfachste Weg der Bekämpfung von Malaria ist trotzdem weiterhin die Kontrolle des Vektors, der *Anopheles* Mücke. Einerseits kann der Einsatz von Repellents, langer Kleidung und imprägnierten Bettnetzen Stiche verhindern. Andererseits kann auch der Vektor selber bekämpft werden, indem zum Beispiel Brutstätten der Mücken zerstört werden. Durch den Einsatz dieser einfachen Mittel konnten die weltweiten Malaria Erkrankungen zwischen den Jahren 2000 und 2015 um 18% gesenkt werden (World Malaria Report 2015, WHO).

1.3.3 Die Immunantwort auf Infektionen mit Plasmodien und Pathologie

Während der ersten Phasen einer Infektion mit Plasmodien wird eine Antwort des Immunsystems auf die Pathogene durch mehrere Faktoren erschwert. Nach der Inokulation durch die Mücke befinden sich die Sporozoiten nur für eine sehr kurze Zeit in der Haut und der Blutbahn des Wirts. Diese kurze Zeit reicht nicht aus für eine effektive Aktivierung des Immunsystems. In der Leber ermöglicht das tolerogene Milieu des Organs den Parasiten darüber hinaus eine fast ungestörte Wanderung durch und Vermehrung in den Hepatozyten (rezensiert in BERTOLINO & BOWEN, 2015). Aufgrund der ausbleibenden klinischen Symptome während der Leberphase ist über diese erste Phase der Infektion somit nur wenig bekannt.

Gelangen die Merozoiten in die Blutbahn und infizieren Erythrozyten, erfolgt noch immer keine ausreichende Immunantwort, um die Parasiten zu eliminieren. Erythrozyten besitzen keine MHC Moleküle und können somit kein Antigen präsentieren. Die Aktivierung des Immunsystems erfolgt erst mit der Ruptur der infizierten Erythrozyten und der damit verbundenen Freisetzung vieler Merozoiten in die Blutbahn. Dieser Prozess ist assoziiert mit der Entwicklung von Fieber in dem Wirt. Das Fieber entsteht durch die Aktivierung von Makrophagen und daraus resultierender Zytokinausschüttung. Zunächst wird Glykosylphosphatidylinositol (GPI) aus der Membran der Merozoiten über *Toll-like* Rezeptor 2 (TLR2), zu einem kleinen Anteil auch über TLR4, auf Makrophagen erkannt (KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005), was die Produktion von geringen Mengen TNF- α induziert. Des Weiteren wird das bei dem Abbau von Hämoglobin in den infizierten Erythrozyten entstehende Hämözoïn durch TLR9 erkannt (PARROCHE *et al.*, 2007).

Einleitung

Die aktivierten Makrophagen aktivieren NK-Zellen und T-Zellen, die wiederum über die Ausschüttung von IFN- γ und TNF- α für eine weitere Aktivierung der Makrophagen sorgen. Neben der Produktion von IFN- γ und TNF- α hat die Aktivierung von Makrophagen auch die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) zur Folge. (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003) Die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine sowie von NO trägt einerseits zu der Eliminierung der Parasiten bei, hat andererseits bei übermäßiger Ausschüttung jedoch auch schädigende Wirkung auf den Wirt und verstärkt die Pathologie.

Eine schwerwiegende Komplikation in schweren *Pf* Infektionen ist die Entwicklung von zerebraler Malaria (ZM). Dieser Zustand führt bis zum Koma oder sogar zum Tod und tritt vor allem bei Kindern unter 5 Jahren auf. Die sogenannte Sequestration spielt in der Entwicklung von ZM eine zentrale Rolle. Infizierte Erythrozyten haften sich über das Oberflächenmolekül *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) an das Endothel kleiner Blutgefäße an. Dabei bindet PfEMP1 an Moleküle wie Thrombospondin, CD36 und *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM1) (HO & WHITE, 1999). Durch die Sequestration verbleiben die infizierten Erythrozyten in kleinen Blutgefäßen oder im Fettgewebe und umgehen so die Erkennung durch das Immunsystem. Sequestration im Gehirn ist dabei besonders gefährlich, da sie zu zerebraler Pathologie führt. Diese entsteht einerseits durch Verschluss der Gefäße und ausbleibender Sauerstoffversorgung. Darüber hinaus kommt es zu einer lokalen Immunantwort und Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine sowie NO, die die umliegenden Zellen schädigen. (MALAGUARMERA & MUSUMECI, 2002)

Auch DZ spielen in der Malaria eine wichtige Rolle. Durch ihre Antigen-Präsentation induzieren sie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen können die intrazellulären Parasiten direkt eliminieren. CD4⁺ T-Zellen dagegen können in ihrer Funktion als T-Helferzellen B-Zellen aktivieren, die wiederum spezifische Antikörper gegen die Parasiten produzieren können. Diese Antikörper richten sich gegen die Blutphase der Infektion. Des Weiteren sind Antikörper essentiell für die Entwicklung einer Immunität gegen *Pf* Infektionen. Nimmt die Anzahl der erlebten Infektionen eines Individuums zu, so entwickeln sich weniger gravierende Symptome nach erneuten Infektionen. Dieses kann bis hin zu asymptomatischen Infektionen führen. (RYG-CORNEJO *et al.*, 2015) Im

Einleitung

Gegensatz zu vielen viralen Infektionen entsteht gegen die Malaria jedoch nie eine sterile Immunität. Da für die Aufrechterhaltung der Immunität gegen *Pf* ein regelmäßiger Kontakt zu den Parasiten nötig ist und die Immunität andernfalls verloren geht, wird dieser Zustand Semi-Immunität genannt (RAMASAMY, 1998). Semi-immune Individuen können zwar weiterhin mit *Pf* infiziert werden und zeigen oft zumindest eine sehr geringe Parasitämie auf, entwickeln jedoch keine Symptome mehr. (RYG-CORNEJO *et al.*, 2015)

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Eine Balance der Immunantwort in der *Pf* Malaria ist von großer Bedeutung, um einerseits den Parasiten zu bekämpfen und andererseits die Schädigung des Wirts zu verhindern. Der Mechanismus der Aufrechterhaltung dieser Balance ist bisher noch nicht verstanden. In der Feinabstimmung der Funktion von T-Zellen spielen koinhibitorische Moleküle eine wichtige Rolle. Diese Arbeit untersucht die Rolle und Funktion koinhibitorischer Moleküle in der *Pf* Malaria. Hierfür sollte zunächst peripheres Blut von Patienten mit importierter *Pf* Malaria durchflusszytometrisch auf die Expression der koinhibitorischen Moleküle CTLA-4, PD-1, LAG-3, Tim-3, BTLA und TIGIT auf CD4⁺ T-Zellen analysiert werden. Darüber hinaus sollte die Expression von Aktivierungsmarkern und Effektormolekülen untersucht werden. Um die Funktionalität der Koinhibitor-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen zu überprüfen, sollten *in vitro* Versuche durchgeführt werden. Des Weiteren sollte eine Studie in einem endemischen Gebiet durchgeführt werden, um die Ergebnisse der ersten Studie über importierte *Pf* Malaria zu bestätigen sowie Unterschiede zwischen Infektionen mit mildereren und Infektionen mit schwereren Symptomen zu finden.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Tab. 1: Laborgeräte

LABORGERÄT	HERKUNFT
Analysenwaage	<i>Satorius AG, Göttingen</i>
CO₂-Inkubator	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)</i>
Durchflusszytometer „Accuri C6“	<i>BD Bioscience, Heidelberg</i>
Durchflusszytometer „FACSariaIII“	<i>BD Bioscience, Heidelberg</i>
Durchflusszytometer „LSRII“	<i>BD Bioscience, Heidelberg</i>
Mikroskop „AxioStar plus“	<i>Zeiss, Oberkochen</i>
Mikroskop „Wilovert 30“	<i>WETZLAR, Wetzlar</i>
pH Meter HI 221	<i>Hanna Instruments, Kehl am Rhein</i>
Pipetten	<i>Gilson, Middleton (USA)</i>
Pipettierhilfe „Swiftpet+“	<i>Abimed, Langenfeld</i>
Sterile Arbeitsbank „LaminAir HB2448“	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Szintillationszähler	<i>PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim</i>
Vortex „MS1 Minishaker“	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
Wasserbad Thermomix MM	<i>Braun, Melsungen</i>
Zentrifuge „Heraeus Multifuge X3R“	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)</i>
Zentrifuge „5415 R“	<i>Eppendorf, Hamburg</i>

2.2 Glas- und Plastikwaren

Tab. 2: Glas- und Plastikwaren

GLAS- ODER PLASTIKWARE	HERKUNFT
Glasflaschen Schott Duran (250 mL, 500 mL, 1 L)	<i>Schott AG, Mainz</i>
S-Monovette® 9 mL LH	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Safety-Multifly®-Kanüle 21G 200 mm lang	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Eppendorf Reaktionsgefäße	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
FACS Rörchen mit Deckel	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen</i>
Filter CellTrics 30 µm	<i>Sysmex Partec, Görlitz</i> <i>Brand, Wertheim</i>
Glasfaser Filter	<i>PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim</i>
LD Säulen	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach</i>
Neubauer Zählkammer (0.1 mm x 0.0025 mm²)	<i>Hecht-Assisten, Sondheim</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
SepMate™- 50 Rörchen	<i>Stemcell Technologies, Köln</i>
Sterilfilter (0,22 µm, Stericup & Steritop)	<i>Millipore, Schwalbach</i>
Zellkulturplatten Rundboden, 96 well	<i>Greiner bio-one, Frickenhausen</i>
Zentrifugenrörchen (15 mL, 50 mL)	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>

2.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen sofern dieses nicht anders deklariert ist.

2.4 Material für zellbiologische Arbeiten

2.4.1 Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Tab. 3: Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

REAGENZ	HERKUNFT
³ H-Thymidin	<i>PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim</i>
Incidin liquid	<i>Ecolab, Düsseldorf</i>
DPBS	<i>PAN-Biotech, Aidenbach</i>
Ficoll-Paque™ PLUS	<i>GE Healthcare, Freiburg</i>
Hepes Buffer Solution (1 M)	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
Humanes Serum	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen</i>
L-Glutamin	<i>PAA, Pasching, Österreich</i>
Penicillin/Streptomycin	<i>ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)</i>
RBC Lyse/Fixierung Puffer	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	<i>PAN-Biotech, Aidenbach</i>

2.4.2 Kits für zellbiologische Arbeiten

Tab. 4: Kits für zellbiologische Arbeiten

KIT	HERKUNFT
FoxP3 Färbepuffer Set	<i>eBioscience, San Diego (USA)</i>
LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (13-plex)	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
MACS CD4 T cell isolation kit human	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach</i>

2.5 Kulturmedium, Puffer und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Tab. 5: Kulturmedien, Puffer und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

PUFFER	ZUTAT
MACS Puffer	<i>500 mL PBS</i> <i>2,5 mL humanes Serum</i> <i>2 mL EDTA 500 mM</i>
Complete RPMI (cRPMI)	<i>500 mL RPMI 1640</i> <i>50 mL humanes Serum</i> <i>5 mL L-Glutamin</i> <i>2,5 mL Gentamicin</i> <i>12,5 mL Hepes</i>
PBS 1% Serum	<i>PBS</i> <i>1% humanes Serum</i>

2.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie

ANTIKÖRPER	KLON	HERKUNFT
Streptavidin BV421	-	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αBTLA Biotin	<i>MIH26</i>	<i>eBioscience, San Diego (USA)</i>
αBTLA BV421	<i>MIH26</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αCD127 BV421	<i>A019D5</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αCD3 APC/Cy7	<i>HIT3a</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αCD38 PE	<i>HB-7</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αCD39 BV421	<i>A1</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αCD39 PE/Cy7	<i>A1</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αCD4 BV510	<i>OKT4</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αCD69 FITC	<i>FN50</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αCD8 AF700	<i>RPA-T8</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αCTLA-4 PE	<i>L3D10</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αGranzyme B AF647	<i>GB11</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αKi-67 AF488	<i>Ki-67</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αKi-67 PE/Cy7	<i>Ki-67</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αLAG-3 APC	<i>3DS223H</i>	<i>eBioscience, San Diego (USA)</i>
αPD-1 PerCP/Cy5.5	<i>EH12.2H7</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αTim-3 BV421	<i>F38-2E2</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αTim-3 PE/Cy7	<i>F38-2E2</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
LIVE/DEAD® Fixable Blue	-	<i>ThermoFisher</i>
Dead Cell Stain		<i>Waltham (USA)</i>
αCD39 PE/Dazzle	<i>A1</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>
αGranzyme B AF700	<i>GB11</i>	<i>BD Bioscience, Heidelberg</i>
αTIGIT PE/Cy7	<i>MBSA43</i>	<i>eBioscience, San Diego (USA)</i>
αCD49b FITC	<i>PIE6-C5</i>	<i>BioLegend, San Diego (USA)</i>

2.7 Arbeiten mit Vollblut

2.7.1 Materialien für Arbeiten mit Vollblut

Tab. 7: Materialien für Arbeiten mit Vollblut

REAGENZ	HERKUNFT
Giemsa Färbelösung	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Methanol	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Wright Färbelösung	<i>Sigma Chemical, St. Louis (USA)</i>
Schnelltest CareStart™ Malaria HRP2 (PF)	<i>ACCESS BIO, INC., Somerset (USA)</i>

2.7.2 Probanden

Diese Arbeit behandelt zwei verschiedene Projektteile mit unterschiedlichen Probanden. Für die in Hamburg durchgeführten Untersuchungen wurden verschiedene Probandengruppen rekrutiert. Als gesunde Kontrollen dienten Mitarbeiter des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin. *Pf* Malaria Patienten wurden entweder in der Ambulanz des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin oder in der Bernhard-Nocht-Klinik des Universitätsklinikums Eppendorf rekrutiert. Die Charakterisierungen der *Pf* Malaria Patienten, so weit bekannt, zeigen Tab. 8, Tab. 9 und Tab. 10. Zur besseren Übersicht wurde je eine Tabelle für die unterschiedlichen Zusammenstellungen der Fluorochrome für die Durchflusszytometrie angefertigt. Neben *Pf* Malaria Patienten wurden auch Proben von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen (Autoimmunhepatitis (AIH), Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) und Primär Biliäre Cholangitis (PBC)) analysiert. Diese Probanden wurden mit der Unterstützung von Prof. Dr. Christoph Schramm in die Studie einbezogen. Die Patienten aus den weiteren Gruppen leiden unter den Viruserkrankungen Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV) und dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV). Mit der Unterstützung von PD Dr. Julian Schulze zur Wiesch konnten diese Studiengruppen eingeschlossen werden.

Material

Tab. 8: In die Analyse der Koinhibitoren und Aktivierungsmarker eingeschlossenen *Pf* Malaria Patienten.

Alter, Geschlecht und Parasitämie sind, sofern bekannt, angegeben.

Proband	Alter [Jahre]	Geschlecht (m = männlich; w = weiblich)	Parasitämie [%]
1	47	m	2
2	-	m	< 1
3	48	w	20
4	42	m	23
5	37	m	1,5
6	69	w	21
7	58	m	1,5
8	48	m	< 1
9	-	m	-
10	-	w	< 1

Tab. 9: In die Analyse potentieller Zytotoxizität eingeschlossenen *Pf* Malaria Patienten.

Alter, Geschlecht und Parasitämie sind, sofern bekannt, angegeben.

Proband	Alter [Jahre]	Geschlecht (m = männlich; w = weiblich)	Parasitämie [%]
10	-	w	< 1
11	36	m	1
12	20	m	< 1
13	31	w	< 1
14	35	w	< 1
15	-	m	-
16	-	-	< 1
17	-	m	< 1
18	-	m	< 1
19	-	m	20
20	43	m	3,5
21	49	m	1

Tab. 10: In die Analyse von Tr1 Zellen eingeschlossenen *Pf* Malaria Patienten.

Alter, Geschlecht und Parasitämie sind, sofern bekannt, angegeben.

Proband	Alter [Jahre]	Geschlecht (m = männlich; w = weiblich)	Parasitämie [%]
22	29	m	< 1
23	69	m	< 1
24	49	m	-
25	61	m	-
26	-	w	-
27	35	m	3
28	-	m	1
29	25	m	3
30	34	w	-
31	39	m	8
32	25	m	-
33	49	m	-

Das zweite Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit einem Projekt in Ghana, wo Malaria endemisch ist. Dort wurden vier Studiengruppen an zwei Standorten etabliert. Der erste Standort ist eine Schule. Dort wurden zwei Gruppen mit insgesamt 82 Kindern rekrutiert, die keine Symptome aufwiesen. Die eine Hälfte war negativ im Malaria Schnelltest, der zirkulierendes Malaria Antigen nachweist, und diente als Kontrollgruppe. Die zweite Hälfte wies einen positiven Schnelltest auf und bildete die Gruppe asymptomatisch infizierten Kinder (AS). Der zweite Standort war ein Krankenhaus. Die hier in die Studie eingeschlossenen 68 Probanden zeigten alle ein positives Ergebnis im Schnelltest. Der erste Teil der Probanden hatte mildere Symptome und wurde nach der ambulanten Behandlung wieder entlassen (Outpatient Department (OPD)). Die zweite Untergruppe zeigte schwerere Symptome und blieb zur stationären Behandlung im Krankenhaus (Ward). Die Charakterisierung der Probanden dieses Teilprojektes ist im Abschnitt 4.10 zu finden. Nach WHO Kriterien gehend, wiesen nur zwei Kinder schwere Malariainfektionen auf, da diese Kinder eine Parasitämie über 10% aufwiesen. Da somit eine weit verbreitete Unterteilung in unkomplizierte und komplizierte Malaria nicht möglich war, wurden die im Krankenhaus rekrutierten Probanden nach Art der Behandlung, genauer ob ambulant oder stationär, in Gruppen eingeteilt.

2.7.3 Ethik

Die ethische Genehmigung wurde durch die Ethikkommission Hamburg erteilt. Die Probanden oder ihre gesetzlichen Vertreter gaben eine schriftliche Zustimmung nach erfolgter medizinischer Aufklärung.

2.8 Software

Tab. 11: Software

PROGRAMM	VERWENDUNG
Adobe Reader XI	<i>Lesen von PDF Dateien</i>
FlowJo X 10.0.7r2	<i>Analyse von durchflusszytometrischen Daten</i>
GraphPad Prism 5	<i>Statistische Analysen</i>
Microsoft Office 10	<i>Erstellen von Textdateien und Tabellen</i>
PDF 24	<i>Erstellen von PDF Dateien</i>
PubMed	<i>Literaturrecherche</i>
SPICE Version 5.35	<i>Graphische Darstellung komplexer durchflusszytometrischer Daten</i>

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Isolation von humanen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Die Entnahme von humanem Blut erfolgte in Heparin Röhrchen. Für die Gewinnung von Plasma und Erythrozyten wurde 5 Minuten bei 1500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das entnommene Plasma und die Erythrozyten wurden bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Das Blut wurde zu gleichen Teilen mit PBS gemischt und in Sepmate Röhrchen über 15 mL Ficoll geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei $1200 \times g$ für 15 Minuten bei Raumtemperatur zur Trennung der Blutbestandteile. Die obere gelbliche Schicht, eine Mischung aus Plasma und mononukleären Zellen (PBMCs), wurde dekantiert und bis zu einem Volumen von 50 mL mit cRPMI aufgefüllt. Es folgten zwei Waschschrte mit cRPMI bei 1750 rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde die Zellzahl durch Trypanblaufärbung ermittelt.

3.1.2 Aufreinigung humaner CD4⁺ T-Zellen

Die Isolation CD4⁺ T-Zellen aus den PBMCs wurde mit Hilfe des *CD4⁺ T cell isolation Kits* (MACS) durchgeführt.

3.1.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung einzelner Zellen einer Zellsuspension. Sie ermöglicht die Ermittlung von Größe, Granularität und der Expression von Oberflächen- aber auch intrazellulären Molekülen. Die zu untersuchenden Moleküle werden dabei zunächst mit Antikörpern markiert, die an

Methoden

verschiedene Fluorochrome gekoppelt sind. Während der durchflusszytometrischen Analyse werden die markierten Zellen mittels Laserlichts und spezifischen Detektoren charakterisiert. So wird zunächst die Größe der Zellen mittels Vorwärtsstreulicht (FSC) und die Granularität mittels Seitwärtsstreulicht (SSC) ermittelt. Des Weiteren geben die spezifischen Fluoreszenzintensitäten der fluorochrommarkierten Antikörper Aufschluss über die Expressionsstärken der zu untersuchenden Moleküle.

Die Durchflusszytometrie kann darüber hinaus auch zur Anreicherung verschiedener Zellpopulationen genutzt werden. Dabei werden spezifische Zellpopulationen aufgrund ihrer ermittelten Expression von Molekülen aus der Gesamtpopulation isoliert und in ein separates Röhrchen sortiert. Diese isolierten Zellen wurden für *in vitro* Analysen verwendet.

100 µL Vollblut wurden mit den entsprechenden Oberflächenmarkern 10 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 1 µL Lebend-tot-Farbstoff und eine weitere Inkubation über 20 Minuten bei 4 °C. Erythrozyten wurden mit 1 mL RBC Lyse Puffer über 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 1 mL PBS (Zentrifugation bei 1500 rpm und 4 °C für 5 Minuten). Um die Zellen zu permeabilisieren und zu fixieren, wurde 1 mL Fix/Perm (FoxP3 Färbepuffer Set) unter leichter Bewegung auf dem Vortex hinzugegeben und 45 Minuten bei 4 °C inkubiert. Um den Puffer zu entfernen, wurde zwei Mal mit 2 mL Perm Buffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Blockade von unspezifischen Bindungen durch Zugabe von Cohn II für 10 Minuten bei 4 °C und die intrazelluläre Färbung für 30 Minuten bei 4 °C. Vor der Analyse am Durchflusszytometer „LSRII“ wurde zwei Mal mit Perm Buffer gewaschen.

3.1.4 Isolierung humaner CD4⁺PD-1⁺ Zellen

Die mittels MACS aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen wurden in 1 mL PBS 1% Serum aufgenommen und mit folgenden Oberflächenantikörpern gefärbt: CD127 AF488, CTLA-4 PE, PD-1 PerCP/Cy5.5, CD25 PE/Cy7 und CD4 APC. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C. Im Anschluss wurde mit 10 mL PBS 1% Serum gewaschen und die

Zellen in 500 µL PBS 1% Serum aufgenommen, um sie durch einen zuvor befeuchteten Filter zu geben. Dieser wurde mit 500 µL PBS 1% Serum gewaschen, um ein Endvolumen von 1 mL PBS 1% Serum zu erhalten. Die auf diese Weise vorbereiteten CD4⁺ T-Zellen wurden am Durchflusszytometer „FACSariaIII“ in die zwei Populationen CD4⁺CD25⁻CD127^{high}PD-1⁺ und CD4⁺CD25⁻CD127^{high}PD-1⁻ aufgetrennt und für folgende *in vitro* Experimente verwendet.

3.1.5 Proliferationsversuche

PBMCs oder sortierte T-Zellen wurden direkt nach der Isolation in cRPMI aufgenommen und in 96-*well* Platten mit Rundboden gegeben. Um die Antigen-spezifische Antwort der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit Schizontenextrakt (infizierte rote Blutkörperchen; iRBC) stimuliert. Die Kultivierung von PBMCs erfolgte dabei bei einer Konzentration von 1×10⁶ Zellen/mL. Um die Fähigkeit PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen, autologe CD4⁺ T-Zellen zu supprimieren, zu ermitteln, wurden 1,25×10⁵ CD4⁺ T-Zellen/mL mit iRBCs stimuliert und sortierte PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen in verschiedenen Konzentrationen hinzu gegeben. Nach 120 Stunden erfolgte die Entnahme von 80 µL des Überstands für potentielle folgende Analysen. Die Zellen wurden mit 1 µCurie/mL ³H-Thymidin für 18 Stunden gepulst. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, indem sie auf Glasfaserfilter gebracht wurden. Zur Ermittlung der Proliferation wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem Thymidin durch einen Szintillationszähler ermittelt.

3.1.6 Herstellung von Schizontenextrakt

Das Ausgangsmaterial des Schizontenextrakts war eine Kultur des *Plasmodium falciparum* Stammes 3D7. Die Kultur wurde zunächst 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zur Abschätzung der Parasitämie wurde eine geringe Menge des Pellets in einem dünnen Film auf einem Objektträger aufgetragen und eine Wright-Färbung durchgeführt. 1 mL der Färbelösung wurde für 3 Minuten auf den Ausstrich gegeben. Im Anschluss wurden 2 mL destilliertes Wasser hinzu gegeben

und für 6 Minuten inkubiert. Es wurde gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Nachdem der gefärbte Ausstrich getrocknet war, erfolgten eine Bestimmung der Parasitämie und eine Abschätzung des Anteils der Schizonten. Das Pellet wurde über eine LD Säule gegeben, die vorher mit 1 mL PBS 1% Serum gespült wurde. Es wurde so lange mit kaltem PBS 1% Serum gespült bis der Durchfluss vollkommen klar war. Nach der Entnahme der Säule aus dem Magneten wurde 3 mL PBS hinzu gegeben und die angereicherten Schizonten mit dem Stempel aus der Säule entfernt. Es wurde wiederum 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert, die Zellzahl im Pellet bestimmt und mittels Wright-Färbung der Anteil an Schizonten und Trophozoiten bestimmt. Dieser lag mindestens bei 75-80%. Es wurde auf 4×10^7 Zellen pro mL in PBS eingestellt und Aliquots bei -70 °C gelagert.

3.1.7 Bestimmung von Zytokinkonzentrationen im Plasma

Zytokinkonzentrationen im Plasma wurden mit dem LEGENDplex™ *Human Th Cytokine Panel* (13-plex) bestimmt.

3.2 Diagnostische Methoden

3.2.1 Malaria Schnelltest

Die Ermittlung einer potentiellen *Pf* Malariainfektion bei den Probanden der Ghana Studie erfolgte mittels CareStart™ Malaria HRP2 (PF) Schnelltest. Dieser Schnelltest detektiert Malaria Antigen im peripheren Blut.

3.2.2 Ermittlung der Parasitämie

Parasitämien von Probanden der Ghana Studie wurden mittels 4% Giemsa Färbung bestimmt. Die Auswertung erfolgte unter einer Öl Immersion und 100x Vergrößerung.

3.3 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde die Software GraphPad Prism 5 genutzt. Eine vergleichende Analyse zweier Gruppen erfolgte mittels Student's t-Test oder Mann-Whitney-U-Test jeweils mit 95% Konfidenzintervall, für drei Gruppen oder mehr wurde eine ANOVA mit Tukey's Post-Test durchgeführt. Potentielle Korrelationen wurden mittels Pearson Korrelation bestimmt. Für die statistische Signifikanz wurden folgende Bezeichnungen gewählt: $p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***. Die Bezeichnung „ns“ bedeutet nicht statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Hierarchisches Expressionsmuster der Koinhibitoren

Koinhibitoren spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der immunologischen Balance. Um einen Überblick über die Expression der koinhibitorischen Moleküle auf CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria zu erhalten, wurde Vollblut von *Pf* Malaria Patienten und gesunden Kontrollen auf PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 gefärbt. Dabei ist die Expression aller vier Koinhibitoren auf CD4⁺ T-Zellen höher während *Pf* Malaria als bei gesunden Kontrollen (Abb. 4). Die detailliertere Auswertung dieser durchflusszytometrischen Daten zeigt eine Art hierarchisches Expressionsmuster der vier Koinhibitoren. Wie in Abb. 4B zu sehen ist, werden PD-1 und CTLA-4 in der Infektion dabei zu einem großen Maße koexprimiert. Beide weisen auch die höchste Expression aller Koinhibitoren auf. LAG-3 wird primär von PD-1⁺CTLA-4⁺ CD4⁺ Zellen und zu einem geringeren Maße von PD-1⁺CTLA-4⁻ und PD-1⁻CTLA-4⁺ CD4⁺ Zellen exprimiert. Der Großteil der Tim-3⁺ Zellen ist ebenfalls in dem PD-1⁺CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zell-Kompartiment zu finden. Eine geringe Expression von Tim-3 ist dazu auf PD-1⁺CTLA-4⁻ und PD-1⁻CTLA-4⁻ CD4⁺ Zellen zu beobachten. Tim-3 weist in dem Vergleich der vier Koinhibitoren allgemein die geringste Expression auf.

In gesunden Kontrollen werden alle Koinhibitoren auf einem niedrigeren Niveau exprimiert als in *Pf* Malaria Patienten. Darüber hinaus sind PD-1⁺CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen nur in sehr geringen Anteilen zu finden (Abb. 4B) und auch die für PD-1 und CTLA-4 einzel-positiven CD4⁺ T-Zellen kommen nur in geringen Anteilen vor. Eine Expression von LAG-3 und Tim-3 ist bei gesunden Kontrollen nicht vorhanden.

Ergebnisse

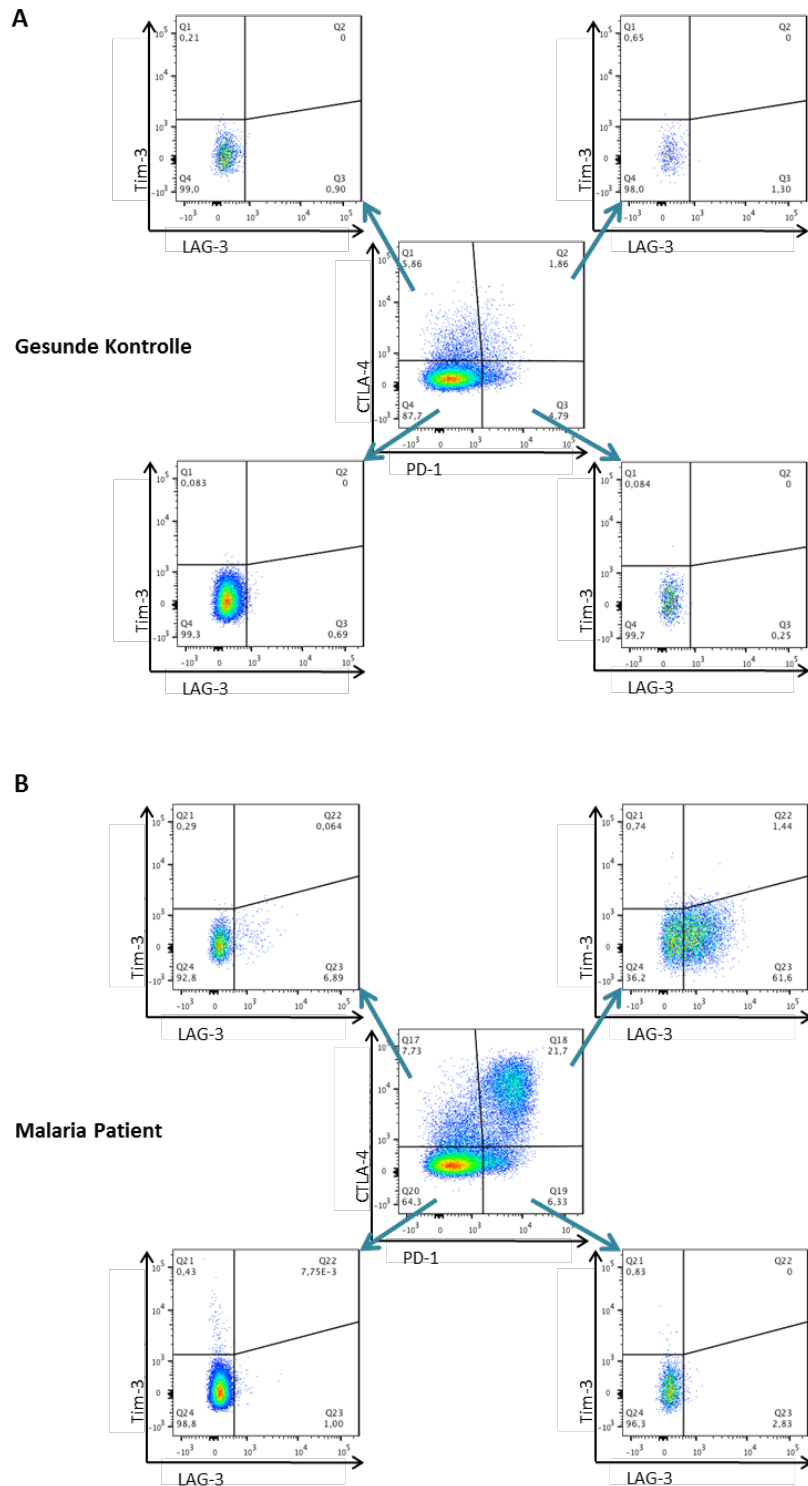


Abb. 4: Hierarchisches Expressionsmuster der koinhibitorischen Rezeptoren während einer *Pf* Malaria.

Ausgehend von der Expression von PD-1 und CTLA-4 auf CD3⁺CD4⁺ Zellen wurde die Expression von LAG-3 und Tim-3 in den vier verschiedenen Quadranten analysiert. Exemplarische Darstellung einer repräsentativen Färbung A einer gesunden Kontrolle und B eines *Pf* Malaria Patienten. Vollblut wurde oberflächlich auf CD4, PD-1, LAG-3 und Tim-3 sowie intrazellulär auf CD3 und CTLA-4 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

4.2 Erhöhte Expression von Koinhibitoren auf CD4⁺ T-Zellen in *Pf* Malaria

Die Expression von koinhibitorischen Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen könnte eine wichtige Rolle in der Immunregulation während der *Pf* Malaria spielen. Um zu ermitteln, welche Koinhibitoren während der *Pf* Malaria exprimiert werden und ob diese Expressionsmuster Malaria-spezifisch sind, wurde Vollblut von gesunden Kontrollen, *Pf* Malaria Patienten sowie von Patienten mit unterschiedlichen Leber- und Virus-Erkrankungen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3 und BTLA untersucht. Dabei wurde der Fokus auf CD4⁺ T-Zellen gelegt. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen ist die Expression von PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 auf CD4⁺ T-Zellen von Probanden mit *Pf* Malaria signifikant erhöht (Abb. 5). Darüber hinaus weisen CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit Primär Biliärer Cholangitis (PBC), Primär Sklerosierender Cholangitis (PSC), Autoimmunhepatitis (AIH), Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) unbehandelt und behandelt, Hepatitis-B-Virus (HBV) und Hepatitis-C-Virus (HCV) Erkrankungen ebenfalls eine geringere Expression von Koinhibitoren auf als CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit *Pf* Malaria. Eine herausragende Rolle spielt dabei LAG-3, das ausschließlich während der *Pf* Malaria exprimiert wird, in allen anderen untersuchten Vergleichsgruppen jedoch abwesend ist. BTLA zeigt im Vergleich zu gesunden Kontrollen dagegen eine tendenziell niedrigere Expression in der *Pf* Malaria und ist in den Lebererkrankungen PBC, PSC und AIH noch niedriger exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich eine *Pf* Malaria-spezifische erhöhte Expression der Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 feststellen.

Ergebnisse

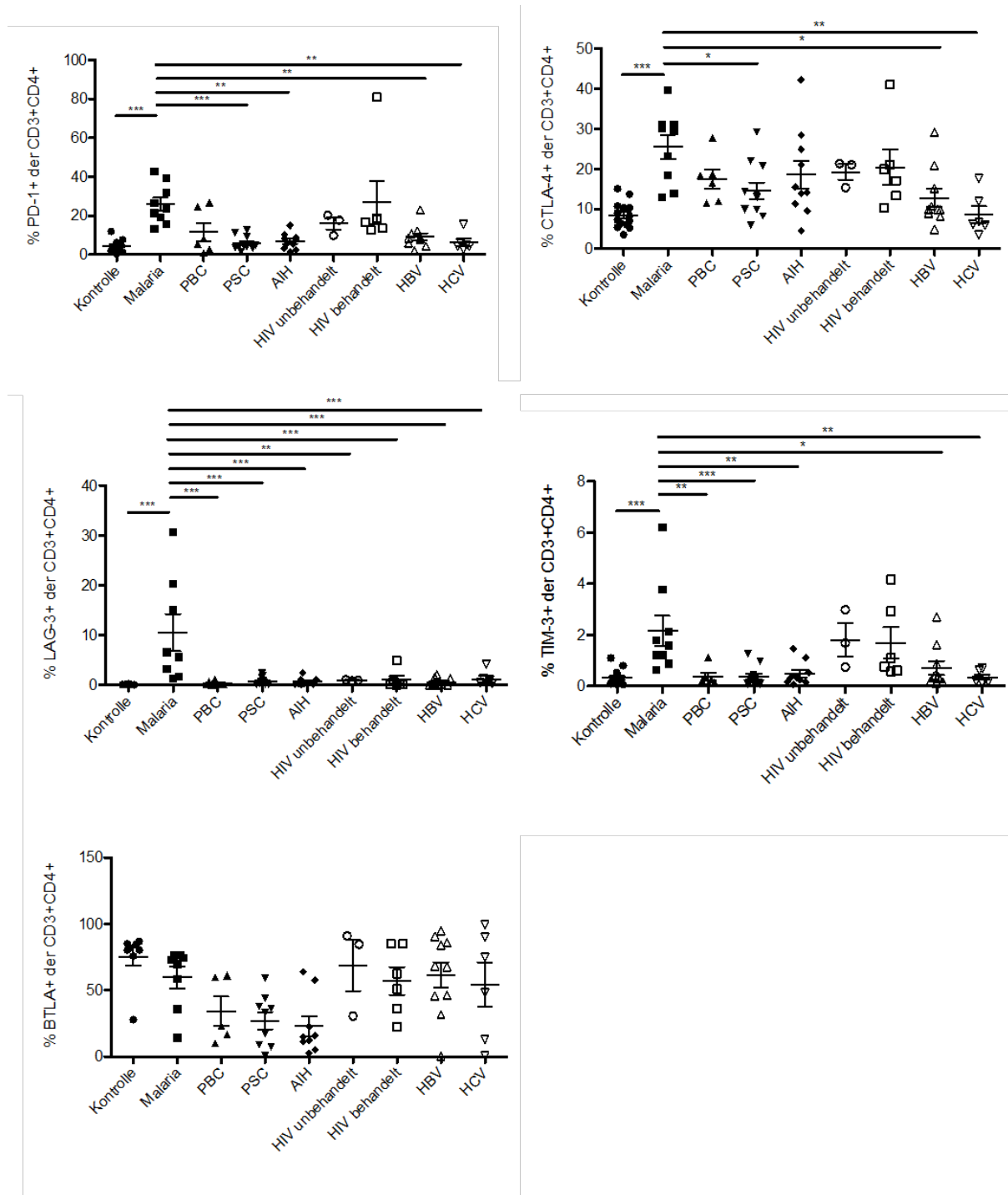


Abb. 5: Malaria-spezifische hohe Expression von PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 auf CD3+CD4+ T-Zellen.

Vollblut von gesunden Kontrollen sowie von Patienten mit *Pf* Malaria, PBC, PSC, AIH, HIV behandelt und unbehandelt, HBV und HCV wurde oberflächlich auf CD4, PD-1, LAG-3, Tim-3 und BTLA sowie intrazellulär auf CD3 und CTLA-4 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert ($n_{\text{Kontrolle}} = 11$, $n_{\text{Malaria}} = 9$, $n_{\text{PBC}} = 5$, $n_{\text{PSC}} = 9$, $n_{\text{AIH}} = 9$, $n_{\text{HIVunbeh.}} = 3$, $n_{\text{HIVbeh.}} = 6$, $n_{\text{HBV}} = 9$, $n_{\text{HCV}} = 6$). Statistische Signifikanzen wurden mittels *One-way ANOVA* mit *Tukey's Multiple Comparison Test* und 95% Konfidenzintervallen ermittelt und zur besseren Übersicht nur in Bezug auf die Malaria Gruppe gezeigt.

4.3 CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria weisen einen aktivierten Phänotyp auf

In vielen Veröffentlichungen unter anderem über verschiedene Infektionsmodelle wird CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die Koinhibitoren exprimieren, ein erschöpfter Phänotyp zugesprochen (VELU *et al.*, 2015; BONI *et al.*, 2007; PENNA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008). Um zu ermitteln, ob CD4⁺ T-Zellen während der *Pf* Malaria ebenfalls erschöpft sind, wurde Vollblut von gesunden Kontrollen, *Pf* Malaria Patienten sowie von den bereits beschriebenen Patienten mit Leber- und Virus-Erkrankungen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der Aktivierungsmarker Ki-67, CD69, CD127, CD39 und Granzym B untersucht (Abb. 6). Ki-67 wurde als Proliferationsmarker verwendet, CD69 ist ein Aktivierungsmarker. CD127 ist die IL-7-Rezeptor α -Kette und wurde zur Unterscheidung von Gedächtnis-T-Zellen, T_{regs} und Effektor-T-Zellen verwendet. Dahingegen sind die Ektonukleotidase CD39 und das zytotoxische Molekül Granzym B Effektormoleküle. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen sowie Patienten mit PBC, PSC, AIH, HIV, HBV und HCV Erkrankungen proliferieren CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria signifikant stärker, was an der höheren Expression von Ki-67 zu erkennen ist. Der frühe Aktivierungsmarker CD69 zeigt keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen. Gleiches gilt für die Ektonukleotidase CD39. Im Falle von der Serinprotease Granzym B sind ebenfalls keine signifikanten Expressions-Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zu beobachten. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen ist die Expression von CD127 geringer auf CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria. Diese niedrigere Expression deutet auf eine größere Anzahl von T_{regs} und T-Effektor-Zellen hin. Werden die genannten Aktivierungsmarker in Betracht gezogen, lässt sich somit kein erschöpfter Zustand der CD4⁺ T-Zellen während der *Pf* Malaria feststellen.

Ergebnisse

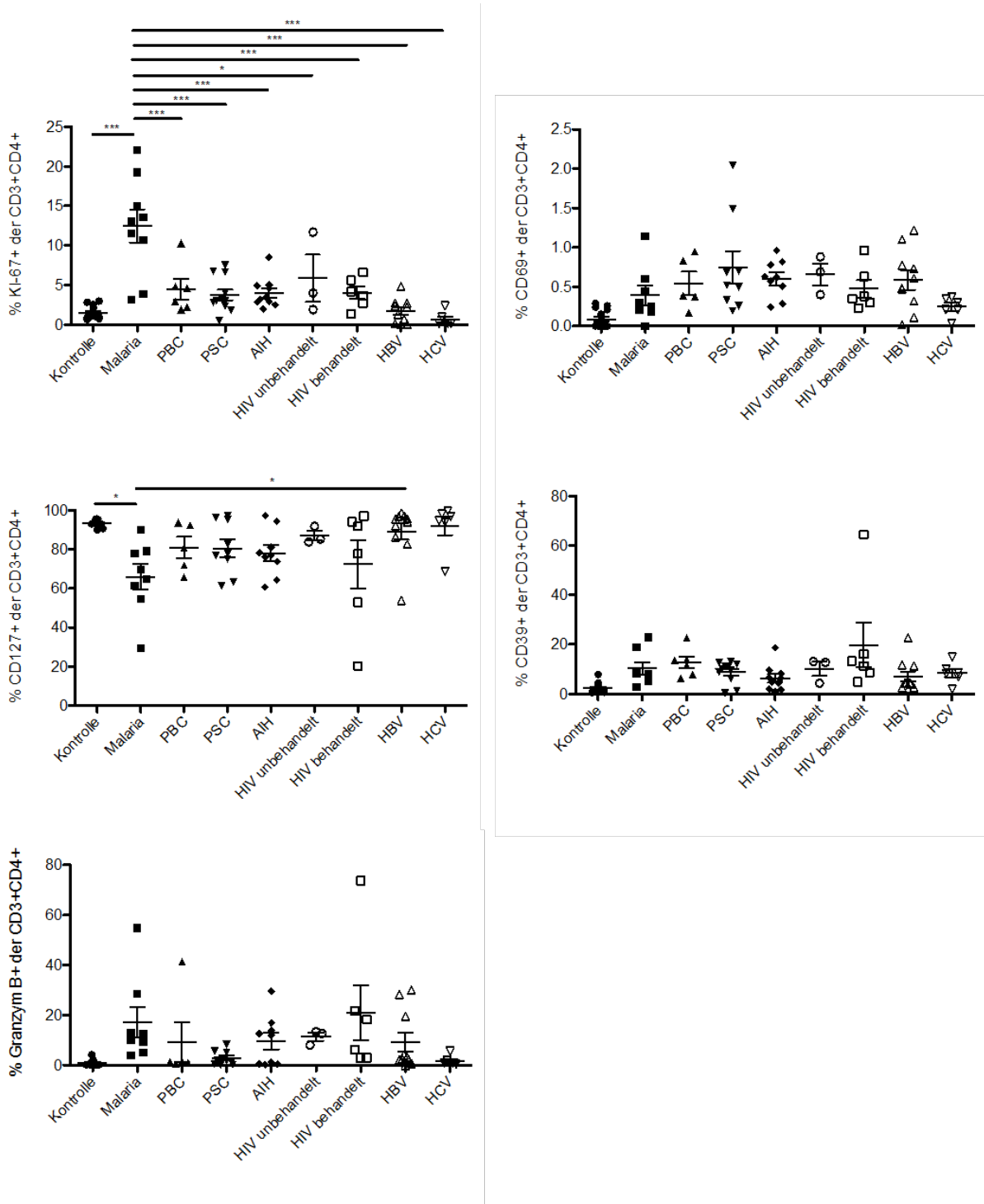


Abb. 6: CD3⁺CD4⁺ T-Zellen weisen während der *Pf* Malaria eine hohe Aktivierung auf.

Vollblut von gesunden Kontrollen sowie von Patienten mit *Pf* Malaria, PBC, PSC, AIH, HIV behandelt und unbehandelt, HBV und HCV wurde oberflächlich auf CD4, CD69, CD127 und CD39 sowie intrazellulär auf CD3, Ki-67 und Granzym B gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert ($n_{\text{Kontrolle}} = 11$, $n_{\text{Malaria}} = 9$, $n_{\text{PBC}} = 5$, $n_{\text{PSC}} = 9$, $n_{\text{AIH}} = 9$, $n_{\text{HIVunbeh.}} = 3$, $n_{\text{HIVbeh.}} = 6$, $n_{\text{HBV}} = 9$, $n_{\text{HCV}} = 6$). Statistische Signifikanzen wurden mittels *One-way ANOVA* mit *Tukey's Multiple Comparison Test* und 95% Konfidenzintervallen ermittelt und zur besseren Übersicht nur in Bezug auf die Malaria Gruppe gezeigt.

4.4 Der Grad der Koexpression ist abhängig von der Schwere der Symptome einer Pf Malaria

Während der Pf Malaria werden Koinhibitoren, wie in Abb. 4 gezeigt, koexprimiert. Um diese Koexpression anschaulicher darzustellen und zu verdeutlichen, welche Koinhibitoren in welchem Maße koexprimiert werden, wurden die durchflusszytometrischen Daten mit Hilfe der Software *Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations* (SPICE) analysiert. Die Darstellung erfolgt in Tortendiagrammen (Abb. 7). Die Farbe der Tortenstücke verdeutlicht die Anzahl der in dem jeweiligen Kompartiment exprimierten Koinhibitoren (von blau = 0 Koinhibitoren bis dunkel rot = 5 Koinhibitoren). Die Farbe der Bögen um das Diagramm herum stellt dar, welcher Koinhibitor explizit exprimiert wird. Repräsentative Beispiele für einen Patienten mit schwereren Symptomen, einen Patienten mit leichteren Symptomen und eine gesunde Kontrolle wurden ausgewählt. Deutlich wird, dass in der Pf Malaria mit schwereren Symptomen generell eine größere Anzahl an Koinhibitoren induziert wird. Diese Beobachtung kann sowohl für CD4⁺ T-Zellen als auch für CD8⁺ T-Zellen gemacht werden. Des Weiteren gibt es eine größere Anzahl an Zellpopulationen, die verschiedene Koinhibitoren koexprimieren. Bei dem Großteil der Zellen, die nur einen einzigen Koinhibitor exprimieren, handelt es sich bei diesem Koinhibitor um BTLA. Bemerkenswerterweise weisen sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen trotz Koexpression mehrerer Koinhibitoren in schwerer Malaria eine Expression von Ki-67 auf. Somit sollten sie in der Lage sein zu proliferieren.

Ergebnisse

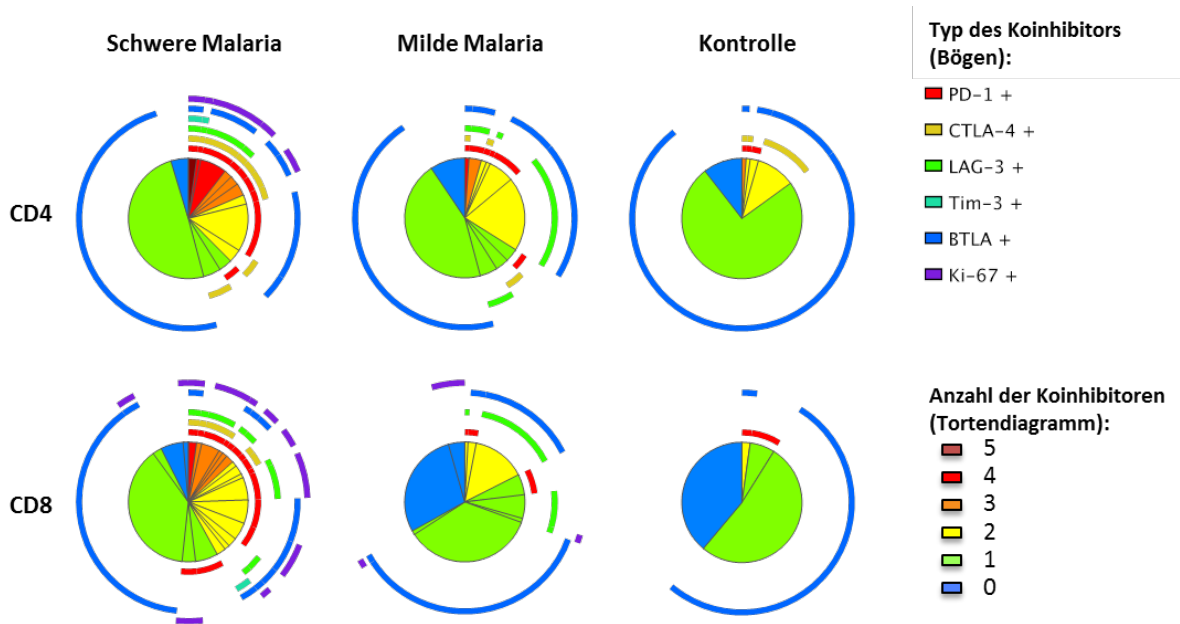


Abb. 7: Höhere Koexpression von Koinhibitoren in schwerer Malaria als in milder Malaria in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Die Farbe der Tortendiagramme verdeutlicht die Anzahl der exprimierten Koinhibitoren auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die Farbe der Bögen um die Diagramme herum zeigt welcher Koinhibitor oder Ki-67 in welchem Kompartiment exprimiert wird. Je schwerer die Erkrankung ist, desto mehr Koinhibitoren werden exprimiert und desto mehr Koexpression ist vorhanden. Exemplarische Darstellung repräsentativer Färbungen eines von drei Patienten mit schweren Symptomen, eines von fünf Patienten mit leichten Symptomen und einer von fünf gesunden Kontrolle. Vollblut wurde oberflächlich auf CD4, PD-1, LAG-3, Tim-3 und BTLA sowie intrazellulär auf CD3, CTLA-4 und Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Diagramme wurden mit dem Programm SPICE erstellt.

4.5 Unterschiedliche Kinetik der Expressionsmuster der Koinhibitoren

Ein unterschiedlicher Verlauf der Expression verschiedener Koinhibitoren und eine unterschiedliche Dynamik in der Regulation dieser Marker könnte Einfluss auf das Vorhandensein koexprimierender Zellpopulationen haben. Darüber hinaus könnte der Zeitpunkt der Probennahme einen Einfluss auf der Expressionsmuster haben. Im Falle einiger weniger Patienten konnte an mehreren Tagen eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt werden. Abb. 8 zeigt die die Expressionsmuster eines Patienten, der zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 13 Tagen beobachtet werden konnte. Es wurde an Tag 1 nach der ersten Behandlung sowie an Tag 6 und an Tag 13 die Expression der Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3 und

Ergebnisse

BTLA auf CD4⁺ T-Zellen ermittelt. Die fünf Koinhibitoren lassen sich dabei in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe besteht aus PD-1, CTLA-4 und LAG-3, die an Tag 1 deutlich exprimiert werden und bereits an Tag 6 kaum mehr zu ermitteln sind. Bis zu Tag 13 ist keine weitere Änderung des Expressionszustandes zu beobachten. Die zweite Gruppe, bestehend aus Tim-3 und BTLA, wird zwischen Tag 1 und Tag 6 hochreguliert, wird jedoch zwischen Tag 6 und Tag 13 wieder auf ein Niveau unter dem von Tag 1 herunterreguliert. Der hier dargestellte Patient zeigte zum Zeitpunkt der Diagnose eine Parasitämie von 26% sowie neurologische Symptome.

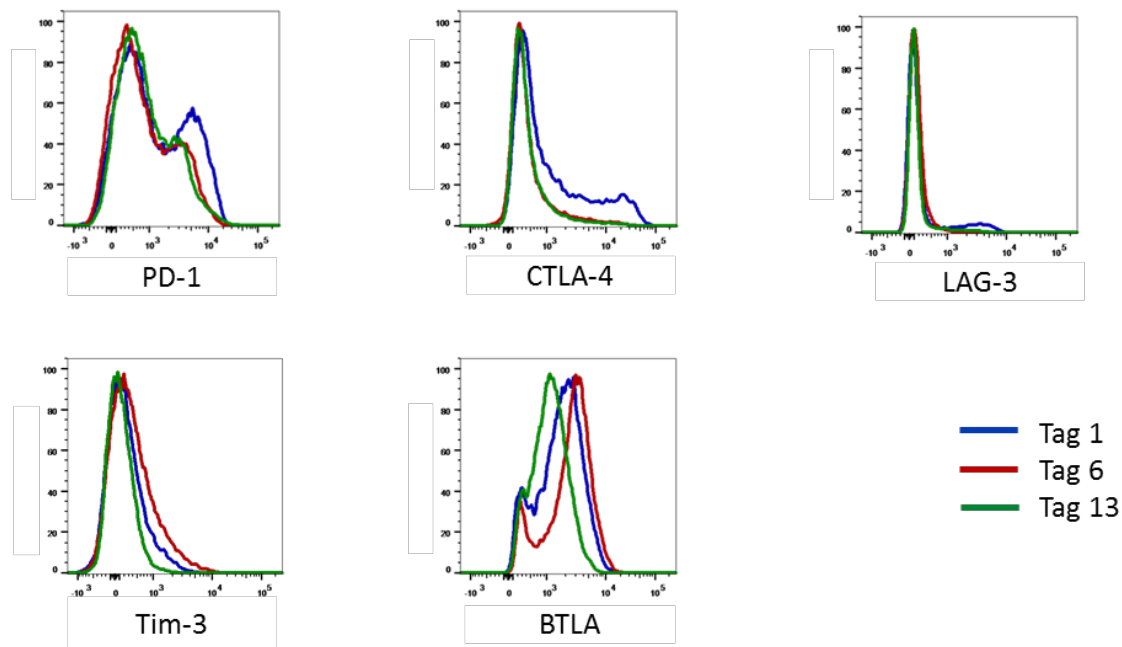


Abb. 8: Koinhibitorische Rezeptoren weisen eine unterschiedliche Kinetik auf.

Die Histogramme zeigen die Kinetik der Expressionmuster koinhibitorischer Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen. Vollblut eines *Pf* Malaria Patienten wurde an Tag 1, Tag 6 und Tag 13 nach der ersten Behandlung oberflächlich auf CD4, PD-1, LAG-3, Tim-3 und BTLA sowie intrazellulär auf CD3 und CTLA-4 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

4.6 Erhöhte Zytokinspiegel im Plasma von Patienten mit *Pf* Malaria

Für eine weitere Charakterisierung der Immunreaktionen während der *Pf* Malaria wurde das Plasma aus den Blutproben, die durchflusszytometrisch analysiert wurden, entnommen und mittels LEGENDplex auf das Vorhandensein verschiedener Zytokine untersucht (Abb. 9). Auffällig ist ein durchweg höherer Zytokinspiegel während der Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 9A). Signifikante Unterschiede zwischen den zwei Gruppen konnten für IFN- γ , IL-10 und IL-17A detektiert werden. Im Falle von IL-2, IL-6, TNF- α und IL-22 ist eine tendenziell höhere Ausschüttung der Zytokine bei *Pf* Malaria Patienten als bei gesunden Kontrollen zu beobachten. Die Konzentration der Zytokine hängt dabei nicht von der Höhe der Parasitämie ab. Um dieses zu verdeutlichen, wurden die Datenpunkte mit verschiedenen Farben markiert. Grün zeigt Parasitämien $< 1\%$ an, gelb Parasitämien von $1 \leq 5\%$ und rot Parasitämien von $> 5\%$. Rauten stellen einen Patienten mit zerebraler Symptomatik dar. Die entsprechenden Werte dieses Patienten liegen dabei jedoch für kein Zytokin auf einem besonders hohen oder besonders niedrigen Niveau.

IFN- γ ist ein charakteristisches Zytokin für T_H1 Zellen und IL-10 gilt als Marker für T_H2 Zellen. Um das Verhältnis dieser zwei Zellpopulationen zueinander zu bestimmen, wurden die Konzentrationen von IFN- γ und IL-10 im Plasma der Patienten gegeneinander aufgetragen (Abb. 9B). In den analysierten Proben besteht jedoch keine Korrelation zwischen IFN- γ und IL-10.

Ergebnisse

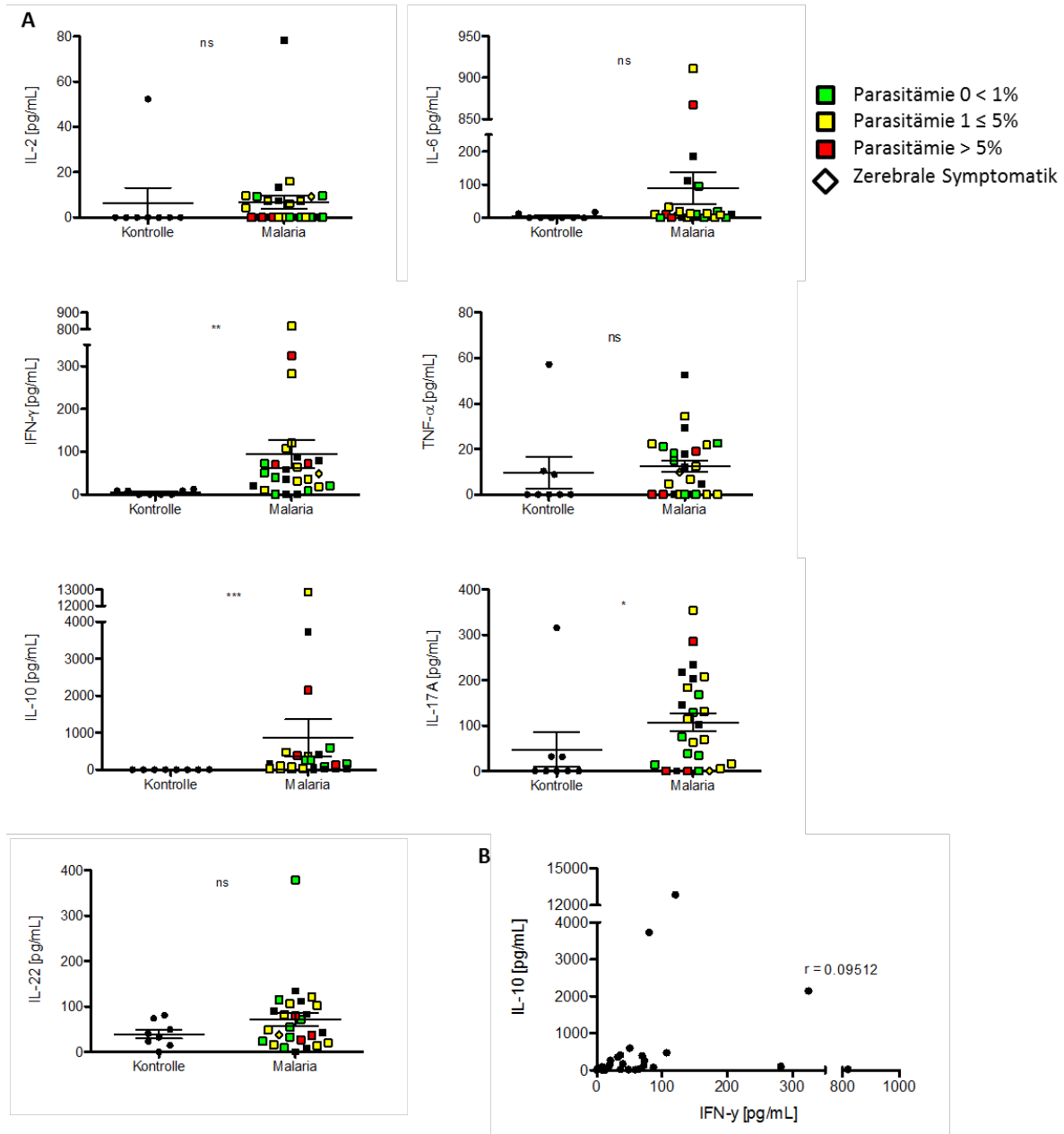


Abb. 9: Höhere Zytokin Konzentrationen im Plasma von *Pf* Malaria Patienten als von Kontrollen.

A Es wurden Plasma Proben von 8 gesunden Kontrollen und 26 Malaria Patienten analysiert. Die Konzentrationen von IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL17A und IL-22 wurden mittels LEGENDplex ermittelt. Statistische Signifikanzen wurden durch Student's t-Test bestimmt ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***). B Zur Ermittlung einer potentiellen Korrelation zwischen IFY- γ und IL-10 wurden die jeweils ermittelten Konzentrationen gegeneinander aufgetragen und mittels Pearson Korrelation untersucht.

4.7 PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen supprimieren autologe CD4⁺ T-Zellen *in vitro*

Wie bisher beschrieben, exprimieren CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria diverse Koinhibitoren, wobei viele dieser Koinhibitoren koexprimiert werden. Darüber hinaus weisen CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria einen aktivierten Phänotyp auf, proliferieren und exprimieren Effektormoleküle. Um die Funktion der Koinhibitor-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen weiter zu charakterisieren, wurden *in vitro* Studien durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen die Proliferation autologer CD4⁺ T-Zellen *in vitro* supprimieren können (Abb. 10; MACKROTH *et al.*, 2016). Darüber hinaus konnte eine Koexpression von PD-1 und CTLA-4 in dieser funktionellen CD4⁺ T-Zell-Population beobachtet werden. In Zusammenarbeit wurde die bereits beschriebene Suppression von PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen weiter untersucht. (MACKROTH *et al.*, 2016) Für diese Zwecke wurde eine Antigen-spezifische Stimulation mit Schizontenextrakt (iRBC) durchgeführt. Wie in Abb. 10 gezeigt, können PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen desselben Probanden auf das Niveau von unstimulierten CD4⁺ T-Zellen senken, wenn beide Zellpopulationen im Verhältnis von 1:1 kokultiviert werden. Wird die Menge an PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen um die Hälfte verringert, so proliferieren die autologen CD4⁺ T-Zellen zu einem größeren Maß als bei einem 1:1 Verhältnis. Einerseits kann die supprimierende Wirkung der PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen in einer polyklonalen Stimulation beobachtet werden (nicht gezeigt), andererseits tritt dieser Effekt obendrein in dieser Antigen-spezifischen Stimulation mit iRBC auf (Abb. 10). Weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus hinter dieser Suppression konnten bisher einige Faktoren ausschließen.

Ergebnisse

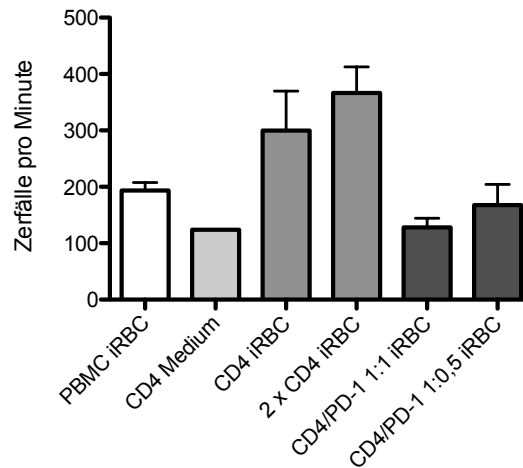


Abb. 10: PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen inhibieren die Proliferation von autologen CD4⁺ T-Zellen.

PBMCs, CD4⁺ T-Zellen und PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen eines *Pf* Malaria Patienten wurden isoliert und für 120 Stunden in verschiedenen Ansätzen wie in der Grafik gezeigt mit Schizontenextrakt (iRBC) stimuliert. Die Proliferation wurde durch Einbau von ³H-Thymidin ermittelt. Darstellung eines repräsentativen Experiments. Der Patient wies 30% PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen auf. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplikaten mit SEM.

4.8 CD4⁺ T-Zellen in der Pf Malaria weisen einen zytotoxischen Phänotyp auf

Ausgehend von der supprimierenden Kapazität PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen wurden als potenzieller Mechanismus verschiedene zytotoxische Marker untersucht. Hierfür wurden CD4⁺ T-Zellen auf die oberflächliche Expression des Degranulierungsmarkers CD107a sowie die intrazelluläre Expression von Perforin, einem zytolytischen Molekül, untersucht. Die Serinprotease Granzym B wurde bereits in Abschnitt 4.3 beschrieben. Das tendenziell höhere Vorhandensein von CD107a auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen in der Pf Malaria im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigt einen höheren Prozentsatz degranulierter Zellen auf (Abb. 11A). Perforin dagegen wird von signifikant höheren Mengen CD4⁺ T-Zellen während der Infektion als in gesunden Probanden produziert. Wird dazu Granzym B in Betracht gezogen, gibt es jedoch keine Unterschiede in den Anteilen Perforin⁺Granzym B⁺ CD4⁺ T-Zellen zwischen den untersuchten Gruppen.

Die durchflusszytometrische Analyse von Verlaufskontrollen eines Pf Malaria Patienten zeigt einen deutlichen Anstieg der Granzym B-Expression von Tag 3 bis Tag 4 nach der ersten Behandlung (Abb. 11B). Der hier gezeigte Patient weist eine bemerkenswert hohe Parasitämie von noch 20% am dritten Tag nach Behandlung auf. Zu diesem Zeitpunkt produzieren 17% der CD4⁺ T-Zellen Granzym B und es zeigt sich nur ein kleiner Anteil an Granzym B⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen. Einen Tag später, am Tag 4 und mit einer Abnahme der Parasitämie auf nur noch 3%, sind dagegen 88% der CD4⁺ T-Zellen Granzym B-Produzenten und 84% der CD4⁺ T-Zellen sind Granzym B⁺PD-1⁺. Am Tag 5, an dem die Parasitämie auf <1% gesunken ist, geht der Anteil Granzym B⁺ CD4⁺ T-Zellen auf 74% zurück, wobei ein Großteil weiterhin PD-1⁺ ist. Abb. 11B verdeutlicht darüber hinaus eine nur geringe Produktion von Granzym B und Perforin durch CD4⁺ wie CD8⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zu CD4⁺ T-Zellen zeigen CD8⁺ T-Zellen nur eine geringe Koexpression von Granzym B und PD-1 bei demselben Patienten.

Ergebnisse

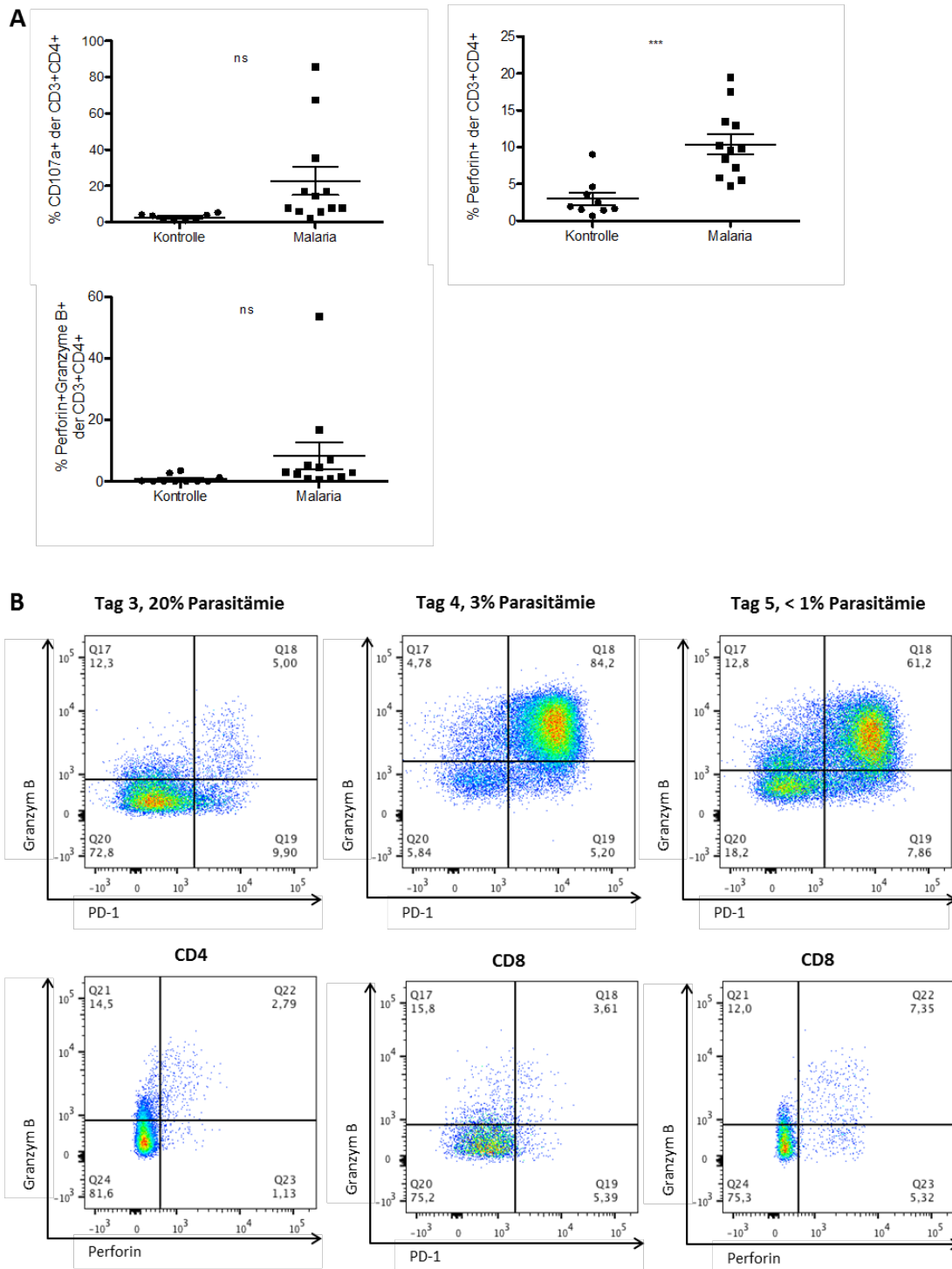


Abb. 11: Hohe Expression von zytotoxischen Markern in CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria.

A Vollblut von neun gesunden Kontrollen sowie von 12 Patienten mit *Pf* Malariainfektionen wurde oberflächlich auf CD4, PD-1 und CD107a sowie intrazellulär auf CD3, Perforin und Granzym B gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Statistische Signifikanzen wurden durch Student's t-Test bestimmt ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***). Der p Wert der Analyse von CD107a beträgt 0,0517, der von Perforin 0,1299. **B** Vollblut von einem *Pf* Malaria Patienten wurde an Tag 3, Tag 4 und Tag 5 nach der ersten Behandlung oberflächlich auf CD4, CD8 und PD-1 sowie intrazellulär auf CD3, Granzym B und Perforin gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Analyse bezieht sich auf CD3⁺ Lymphozyten und auf CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen.

4.9 Keine Induktion von CD49b während der Pf Malaria

Neben zytotoxischen Eigenschaften könnte auch Tr1 Phänotyp für die Suppression durch PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen verantwortlich sein. Tr1 Zellen werden unter anderem charakterisiert durch die Expression von CD4, LAG-3 und Tim-3 sowie durch die Produktion von IL-10. Da CD4⁺ T-Zellen in der Pf Malaria wie bereits beschrieben LAG-3 und Tim-3 exprimieren (Abb. 5) und im Plasma der Patienten IL-10 nachgewiesen werden kann (Abb. 9), wurde Vollblut von Pf Malaria Patienten und von gesunden Kontrollen auf Vorhandensein der von GAGLIANI und Kollegen beschriebenen Marker für Tr1 Zellen, LAG-3 und CD49b, untersucht (GAGLIANI *et al.*, 2013). Wie Abb. 12A verdeutlicht, konnte weder in gesunden Kontrollen noch in der Pf Malaria eine Koexpression der beiden Marker nachgewiesen werden. In gesunden Kontrollen wird nur CD49b exprimiert, in der Patientengruppe nur der zweite Tr1 Marker LAG-3.

Aus dem Grund, dass die fehlende Koexpression dieser Tr1 Marker bereits häufig in anderen Arbeiten beobachtet wurde, wurde ein alternativer Weg des Aufzeigens von Tr1 Zellen beschrieben. Die alternative Charakterisierung beschreibt Tr1 Zellen als CD127⁻CD25⁻. Wird diese Gating-Strategie auf die in diesem Projekt untersuchten Probanden angewandt, zeigt sich in diesem doppelt-negativen Zellkompartiment ebenfalls keine Koexpression von LAG-3 und CD49b (Abb. 12B). Ein Vergleich der Expression von PD-1 und CTLA-4 in der gesamten CD4⁺ Population sowie in der CD4⁺ CD127⁻CD25⁻ Population verdeutlicht dagegen eine Häufung der beiden Koinhibitoren in den vermeintlichen Tr1 Zellen im Vergleich zu der Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen von gesunden Kontrollen weisen, wie bereits in Abschnitt 4.2 beschrieben, generell eine niedrige Expression der Koinhibitoren auf.

Ein weiterer Koinhibitor, der von Tr1 Zellen exprimiert wird, ist TIGIT. Abb. 12C verdeutlicht einen signifikanten Anstieg an TIGIT⁺ CD4⁺ T-Zellen während der Pf Malaria im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Ergebnisse

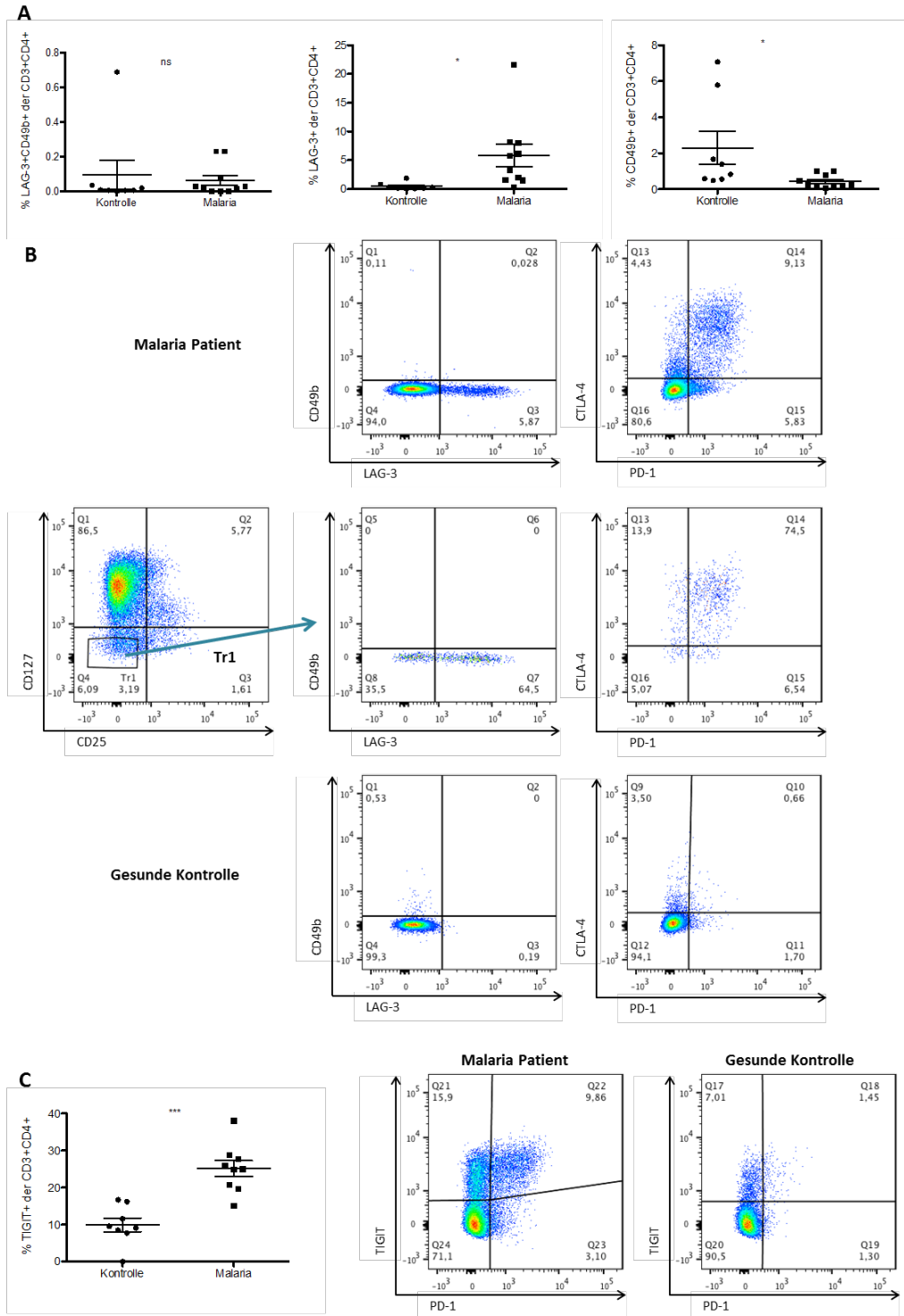


Abb. 12: Koinhibitoren sind angereichert in CD25-CD127⁻ CD4⁺ T- Zellen.

A Vollblut von 8 gesunden Probanden und 10 *Pf* Malaria Patienten wurde oberflächlich auf CD4, LAG-3 und CD49b sowie intrazellulär auf CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Statistische Signifikanzen wurden durch Student's t-Test bestimmt ($p < 0,05$, *; $p < 0,01$, **; $p < 0,001$, ***). **B** Vollblut von einem repräsentativen gesunden Probanden und einem repräsentativen *Pf* Malaria Patienten wurde oberflächlich auf CD4, LAG-4, CD49b, PD-1, CD127 und CD25 sowie intrazellulär auf CD3 und CTLA-4 gefärbt. Es werden Unterschiede in der Expression der Koinhibitoren in klassischen und alternativen Tr1 Zellen gezeigt. **C** Vollblut von 7 gesunden Probanden und 9 *Pf* Malaria Patienten wurde oberflächlich auf CD4, PD-1 und TIGIT sowie intrazellulär auf CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Statistische Signifikanzen wurden durch Student's t-Test bestimmt.

4.10 LAG-3 und Tim-3 zeigen ihre höchste Induktion in milder Pf Malaria, PD-1 und CTLA-4 werden in Infektionen mit schwereren Symptomen höher exprimiert

In einem weiteren Teilprojekt durchgeführt in Ghana wurde die Entwicklung von Toleranz und Immunität gegen Malaria evaluiert. Dazu wurden in diesem endemischen Gebiet vier Studiengruppen untersucht und miteinander verglichen. Die Kontroll-Gruppe bestand aus Kindern, deren Malaria Schnelltest negativ ausfiel und die somit kein Malaria Antigen im peripheren Blut aufweisen. Die weiteren drei Gruppen zeigten ein positives Ergebnis im Malaria Schnelltest. Eine Gruppe war symptomlos aber infiziert (*asymptomatic* = AS), die zweite konnte bei milden Symptomen ambulant behandelt werden (*outpatient department* = OPD) und die dritte Gruppe musste aufgrund der schwereren Symptome stationär behandelt werden (Ward). Zunächst wurde die Alterszusammensetzung der vier Gruppen statistisch analysiert. Aufgrund der Wahl der Schule, in der Kinder für die Studiengruppen Kontrolle und AS rekrutiert wurden, ergab sich ein homogenes Bild zwischen diesen zwei Gruppen, die Kinder unterschieden sich nicht in ihrem Alter (Abb. 13A). Probanden, die im Krankenhaus rekrutiert und wegen *Pf* Malaria behandelt wurden, waren im Schnitt jünger als die Kontrollen sowie AS Probanden. Zwischen den Gruppen OPD und Ward bestand ebenfalls kein signifikanter Altersunterschied. In der Zusammensetzung der Geschlechter fällt ein höherer Anteil weiblicher Probanden in den Gruppen Kontrolle, AS und OPD auf (Abb. 13B). Lediglich die Gruppe Ward bestand aus mehr männlichen als weiblichen Probanden. Der Malaria Schnelltest zeigte in der Kontroll-Gruppe keine Infektion mit *Plasmodium falciparum* auf und auch in den Blutaussstrichen ließen sich keine infizierten Erythrozyten nachweisen. Dagegen wiesen Ward Patienten eine signifikant höhere Parasitämie auf als OPD Patienten und die AS Gruppe (Abb. 13C).

Ergebnisse

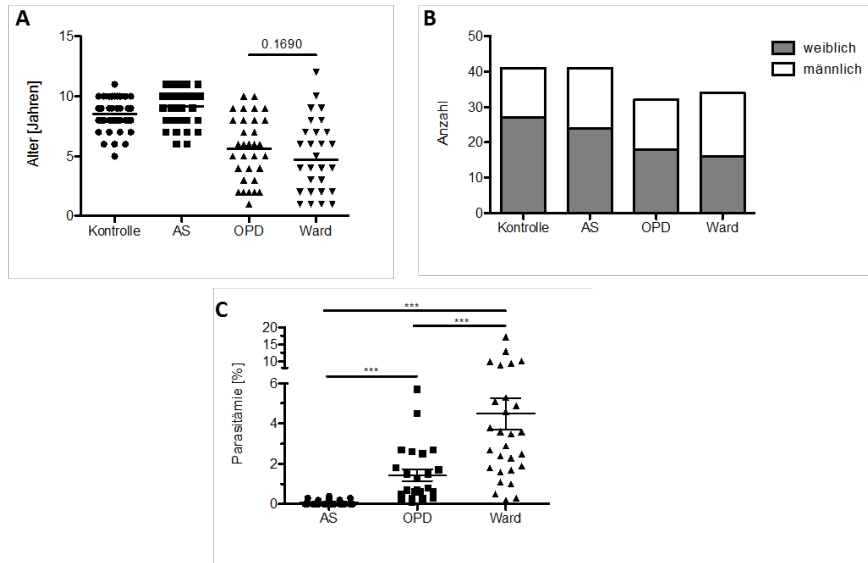


Abb. 13: Charakterisierung der für die Ghana Studie rekrutierten Probanden.

A Alter der eingeschlossenen Kinder in Jahren ('Kontrolle' 8.49 ± 0.210 $n=41$; 'AS' 9.146 ± 0.217 $n=41$; 'OPD' 5.656 ± 0.472 $n=32$; 'Ward' 4.706 ± 0.492 $n=34$). **B** Anteile der Mädchen in den vier Studiengruppen. Graue Balken repräsentieren weibliche Teilnehmer, weiße Balken männliche Teilnehmer. Die Gesamthöhe der Balken zeigt die Gesamtzahl. **C** Parasitämie aller Kinder, die ein positives Ergebnis im *Pf* Malaria Schnelltest zum Zeitpunkt der Diagnose (OPD und Ward) oder zum Zeitpunkt der Rekrutierung (AS) aufwiesen. Gesunde Kinder wiesen keine Parasitämie auf. Parasitämien wurden mit Giemsa Färbung von Blutausstrichen bestimmt. Potentielle Signifikanzen wurden durch den Mann-Whitney-U-Test mit 95% Konfidenzintervall bestimmt.

Einen weiteren Überblick über die beschreibenden Daten der Probanden gibt Tab. 12. Die Daten wurden jeweils zum Zeitpunkt der Rekrutierung gesammelt. Sie zeigt die Werte für das Alter der Probanden, den Anteil weiblicher Probanden sowie die Ergebnisse des Schnelltests und der Auswertung der Parasitämie.

Tab. 12: Überblick der deskriptiven Daten der eingeschlossenen Probanden.

Unterschiede in der Gesamtzahl der analysierten Proben für die unterschiedlichen Methoden entstanden durch Probleme im korrekten Transport der Proben. Die Daten wurden mit Hilfe von Fragebögen, einem *Pf* Malaria Schnelltest und Blutausstrichen mit Giemsa Färbung gesammelt.

Gruppe	Anzahl	Alter [Jahre]	Mädchen/gesamt (Prozent)	Schnelltest	Ausstrich	Parasitämie
Kontrolle	41	8.488 ± 0.210 $N=41$	27/41(65.85%)	alle negativ	alle negativ	-
AS	41	9.146 ± 0.217 $N=41$	24/41(58.54%)	alle positiv	15 positiv/ 26 nicht detektierbar	0.07 ± 0.02 $N=41$
OPD	32	5.656 ± 0.472 $N=32$	18/32(56.25%)	alle positiv	alle positiv	1.43 ± 0.29 $N=24$
Ward	34	4.706 ± 0.492 $N=34$	16/35(45.71%)	alle positiv	alle positiv	4.49 ± 0.79 $N=28$

Ergebnisse

Nachfolgend wurden zur Einschätzung des Immunstatus der Probanden durchflusszytometrisch die Anteile der CD4⁺ Zellen an den CD3⁺ Zellen bestimmt. Wie Abb. 14A zeigt, sind die CD4⁺ T-Helferzellen zwischen den vier Gruppen gleich verteilt. Des Weiteren wurde die Expression der Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 analysiert. Dabei lässt sich eine deutliche Einteilung der Koinhibitoren in zwei Gruppen erkennen (Abb. 14B). PD-1 und CTLA-4 sind von CD4⁺ T-Zellen von Kindern mit schwereren Symptomen (Ward) am höchsten exprimiert. Dahingegen zeigen LAG-3 und Tim-3 auf CD4⁺ T-Zellen von Kindern mit mildereren Symptomen (OPD) ihre höchste Expression. Innerhalb dieser zwei Expressionsgruppen bestehen Korrelationen zwischen den Koinhibitoren. Wie Abb. 14C verdeutlicht, korrelieren die Anteile PD-1⁺ und CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen miteinander ($r = 0,7675$). Auch die Expression von LAG-3 und Tim-3 steht in Abhängigkeit zueinander ($r = 0,6821$).

Ergebnisse

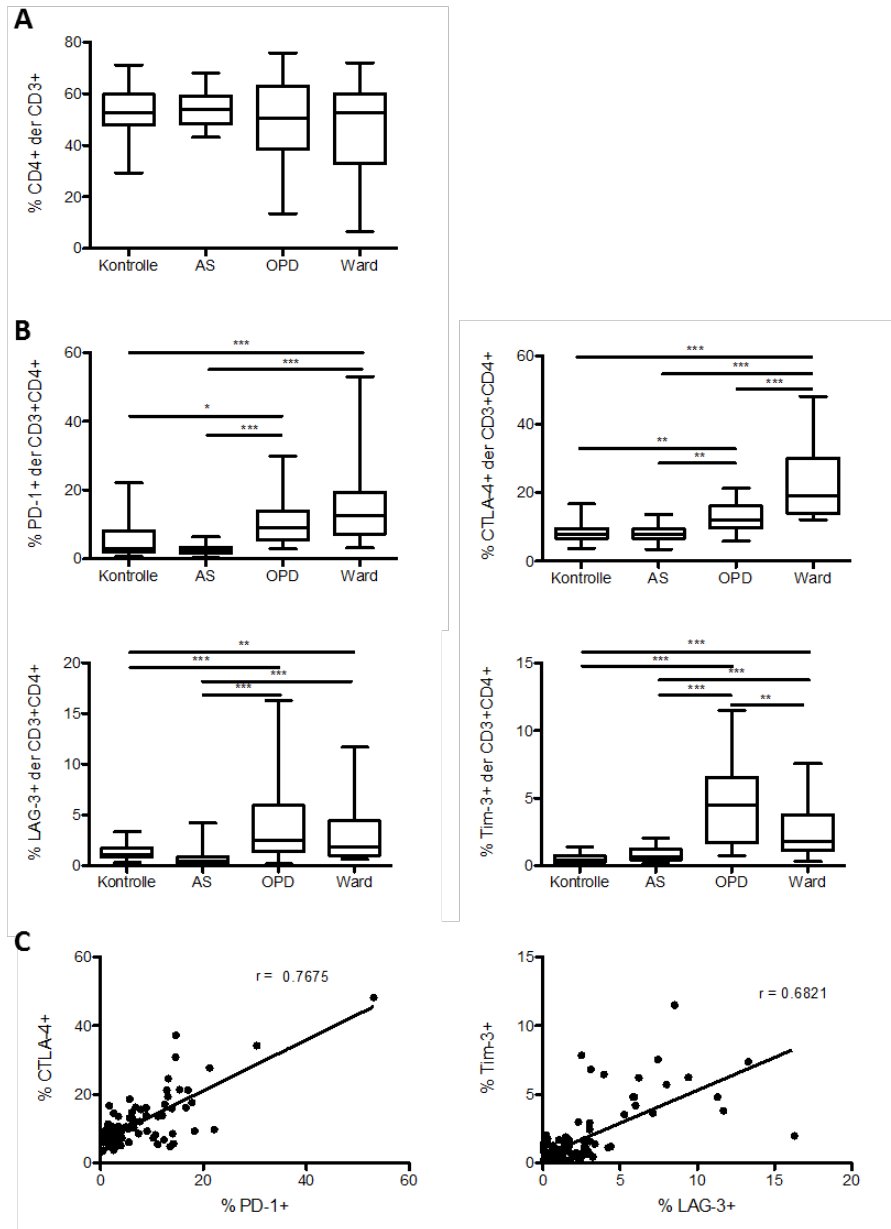


Abb. 14: Malaria Erkrankungen mit milden Symptomen führen zu einer hohen Induktion von LAG-3 und Tim-3 wohingegen PD-1 und CTLA-4 in der *Pf* Malaria mit schwereren Symptomen höher induziert werden.

Vollblut von 41 Kontroll-Probanden, 41 AS Probanden, 32 OPD Patienten und 34 Ward Patienten wurde auf verschiedene Oberflächenmarker sowie intrazelluläre Marker gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Potentielle Signifikanzen wurden durch *One-way ANOVA* mit *Tukey's Multiple Comparison Test* und 95% Konfidenzintervallen bestimmt. Potentielle Korrelationen wurden durch Pearson Korrelationen ermittelt. **A** Es wurde eine Oberflächenfärbung von CD4 sowie eine intrazelluläre Färbung auf CD3 durchgeführt. **B** Es wurde eine Oberflächenfärbung von CD4, PD-1, LAG-3 und Tim-3 sowie eine intrazelluläre Färbung auf CD3 und CTLA-4 durchgeführt. **C** Es wurde eine Oberflächenfärbung von CD4, PD-1, LAG-3 und Tim-3 sowie eine intrazelluläre Färbung auf CD3 und CTLA-4 durchgeführt. Alle vier Studiengruppen wurden zusammen analysiert.

4.11 Korrelation zwischen Parasitämie und PD-1⁺ sowie CTLA-4⁺ CD4⁺

T-Zellen

Nachdem die Abhängigkeit der Koinhibitoren von der Schwere der Symptome gezeigt werden konnte (Abb. 14), wurde eine potentielle Korrelation von Parasitämie und Expression der vier Koinhibitoren ermittelt. Es ergab sich eine Korrelation von PD-1 und CTLA-4 mit der Parasitämie der Probanden (PD-1: $r = 0,3397$; CTLA-4: $r = 0,4087$) (Abb. 15). Dagegen werden LAG-3 und Tim-3 nicht von der Parasitämie beeinflusst (LAG-3: $r = 0,2004$; Tim-3: $r = -0,1355$).

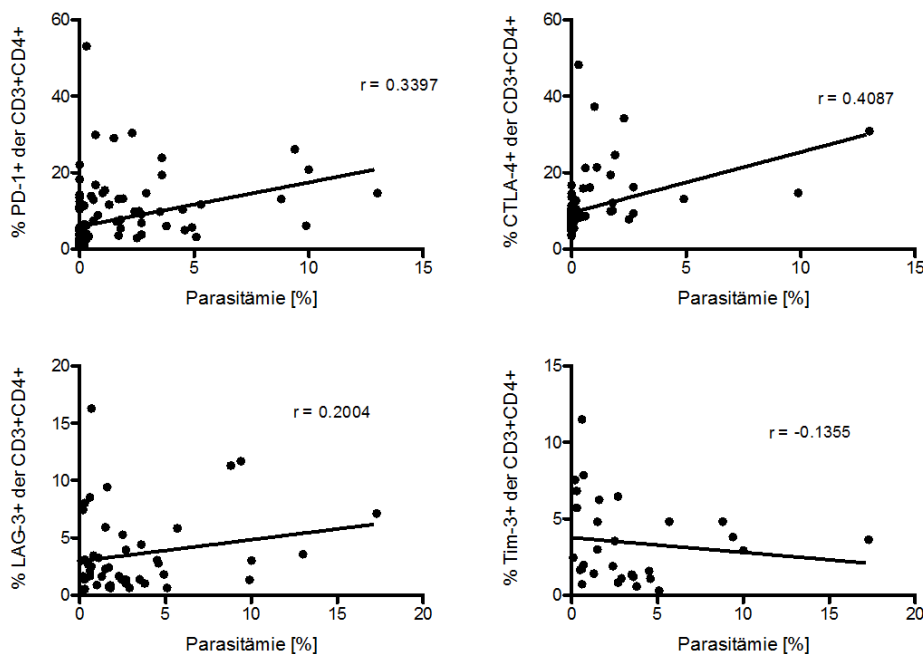


Abb. 15: Prozente an PD-1⁺ und CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen korrelieren mit der Parasitämie.

Die in Abb. 14B ermittelten Anteile CD4⁺ T-Zellen, die positiv sind für Koinhibitoren, wurden mit der Parasitämie der Probanden in Bezug gesetzt. Korrelationsanalysen wurden mittels Pearson Korrelationstest durchgeführt. Im Falle von PD-1 beträgt der p Wert 0,0001 (***), bei CTLA-4 ist er < 0,0001 (***). LAG-3 (p Wert 0,1768) und Tim-3 (p Wert 0,4753) korrelieren nicht mit der Parasitämie.

4.12 Höhere Expression von Aktivierungsmarkern von CD4⁺ T-Zellen in milder Pf Malaria als in Infektionen mit schwereren Symptomen

Ergänzend zu der Analyse der Koinhibitoren wurden auch in der Ghana Studie Aktivierungsmarker untersucht. Dabei konnte eine generell höhere Expression verschiedener Aktivierungsmarker durch CD4⁺ T-Zellen in milden Infektionen als in den drei Vergleichsgruppen gezeigt werden (Abb. 16A). Im Falle des allgemeinen Aktivierungsmarkers CD38, das in die Regulation von intrazellulärem Kalzium involviert ist, und auch von Ki-67 konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dagegen zeigen CD69, CD39 und Granzym B in milden Verläufen von *Pf* Malaria die höchste Expression. In schwereren Verläufen, asymptomatisch infizierten Kindern und Kontrollen ist die Expression dieser Aktivierungsmarker signifikant niedriger.

Im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen weist Granzym B im CD8⁺ T-Zell-Kompartiment eine tendenziell höhere Expression in schwereren als in milden Verläufen auf (Abb. 16B). Im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe und zu der AS-Gruppe ist die Expression von Granzym B in CD8⁺ T-Zellen signifikant höher.

Ergebnisse

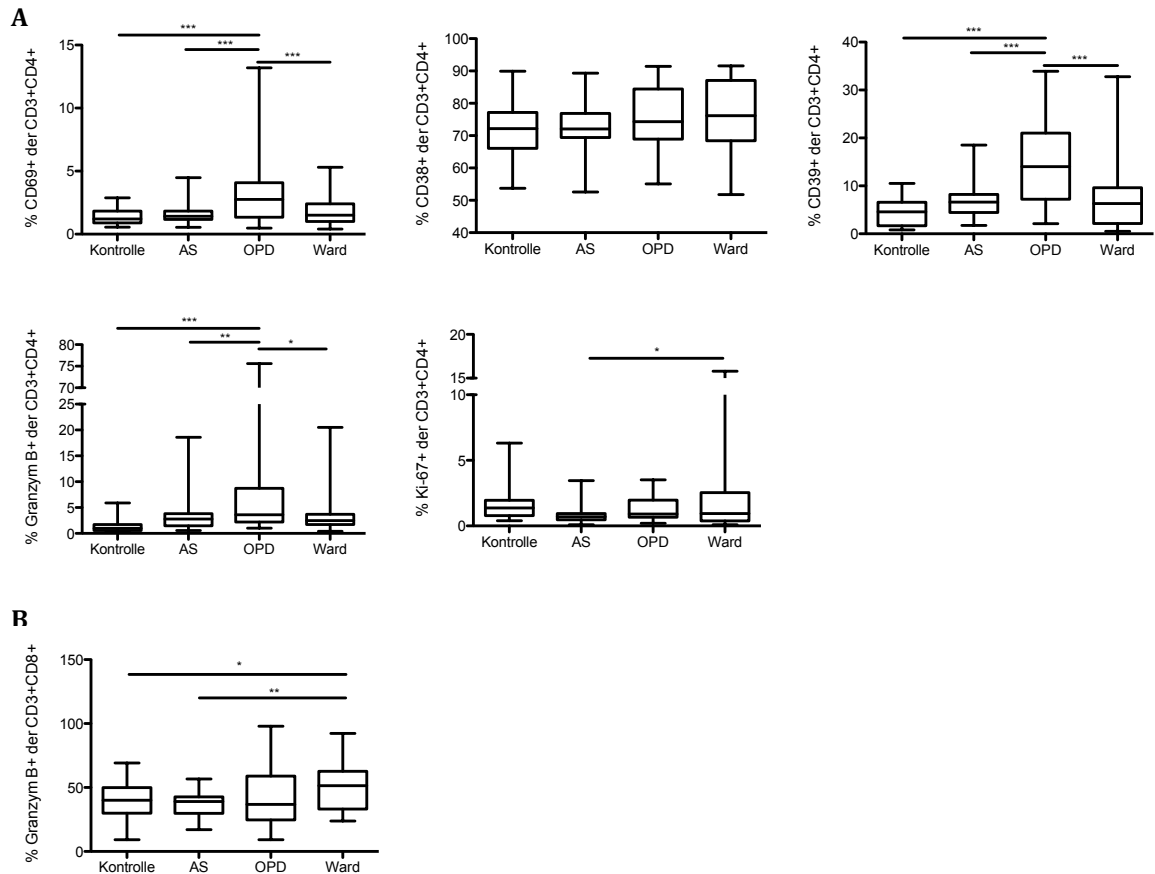


Abb. 16: Aktivierungsmarker werden in milder *Pf* Malaria höher induziert als in schwereren Infektionen.

Vollblut von 41 Kontroll-Probanden, 41 AS Probanden, 32 OPD Patienten und 34 Ward Patienten wurde auf verschiedenen Oberflächenmarker sowie intrazelluläre Marker gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Potentielle Signifikanzen wurden mittels *One-way ANOVA* mit *Tukey's Multiple Comparison Test* und 95% Konfidenzintervallen bestimmt. **A** Es wurde eine Oberflächenfärbung von CD4, CD69, CD38 und CD39 sowie eine intrazelluläre Färbung auf CD3, Granzym B und Ki-67 durchgeführt. **B** Es wurde eine Oberflächenfärbung von CD8 sowie eine intrazelluläre Färbung auf CD3, und Granzym B durchgeführt.

4.13 Keine Unterschiede in den Plasma Zytokin Spiegeln von milder oder schwererer *Pf* Malaria

Um auch die Immunantwort der Probanden aus dem endemischen Gebiet weiter zu charakterisieren, wurde Plasma aus dem Vollblut für die durchflusszytometrische Analyse mittels LEGENDplex™ auf das Vorhandensein von Zytokinen untersucht. Im Vergleich zu den Probanden, die in Hamburg rekrutiert wurden, konnten in den ghanaischen Proben ein geringeres Repertoire an Zytokinen detektiert werden. Darüber hinaus konnten nur in den zwei Patientengruppen OPD und Ward Zytokine nachgewiesen werden (Abb. 17). Zwischen den zwei Gruppen bestehen jedoch keine Unterschiede in den Konzentrationen von IFN- γ , TNF- α , IL-6 und IL-10 im Plasma. Aufgrund der Bedeutung dieser vier Zytokine in der Malaria wurden nur die Werte von IFN- γ , TNF- α , IL-6 und IL-10 dargestellt.

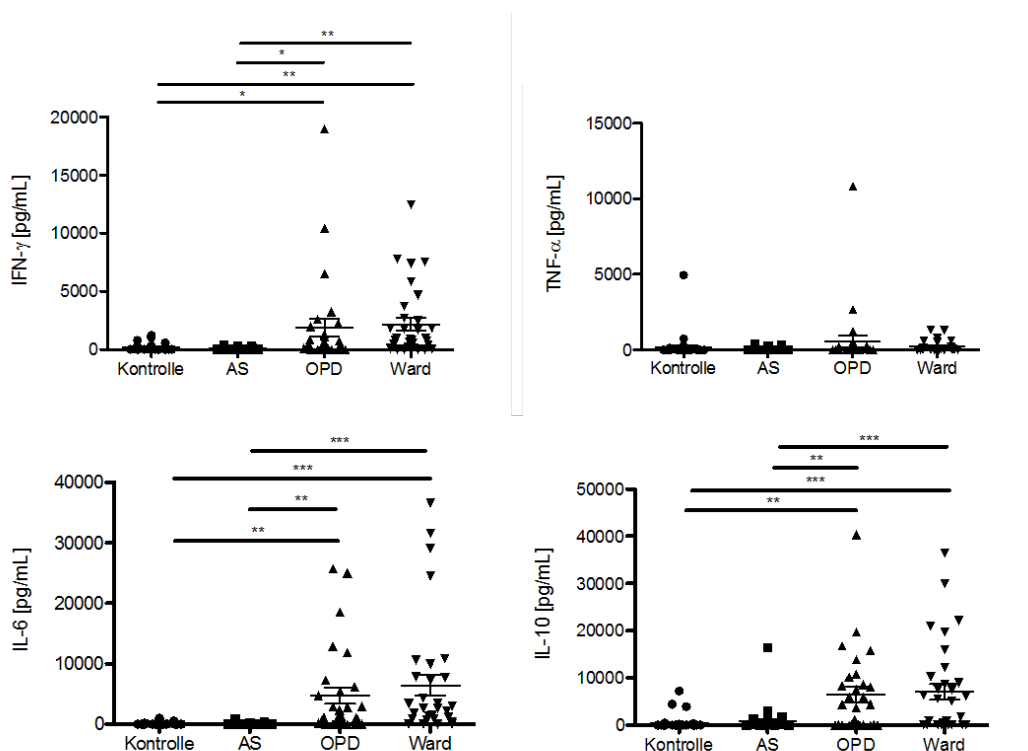


Abb. 17: Die Plasma Zytokin Level unterscheiden sich zwischen symptomfreien Gruppen und Gruppen, die mit *Pf* infiziert sind.

Plasma Proben wurden mittels LEGENDplex™ *Human Th Cytokine Panel (13-plex)* auf die Präsenz von IFN- γ , TNF- α , IL-6 und IL-10 analysiert. *One-way ANOVA* mit *Tukey's Multiple Comparison Test* und 95% Konfidenzintervallen wurde angewandt um mögliche Signifikanzen zu bestimmen.

5 Diskussion

Während *Pf* Malaria aber auch während anderer Infektionen ist die richtige Balance von Immunreaktionen entscheidend. Einerseits muss das Immunsystem ausreichend aktiviert sein, um eingedrungene Pathogene zu beseitigen. Andererseits muss eine zu starke Aktivierung verhindert werden, um eine potentielle Pathologie zu verhindern. Eine Aufrechterhaltung dieser Balance kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. Zum einen spielen regulatorische T-Zellen (T_{reg}) eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung dieser Balance (WALTHER *et al.*, 2005; HISAEDA *et al.*, 2004). Des Weiteren können anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β sowie pro-inflammatorische Zytokine wie IFN- γ das Immunsystem entweder aktivieren oder Effektorfunktionen limitieren (JANKOVIC *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2009; WALTHER *et al.*, 2009; BACCHETTA *et al.*, 1994) Eine weitere Möglichkeit, die Aktivierung des Immunsystems zu beeinflussen, sind kostimulatorische und koinhibitorische Moleküle. In dieser Arbeit wurde sich vornehmlich mit der Rolle von Koinhibitoren auf CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria beschäftigt.

5.1 Erhöhte Expression von Koinhibitoren und Aktivierungsmarkern während der *Pf* Malaria

In dieser Arbeit wurde sich hauptsächlich mit der Expression der Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3 und BTLA auf CD4⁺ T-Zellen beschäftigt. Mit Ausnahme von BTLA zeigen diese Moleküle auf CD4⁺ T-Zellen alle signifikant höhere Anteile an CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Probanden aber auch zu PBC, PSC, AIH, HIV, HBV, und HCV Patienten (Abb. 5). TIGIT als weiterer, erst kürzlich beschriebener Koinhibitor wies ebenfalls eine signifikant höhere Expression in der *Pf* Malaria auf als in gesunden Kontrollen (Abb. 12). Es konnte darüber hinaus eine mehrheitliche Koexpression von PD-1 und CTLA-4 in der Infektion beobachtet werden (Abb. 4B und Abb. 7). LAG-3 wird ebenfalls vornehmlich in der PD-1⁺CTLA-4⁺ Population exprimiert. In komplizierter *Pf* Malaria ist der Grad der Koexpression dabei höher als bei unkomplizierten Infektionen.

Diskussion

Koexpression von Koinhibitoren lässt sich bei gesunden Probanden nur zu einem sehr geringen Anteil feststellen (Abb. 1A und Abb. 7). Eine genauere Analyse der Expressionsdaten der Koinhibitoren ergab keine Unterschiede in Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht der Probanden und auch ihre Abstammung hat keinen Einfluss auf Expressionsstärken. Diese Beobachtung wurde auch in einer anderen Studie gezeigt (SCHLOTMANN *et al.*, 2000). Sicherlich haben jedoch der Infektionszeitpunkt und vor allem auch die Dauer der bestehenden Infektion bis zum Zeitpunkt der Probennahme einen Einfluss auf die Höhe der Expression der Koinhibitoren und auch der Aktivierungsmarker. Der genaue Zeitpunkt der Infektion der Probanden ist dabei nicht bekannt. Darüber hinaus spielt es auch eine Rolle wie lange sich der jeweilige Patient zum Zeitpunkt der Probennahme schon in Behandlung befindet (Abb. 8). Des Weiteren ist der genaue Einfluss der Medikation auf die Expressionsstärken der untersuchten Moleküle nicht bekannt.

Die Expression von Koinhibitoren wurden bereits in einigen Malaria Modellen untersucht, es befassten sich jedoch nur wenige Studien mit dem humanen Pathogen *Plasmodium falciparum*. In der murinen Infektion mit *Plasmodium berghei* konnte eine Induktion von CTLA-4 durch CD4⁺ T-Zellen verzeichnet werden, die ihren Höchstwert bereits vor Erreichen einer deutlichen Zunahme der Parasitämie aufwies (JACOBS *et al.*, 2002). In einer weiteren Studie im Mausmodell mit *Plasmodium berghei* untersuchten HAFALLA und Kollegen für experimentelle zerebrale Malaria anfällige C57BL/6 Mäuse und resistente BALB/c Mäuse. In den ersten sechs Tagen nach der Infektion gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen in den Anteilen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die CTLA-4 oder PD-1 exprimieren. Ab Tag sieben nach der Infektion und dem Einsetzen zerebraler Symptome in den C57BL/6 Mäusen wies dieser anfällige Stamm signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen, die CTLA-4 und PD-1 exprimieren, auf. Außerdem wurden eine vermehrte Produktion von IFN- γ und ein verstärktes Auftreten von Aktivierungsmarkern in infizierten C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu BALB/c Mäusen gezeigt. Diese Faktoren könnten eine wichtige Rolle in der Pathologie spielen. (HAFALLA *et al.*, 2012) Tim-3 zeigt ebenfalls eine höhere Expression in der Infektion mit *Plasmodium berghei* in Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen (HUANG *et al.*, 2013). Ein weiteres Mausmodell ist die Infektion mit *Plasmodium yoelii*. Es konnte gezeigt werden, dass viele Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen PD-1 und LAG-3 exprimieren und diese

Zellen eine verringerte Zytokin-Produktion aufweisen (BUTLER *et al.*, 2012). Eine Induktion von CTLA-4 in T-Zellen konnte darüber hinaus auch in Infektionen mit den Humanpathogenen *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* beobachtet werden, wobei die Expression in *Pf* Infektionen vergleichsweise höher war (SCHLOTMANN *et al.*, 2000). Die deutlich höhere Anzahl CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen hielt bis zum dritten Tag nach Beginn der Behandlung an und nahm schrittweise bis zum basalen Niveau ab. In der vorliegenden Arbeit konnte eine zeitnahe Abnahme der CTLA-4 Expression nach der ersten Behandlung bestätigt werden. An Tag 1 war eine deutliche Expression von CTLA-4 vorhanden, an Tag 6 war sie bereits auf ein sehr niedriges Niveau gesunken (Abb. 8). BUTLER und Kollegen zeigten in einer weiteren Studie eine höhere Anzahl PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria (BUTLER *et al.*, 2012). Darüber hinaus konnten COSTA und Kollegen in humanen *Plasmodium vivax* Infektionen einen erhöhten Anteil PD-1⁺, CTLA-4⁺ und Tim-3⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vor Behandlung als nach erfolgter Behandlung beobachten (COSTA *et al.*, 2015). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Abnahme der Expression aller untersuchten koinhibitorischen Moleküle an Tag 13 nach der ersten Behandlung beobachtet werden. Einige Tage später wurde die Behandlung des entsprechenden Patienten beendet. Eine signifikant höhere Anzahl an LAG-3⁺ Zellen vor Behandlung im Vergleich zu nach der Behandlung konnten in der Arbeit von COSTA und Kollegen nur für CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (COSTA *et al.*, 2015). Diese Beobachtung widerspricht der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen hohen Expression von LAG-3 auf CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen. Möglicherweise hält die Expression von LAG-3 auf CD4⁺ T-Zellen in der *Plasmodium vivax* Infektion auch nach der Behandlung noch länger vor, weswegen die Unterschiede in der Expression von LAG-3 vor der Behandlung und den Kontroll-Färbungen nach beendeter Behandlung in der Studie so gering ist. In beiden Studien waren im Mittel 10% der CD4⁺ T-Zellen der Probanden LAG-3⁺. Des Weiteren konnten BUTLER und Kollegen CD4⁺ T-Zellen beschreiben, die mehrere Koinhibitoren zur selben Zeit exprimierten. Hervorzuheben ist hier die mehrheitliche Koexpression von PD-1 auf CTLA-4⁺ Zellen, die auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde. (BUTLER *et al.*, 2012) CTLA-4⁺PD-1⁺ Zellen exprimierten zugleich auch ICOS als Aktivierungsmarker und den Proliferationsmarker Ki-67. (COSTA *et al.*, 2015) In einer Studie über persistierende *Pf* Malaria wurde eine erhöhte Expression von PD-1 und LAG-3 auf CD4⁺ T-Zellen nach wiederholter Exposition der Probanden mit dem Parasiten gezeigt. Dabei

Diskussion

war LAG-3 häufig koexprimiert mit PD-1. (ILLINGWORTH *et al.*, 2013) Die Ergebnisse aller erwähnten Studien und der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Induktion von T-Zellen als Antwort auf Malaria hin, die einen oder auch mehrere Koinhibitoren exprimieren, Diese Induktion ist wie beschrieben auch in vielen Modellen für Malaria zu beobachten und scheint eine generelle Eigenschaft der Immunreaktion auf Malaria zu sein. Die Rolle dieser Zellen ist dagegen noch nicht aufgeklärt. Die in dieser Arbeit ermittelten Eigenschaften der Zellen, die Koinhibitoren exprimieren, werden im Folgenden weiter beschrieben.

In vielen Infektions- und Tumormodellen und vor allem während Virusinfektionen weisen CD8⁺ T-Zellen, die Koinhibitoren exprimieren, einen erschöpften Phänotyp auf (VELU *et al.*, 2015; PENNA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008; KEIR *et al.*, 2008). Einige Gruppen konnte diesen erschöpften Phänotyp dagegen auch für CD4⁺ T-Zellen zeigen (BONI *et al.*, 2007; GOLDEN-MASON *et al.*, 2009). Als Marker für erschöpfte Zellen wurde vor allem PD-1 aber auch CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 beschrieben. Ein erschöpfter Phänotyp Koinhibitor-positiver Zellen wurde auch in der Malaria beschrieben. So zeigen CD4⁺ T-Zellen, die PD-1 und LAG-3 exprimieren, eine verschlechterte Zytokinproduktion (BUTLER *et al.*, 2012). Trotzdem tragen CD4⁺ T-Zellen, die Koinhibitoren exprimieren, auch Aktivierungsmarker. In dem murinen *Plasmodium berghei* Modell konnte eine Koexpression von PD-1 und CTLA-4 mit verschiedensten Aktivierungsmarkern beschrieben werden (HAFALLA *et al.*, 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Aktivierungsmarker untersucht. Abb. 6 zeigt den hohen Anteil von CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria, die die Aktivierungsmarker Ki-67, CD69, CD127, CD39 und Granzym B tragen. Ki-67 wird als Proliferationsmarker beschrieben (SCHOLZEN & GERDES, 2000), CD69 ist ein Aktivierungsmarker und CD127-Expression ist niedrig in T-Effektor-Zellen. Die Ektonukleotidase CD39 kann ATP und ADP zu AMP hydrolysieren und wirkt so suppressiv auf andere Immunzellen (BONO *et al.*, 2015). Granzym B ist ein Apoptose-auslösendes Enzym (BLINK *et al.*, 1999). Neben der generell erhöhten Expression von Aktivierungsmarkern durch CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria verdeutlicht Abb. 7, dass selbst Zellen, die drei, vier oder fünf Koinhibitoren exprimieren, den Proliferationsmarker Ki-67 tragen. Plasma Level an Zytokinen zeigen darüber hinaus eine signifikant erhöhte Produktion von IFN- γ , IL-10 und IL-17A während der Infektion auf (Abb. 9). Es kann mit dieser Methode jedoch nicht festgestellt werden, welche Zellen

Diskussion

diese Zytokine produzieren, da eine intrazelluläre Färbung von Zytokinen aufgrund der limitierenden Probenvolumina in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. Vor allem die hohe Expression der Aktivierungsmarker legt aber eine Funktionalität von einem Großteil der Zellen in der Infektion nahe.

Im Falle der gezeigten Koexpression von PD-1, CTLA-4 und Ki-67 stellt sich die Frage, welches Molekül zuerst exprimiert wird und wie lange die Expression vorliegt. Einerseits könnten die Zellen zuerst proliferieren und dann PD-1 und CTLA-4 heraufregulieren und dadurch die Zellen hemmen, um eine zu große Schädigung der körpereigenen Zellen zu verhindern. Auch könnte es sich bei diesen PD-1⁺ oder CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen um Antigen-spezifische T-Zellen handeln, die zu Beginn bereits Koinhibitoren exprimieren. In der Immunreaktion auf den Parasiten vermehren sich diese Zellen nun trotz Expression von Koinhibitoren, um den Parasiten zu eliminieren und das Immunsystem weiter zu aktivieren. Anhand der Antigen-spezifischen Stimulation mit Schizontenextrakt zeigt sich jedoch nur eine sehr geringe Proliferation von PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen. Somit liegt die Theorie der zuerst erfolgenden Proliferation und anschließender Induktion der Koinhibitoren nahe.

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der immunologischen Balance. Da T_{regs} ebenfalls Koinhibitoren, dabei besonders CTLA-4, exprimieren und immunregulatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β produzieren, wurde die Expression der Koinhibitoren auf CD127^{low} CD4⁺ T-Zellen als potentielle T_{reg}-Population untersucht (nicht gezeigt). CD127 ist die IL-7-Rezeptor α Kette. IL-7 gilt als wichtiger Regulator in der Homöostase von Gedächtnis-T-Zellen (SURH *et al.*, 2006). Effektor-T-Zellen und T_{regs} benötigen dagegen IL-2 für ihre Homöostase (LIAO *et al.*, 2013). Diese Strategie ergab jedoch kein einheitliches Bild für die Expression der jeweiligen Koinhibitoren zwischen den Probanden. Im Vergleich zu dem gesamten CD4⁺ T-Zell-Kompartiment wiesen einige Probanden im CD127^{low} Kompartiment eine größere Anzahl Koinhibitor-positiver Zellen auf. Bei anderen Probanden waren die Anzahlen Koinhibitor-exprimierender CD4⁺ T-Zellen in der gesamten CD4⁺ T-Zell-Kompartiment höher. Die gleiche Beobachtung konnte für die Aktivierungsmarker und Effektormoleküle gemacht werden. Ein einheitlicheres Bild wird vermutlich durch die unterschiedlichen Zeitpunkte der Probennahme und damit einhergehender Analyse der

Diskussion

Zellen beeinträchtigt. Durch die schon unterschiedlich lange erfolgte Behandlung wird das Immunsystem bei der Eliminierung der Parasiten unterstützt. Möglicherweise kommt den T_{regs} dadurch eine andere Rolle zu als in der unbehandelten Situation und sie verändern die Expressionsmuster der Koinhibitoren und auch ihr Aktivierungsprofil besonders stark, wodurch ein so diverses Bild entsteht.

Mausmodelle für Malaria wurden nicht nur zur Aufklärung der Expression von Koinhibitoren genutzt. Auch wurden blockierende Antikörper gegen PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 genutzt, um die Rolle dieser Moleküle während Malaria zu untersuchen. Im *Plasmodium yoelii* Mausmodell führte die Blockade von PD-1 und LAG-3 zu einer sofortigen Kontrolle der Parasitämie, wobei auch die Anzahl der folliculären T-Helferzellen und die Plasmazell-Differenzierung erhöht wurden (BUTLER *et al.*, 2012). In Infektionen mit dem murinen Erreger *Plasmodium berghei* löste der Einsatz von α -CTLA-4- oder α -PD-L1-Antikörpern in eigentlich resistenten BALB/c Mäusen zerebrale Symptome aus, da die T-Zellen nach der Blockade einen aktivierteren Phänotyp aufwiesen und mehr IFN- γ , MCP-1 und IL-10 produzierten (HAFALLA *et al.*, 2012). Wurde CTLA-4 in *Plasmodium berghei* Infektionen von C57BL/6 Mäusen blockiert, so starben die Mäuse signifikant früher als entsprechende Kontrollmäuse und es wurde eine höhere Proliferation der CD4⁺ T-Zellen nach Blockade von CTLA-4 beobachtet (JACOBS *et al.*, 2002). In einem *in vitro* System für eine *Plasmodium vivax* Infektion wurde nach der Blockade von PD-1, CTLA-4 und Tim-3 ein erhöhter Spiegel von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 nach Stimulation von PBMCs mit infizierten Retikulozyten beobachtet. Auf diese Weise wurde die verschlechterte Funktion von T-Zellen, die Koinhibitoren exprimieren, gezeigt (COSTA *et al.*, 2015). Darüber hinaus konnte in unseren früheren Studien die Proliferation *Pf*-spezifischer T-Zellen durch die gleichzeitige Blockade von CTLA-4 und PD-L1 gesteigert werden. Des Weiteren produzierten diese Zellen, bei denen beide Koinhibitoren blockiert wurden, mehr Zytokine (MACKROTH *et al.*, 2016). Eine Blockade von Koinhibitoren im Menschen wird heutzutage bereits in der Therapie gegen Tumore eingesetzt und es gibt viele Studien über den Einsatz weiterer blockierender Antikörper oder auch Kombinationen mehrerer Antikörper (HAMID *et al.*, 2013; TOPALIAN *et al.*, 2014; WOLCHOK *et al.*, 2013). Durch den Einsatz der blockierenden Antikörper wird die Funktionalität der erschöpften T-Zellen wieder hergestellt. Gegebenenfalls wäre eine solche Therapie mit

Diskussion

blockierenden Antikörpern gegen PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3 oder TIGIT auch in der *Pf* Malaria eine Möglichkeit. Einerseits könnte auf diese Weise die Proliferation der *Pf*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen erhöht werden. Auch die Zytokinproduktion könnte gesteigert werden. Auf der anderen Seite müsste in dem sensiblen System der T-Zell-Aktivierung und der Immunbalance ein Einsatz blockierender Antikörper genauestens überwacht werden, um eine überschießende Immunantwort und damit einhergehende schwere Symptome bis hin zu zerebralen Symptomen zu verhindern. Möglicherweise wäre eine Induktion von LAG-3 oder *Pf*-spezifischen Tr1 Zellen eine geeignetere Alternative die Infektion zu behandeln.

Neben der Expression der verschiedenen Koinhibitoren weisen CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria auch eine Expression von Effektormolekülen aus. Ein Beispiel ist dabei Granzym B (Abb. 6 und Abb. 16). Granzym B ist ein Apoptose-auslösendes Molekül, das meist als Marker für CD8⁺, zytotoxische T-Zellen verwendet wird. In natürlichen und experimentellen *Pf* Malaria konnte eine Erhöhung von löslichem Granzym B und Granzym A im Plasma der Probanden nachgewiesen werden (HERMSEN *et al.*, 2003). Dabei korrelierte der Spiegel an löslichem Granzym B mit der Parasitämie und den klinischen Symptomen der Probanden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Produktion von Granzym B durch CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria im Vergleich zu gesunden Probanden gezeigt (Abb. 6 und Abb. 16). Dabei ist die Expression von Granzym B in Erkrankungen mit milden Symptomen höherer als bei schwereren Symptomen (Abb. 16). Granzym B ist in diesem System ein potentieller Mechanismus, eine zu hohe Aktivität des Immunsystems zu unterbinden und Schädigungen des Wirts zu vermeiden. So ist die hohe Produktion von Granzym B eine mögliche Erklärung für die milderen Symptome von ambulant behandelten OPD Patienten im Vergleich zu Ward Patienten, die mit vergleichsweise schwereren Symptomen stationär aufgenommen wurden. Für seine zytotoxische Wirkung benötigt Granzym B jedoch einen Partner, der die Membran der Ziel-Zellen durchgängig macht. Dieses Molekül ist Perforin. Granzym B und Perforin werden zusammen in Granula von Zellen gelagert. Werden diese ausgeschüttet, können die Moleküle ihre Funktion erfüllen. Eine Ausschüttung von Granula ist an der Expression von CD107a auf der Oberfläche der Zellen zu erkennen. Abb. 11 verdeutlicht eine höhere Produktion von Perforin durch CD4⁺ T-Zellen in gesunden Kontrollen als in *Pf* Malaria Patienten. Somit werden mehr Granzym B und

Perforin produziert und in den Zellen gelagert. An den ebenfalls höheren Anteilen an CD107⁺ CD4⁺ T-Zellen wird deutlich, dass diese Zellen nicht nur Perforin und Granzym B produzieren, sondern diese auch Ausschütten und als Effektormoleküle nutzen. Somit zeigen CD4⁺ T-Zellen ein höheres zytotoxisches Potential in der Infektion im Vergleich zu einem gesunden Zustand. Diese Beobachtung ist besonders erstaunlich, da Granzym B und Perforin allgemein als Marker für CD8⁺, zytotoxische T-Zellen herangezogen werden. Trotzdem wurde in einigen Studien eine Expression von Granzym B und Perforin durch CD4⁺ T-Zellen beschrieben (HOMBACH *et al.*, 2006; HUA *et al.*, 2013; GOUBARD *et al.*, 2015). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese CD4⁺ T-Zellen über die Effektormoleküle Granzym B und Perforin zytotoxisch wirken können.

5.2 Suppression CTLA-4⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen auf autologe CD4⁺ T-Zellen

In dieser Arbeit konnte, im Einklang mit vorherigen Studien in unserer Arbeitsgruppe (MACKROTH *et al.*, 2016), eine extrinsische regulatorische Funktion von CTLA-4⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen von *Pf* Malaria Patienten gegenüber autologen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* festgestellt werden (Abb. 10). Eine solche Zellpopulation mit den beschriebenen regulatorischen Eigenschaften wurde unseres Wissens nach bisher noch nicht beschrieben.

In der vorherigen Studie sowie der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die inhibierende Wirkung CTLA-4⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen einerseits bei polyklonalen Stimulationen mit α CD3/ α CD28 Antikörpern auftritt. Bemerkenswerterweise lässt sich diese Suppression jedoch auch in einer Antigen-spezifischen Stimulation mit Schizontenextrakt beobachten (Abb. 10). Diese Beobachtung verdeutlicht das vorhandene funktionelle Vermögen dieser Zellen trotz Expression mehrerer Koinhibitoren. Darüber hinaus konnte mittels *Transwells* gezeigt werden, dass für die supprimierende Wirkung Kontakt mit der Ziel-Zelle nötig ist. Außerdem sind weder PD-1, CTLA-4, TGF- β noch IL-10 die ausschlaggebenden Faktoren, da selbst eine gleichzeitige Blockade der jeweiligen Liganden die extrinsische regulatorische Funktion der CTLA-4⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen nicht aufzuheben vermag (MACKROTH *et al.*, 2016). Einerseits kann eine Inhibition der Zellproliferation durch anti-inflammatorische

Zytokine oder Koinhibitoren erfolgen. Andererseits könnte aber auch eine induzierte Apoptose Grund für die ausbleibende Proliferation der autologen CD4⁺ T-Zellen sein. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, könnte ein Zytotoxizitätsassay mit CTLA-4⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen als Effektoren und autologen CD4⁺ T-Zellen oder einer T-Zelllinie als Ziel-Zellen durchgeführt werden. In diesem Experiment könnte der Anteil der induzierten Apoptose in den Ziel-Zellen festgestellt werden. Um den Mechanismus hinter dieser potentiellen Apoptose zu untersuchen, könnten weitere blockierende Antikörper gegen koinhibitorische Moleküle, gegen Zytokine oder andere Effektormechanismen wie zum Beispiel Granzym B eingesetzt werden. Aus Mangel an ausreichenden Probenmengen konnten diese Experimente bisher nicht durchgeführt werden. In Abschnitt 5.1 wurde die potentielle Wirkungsweise von Granzym B bereits beschrieben.

5.3 Abwesenheit von CD49b auf CD4⁺ T-Zellen in der Pf Malaria

Tr1 Zellen wurden bereits im Jahr 1997 das erste Mal beschrieben (GROUX *et al.*, 1997). Klassische Eigenschaften von Tr1 Zellen sind die Produktion von IL-10 und TGF- β aber nicht von IL-4 (BACCHETTA *et al.*, 2002; GROUX *et al.*, 1997; KITANI *et al.*, 2000), die suppressive Kapazität auf T_H1 und T_H2 Zellen sowie die Expression von CTLA-4 und verschiedenen Aktivierungsmarkern wie CD69, CD39 und Chemokinrezeptoren (BACCHETTA *et al.*, 2002; KITANI *et al.*, 2000; SCHULER *et al.*, 2014; SEBASTIANI *et al.*, 2001). Tr1 Zellen sind adaptiv und werden durch chronische Aktivierung in Gegenwart von IL-10 induziert (GROUX *et al.*, 1997). Induzierte Tr1 Zellen exprimieren zu einem hohen Anteil Granzym B und sind in der Lage in Ziel-Zellen Apoptose zu induzieren (GROSSMAN *et al.*, 2004). Die Autoren konnten darüber hinaus zeigen, dass Überstände aus der Zellkultur keine abtötende Wirkung besitzen und Zell-Zell-Kontakt für die Induktion der Apoptose nötig ist. Lange fehlten Oberflächenmarker, die zur spezifischen Darstellung dieser Zellen dienen können. GAGLIANI *et al.* fanden 2013, dass CD49b und LAG-3 spezifische Marker für humane und murine Tr1 Zellen sind. Auch in dieser Arbeit wurde eine Identifikation von Tr1 Zellen in der *Pf* Malaria über diese genannten Marker angestrebt. Eine Koexpression konnte jedoch weder in gesunden Probanden noch in Patienten mit *Pf* Malaria gefunden werden (Abb. 12A). Eine alternative Strategie wurde 2016 von FACCIOTTI und Kollegen beschrieben. Diese nutzen CD127 und CD25 als Marker

Diskussion

für Tr1 Zellen, wobei Tr1 Zellen deutlich negativ für sowohl CD127 als auch CD25 sind (Abb. 12B). Dieses steht jedoch in Konflikt mit einigen anderen Arbeiten, in denen Tr1 Zellen als CD25⁺ beschrieben werden (AKDIS *et al.*, 2004; BACCHETTA *et al.*, 2002; JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2008). In dem CD127⁻CD25⁻ Zellkompartiment konnte in der vorliegenden Arbeit ein höherer Anteil an PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen und CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen als in der gesamten CD4⁺ Population beobachtet werden. Dieses könnte für eine geeignete Analyse-Strategie sprechen. Allerdings konnte jedoch ebenfalls keine Expression von CD49b in diesen CD127⁻CD25⁻ Zellen gezeigt werden. Möglicherweise könnte durch die Verwendung eines anderen Klon des α -CD49b Antikörpers eine bessere Färbung erzielt werden. Da der hier verwendete Antikörperklon auf CD4⁺ T-Zellen von gesunden Probanden jedoch zu einer deutlichen Färbung führt, scheint der verwendete Klon kein Grund für die nicht detektierbare Färbung zu sein. Interessanterweise erfolgt die Charakterisierung von Tr1 Zellen in der Literatur auf unterschiedliche Art und Weise.

Bisher ist über die Rolle von Tr1 Zellen in der Malaria noch nicht viel bekannt. Ein CD4⁺ T-Zell-Klon eines Spenders aus einem endemischen Gebiet wurde *in vitro* mit einer natürlichen Variante des immundominanten CD4⁺ T-Zell-Epitops von *Plasmodium falciparum* stimuliert. Dabei war eine Verschiebung von einer IFN- γ - zu einer IL-10-Produktion zu beobachten (PLEBANSKI *et al.*, 1999). Dieses ist ein Hinweis auf die Anwesenheit und auch funktionelle Fähigkeit von Tr1 Zellen während *Pf* Malaria. Diese Tr1 Zellen könnten eine Erklärung für die Unterdrückung Malaria-spezifischer T-Zell-Antworten während der Infektion sein. Groux und Kollegen konnten bereits eine Unterdrückung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Antworten durch Tr1 Zellen zeigen (GROUX *et al.*, 1997). Im murinen Modell mit einem letalen und einem nicht-letalen *Plasmodium yoelii* Stamm moduliert von Tr1 Zellen produziertes IL-10 die Eliminierung der Parasiten sowie die Pathologie während der Infektion (COUPER *et al.*, 2008). Die Charakterisierung von Tr1 Zellen im Menschen erfolgte bisher auf zwei verschiedenen Wegen. Entweder wurde diese Zellen *ex vivo* auf dem peripheren Blut isoliert oder sie wurden *in vitro* generiert. In zirkulierenden CD4⁺ CD127⁻ T-Zellen konnte eine gleichzeitige Produktion von IL-10 und IFN- γ gezeigt werden, wohingegen *in vitro* generierte Tr1 Zellen kein IFN- γ produzieren. Darüber hinaus zeigen Tr1 Zellen *ex vivo*

ein geringes proliferierendes Potential, die Expression von Ki-67 verdeutlicht jedoch, dass sie kürzlich noch proliferiert sind. (HÄRINGER *et al.*, 2009)

Abb. 6 verdeutlicht eine hohe Anzahl von CD69⁺ und CD39⁺ CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria und auch viele CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen sind während der Infektion vorhanden. Wie bereits beschrieben, wird auch Granzym B im Krankheitsverlauf heraufreguliert. In der vorhergehenden Studie konnte nach der *ex vivo* Stimulation von PBMCs von Patienten eine Koproduktion von IFN- γ und IL-10 sowie eine geringe Proliferation beobachtet werden (MACKROTH *et al.*, 2016). Diese Faktoren sprechen somit trotz Abwesenheit von CD49b für die Präsenz von Tr1 Zellen während der *Pf* Malaria. Darüber hinaus passen diese Beobachtungen auch zu der in dieser Arbeit beschriebenen supprimierenden Wirkung CTLA-4⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen *in vitro* und sind ebenfalls eine potentielle Erklärung für die geringeren Symptome von ambulant behandelten OPD Patienten. Eine vermehrte Anzahl an Tr1 Zellen könnte einerseits über IL-10 eine übersprießende Immunantwort eindämmen, andererseits könnten Tr1 Zellen über die Ausschüttung von Granzym B weitere Zellen in die Apoptose führen.

5.4 Expression von Koinhibitoren in Abhängigkeit von der Schwere der Symptome

In der Studie, die in einem endemischen Gebiet in Ghana durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Expression der vier Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3 und Tim-3 abhängig von der Schwere der Symptome ist. Dabei zeigen Kinder mit schweren Symptomen eine höhere Expression von PD-1 und CTLA-4 als Kinder mit mildereren Symptomen, wohingegen LAG-3 und Tim-3 auf CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit mildereren Symptomen (OPD) höher exprimiert werden als bei Patienten mit schwereren Symptomen (Ward) (Abb. 14). Darüber hinaus sind CD4⁺ T-Zellen von Patienten mit mildereren Symptomen stärker aktiviert (Abb. 16). Diese höhere Aktivierung und mildereren Symptome weisen auf eine gezieltere Regulation *Pf*-spezifischer Zellen in OPD Patienten hin. Das Immunsystem ist auf der einen Seite aktiviert und kann die Parasiten bekämpfen, auf der anderen Seite scheint es so gezielt und effektiv zu funktionieren,

Diskussion

dass wenig Schädigung der körpereigenen Zellen auftritt und schwere Symptome entstehen. Zytokine scheinen bei diesem Vorgang keine Rolle zu spielen, da zwischen den beiden Gruppen OPD und Ward keine Unterschiede zu beobachten sind (Abb. 17). Beide weisen unter anderem hohe Werte des regulatorischen Zytokins IL-10 auf. Eine mögliche Erklärung für die nur sehr geringen Mengen an Zytokinen im Plasma könnte eine nur lokale Ausschüttung der Zytokine und somit eine schnelle Bindung durch die lokal vorhandenen Zellen sein. Ein hoher Zytokinspiegel im Plasma könnte damit ein Zeichen für eine sehr hohe Produktion an Zytokinen und nicht ausreichenden Verbrauch durch vorhandene Zellen sein. Die hohe Anzahl vor allem von LAG-3⁺ CD4⁺ T-Zellen aber auch von Tim-3⁺ CD4⁺ T-Zellen könnte ein Hinweis sein auf eine vermehrte Anreicherung von Tr1 Zellen bei den OPD Patienten sein. Des Weiteren gelten CD39 und Granzym B als Effektormoleküle von Tr1 Zellen. Die besonders hohe Expression von CD39 und Granzym B bei mildereren Infektionen deuten auf deren wichtige Rolle in der ausbalancierten Immunreaktion hin. Da die Entnahme der Blutproben in dieser Studie in jedem Fall vor der Behandlung geschah, können die Expressionsmuster auf durch die Infektion hervorgerufene Veränderungen und nicht von der Medikation ausgelöste Reaktionen zurückgeführt werden.

Eine weitere Beobachtung in dieser Studie war eine positive Korrelation von den Anteilen PD-1⁺ und CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen mit der Parasitämie der Probanden (Abb. 15). Dieser Effekt wurde nicht bei den Probanden in Hamburg beobachtet (nicht gezeigt). Eine andere Studie zeigt eine Korrelation der Expression von CTLA-4 zum Zeitpunkt der Aufnahme mit der Spitze der Parasitämie (SCHLOTMANN *et al.*, 2000). In Studien über Virusinfektionen konnte ebenfalls eine Korrelation der Expression vor allem von PD-1 aber auch anderer Koinhibitoren mit der Viruslast gezeigt werden (RUIBAL *et al.*, 2016; FROMENTIN *et al.*, 2016; DAY *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2010). Dabei entspricht die periphere Parasitämie jedoch nicht der gesamten Biomasse der Parasiten im Körper des Wirts (DONDRUP *et al.*, 2005). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Zytoadhäsion von infizierten Erythrozyten in Organen und Geweben (HO & WHITE, 1999). Infizierte Erythrozyten sind aufgrund dieser Zytoadhäsion nicht im peripheren Blut zu finden, die Parasitämie bestimmt im Blutausschrieb repräsentiert somit nicht die tatsächliche Anzahl infizierter Erythrozyten. Die gesamte Biomasse von *Pf* könnte mit diesem Hintergrund mit der Expression der Koinhibitoren auch bei den Probanden in

Diskussion

Hamburg korrelieren. Offensichtlich reichen jedoch geringe Antigen-Konzentrationen aus, um eine spezifische T-Zell-Aktivierung zu induzieren. Vermutlich präsentieren APZ in diesem Fall für den TZR hoch affine Peptide, die diese effiziente Aktivierung der T-Zellen ermöglichen. (CLEMENTE *et al.*, 2013) Aufgrund nicht beeinflussbarer Faktoren war das Alter der OPD Patienten tendenziell höher als das Alter der Ward Patienten (Abb. 13). Die Probanden, die in der Schule rekrutiert wurden, stammten aus Altersklassen, die von der Schule ausgewählt wurden. So waren die in der Schule rekrutierten Probanden im Schnitt älter als die im Krankenhaus rekrutierten Kinder. In Folge ihres höheren Alters hatten die OPD Patienten gegebenenfalls bereits mehr Infektionen als jüngere Ward Patienten, eine größere Menge an zirkulierendem Antigen in ihrem Körper und konnten somit einen größeren Grad an Immunität gegen den Parasiten aufbauen.

Eine interessante Gruppe ist die der asymptomatisch erkrankten Kinder. Ihre CD4⁺ T-Zellen weisen eine Aktivierung vergleichbar zu denen von Patienten mit schwereren Symptomen auf (Abb. 16). Somit ist eine leichte Aktivierung vorhanden, die Zellen sind aber weniger aktiviert als bei Infektionen mit mildereren Symptomen. Koinhibitoren exprimieren die CD4⁺ T-Zellen der AS Gruppe jedoch nur sehr wenig und sind in dieser Hinsicht vergleichbar mit der Kontroll-Gruppe (Abb. 14). Dieses könnte ein Hinweis auf eine sehr spezifische und wirksame Bekämpfung der Parasiten sein. So müssen nur wenige Zellen aktiviert werden und die Gefahr einer Gewebeschädigung besteht nicht. Durch diese effiziente Bekämpfung durch nur wenige Zellen müssen die Zellen kein Molekül zur Inaktivierung exprimieren. In Folge von repetitiven Infektionen mit *Pf* kann der Organismus eine Semi-Immunität entwickeln (RAMASAMY, 1998). Semi-immune Menschen können zwar weiterhin von Mücken infiziert werden und weisen meist auch eine sehr geringe Parasitämie auf, entwickeln jedoch keine Symptome (RYG-CORNEJO *et al.*, 2015). Möglicherweise hat ein Großteil der Probanden in der AS Gruppe diesen Zustand bereits erreicht. Eine weitere Erklärung könnte eine gerade erst aufgetretene *Pf* Infektion gewesen sein. Der bei den Probanden angewendete Schnelltest kann zirkulierendes Antigen noch etwa 10 Tage nach der Eliminierung der lebenden Parasiten nachweisen. Haben die Probanden die Infektion also schon überstanden, kann dieser Schnelltest so noch ein positives Ergebnis zeigen. Die Expression der Koinhibitoren mag dann bereits auf das Basis Niveau der gesunden Kontrollen gesunken

sein, die CD4⁺ T-Zellen könnten aber noch ein geringes Aktivierungsmuster vorweisen. Die Charakterisierung der T-Zell-Antwort in asymptomatisch infizierten Probanden kann einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Entwicklung von Immunität gegen den Parasiten und der Entwicklung von Impfstoffen liefern.

5.5 Modell

In der Zusammenfassung aller in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und dem daraus entwickelten Fazit kommt den Tr1 Zellen eine wichtige Rolle zu (Abb. 18). In der *Pf* Malaria wird das Immunsystem und dabei vor allem auch CD4⁺ T-Zellen aktiviert. Daraufhin proliferieren die T-Zellen, was an der Expression von Ki-67 zu sehen ist. Wird eine gewisse Schwelle der Anzahl an T-Zellen oder deren Aktivierung erreicht, erfolgt eine Gegenregulation gegen eine überschießende T-Zell-Aktivierung durch die Induktion von PD-1 und CTLA-4. Diese schränken die Effektorfunktionen der CD4⁺ T-Zellen ein. In manchen Individuen findet dagegen eine ausbalanciertere Aktivierung des Immunsystems während der Malaria statt. In diesem Fall entstehen vermutlich vornehmlich Tr1 Zellen als Antwort auf die Infektion. Diese Tr1 Zellen sind an der Expression von vor allem LAG-3 aber auch Tim-3 zu erkennen. Wird eine ausreichende Anzahl an Tr1 Zellen induziert, erfolgt eine effiziente Eliminierung der Parasiten ohne große Schädigung des Wirts. Diese Regulation erfolgt über eine Produktion von IL-10, Granzym B und Adenosin über die Expression von CD39. Darüber hinaus wird die Produktion von IFN- γ inhibiert.

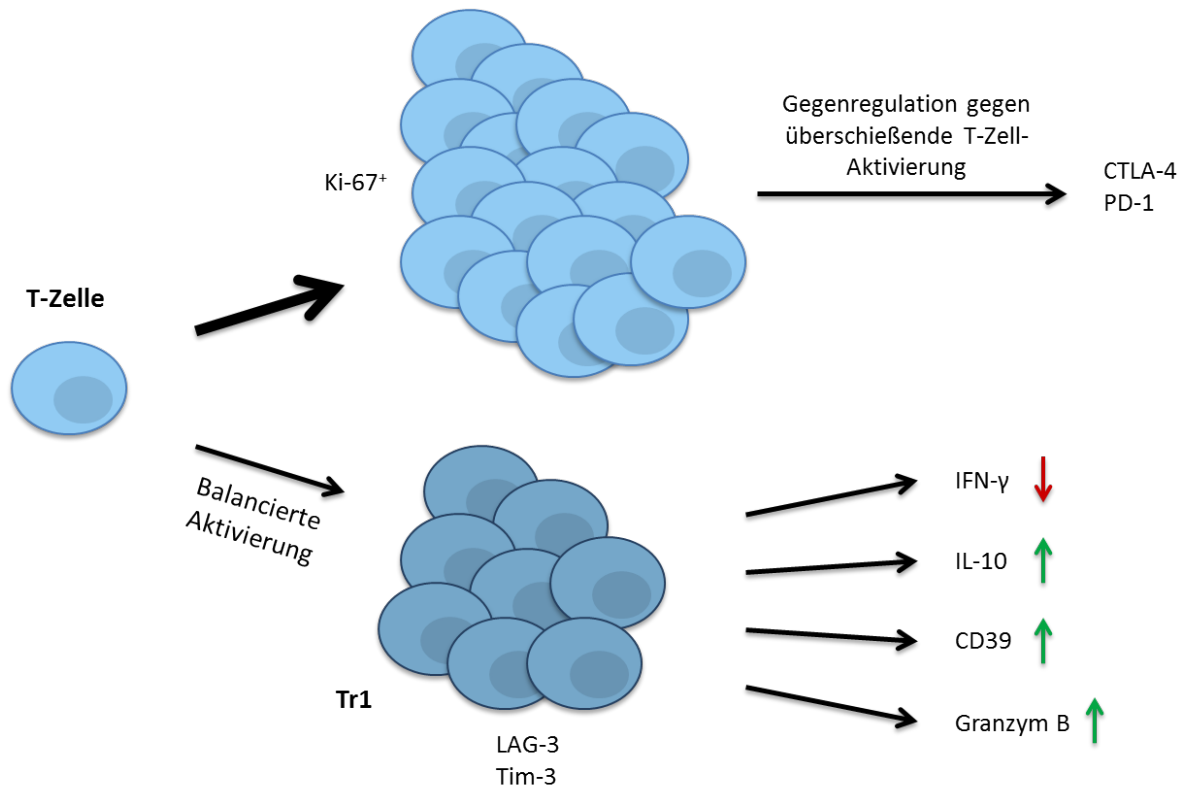


Abb. 18: Modell zu der Regulierung von T-Zellen während der *Pf*Malaria.

In der Malaria proliferieren $CD4^+$ T-Zellen, um in größerer Zahl gegen das eingedrungene Pathogen anzugehen. Eine überschießende Immunantwort wird verhindert, indem die Koinhibitoren PD-1 und CTLA-4 heraufreguliert werden. Einige Zellen kommen jedoch in eine ausbalancierte Aktivierung. Als Tr1 Zellen exprimieren sie LAG-3 und Tim-3, exprimieren CD39 und produzieren IL-10 und Granzym B aber weniger IFN- γ .

5.6 Ausblick

Die phänotypische Charakterisierung von Tr1 Zellen bleibt weiterhin ein Problem in der Immunologie. Die von GAGLIANI und Kollegen definierten Tr1 Marker LAG-3 und CD49b lassen sich vor allem bei humanen Studien nicht in jeder Erkrankung finden (GAGLIANI *et al.*, 2013). Um eine reproduzierbare und eindeutige phänotypische Charakterisierung von Tr1 Zellen vorzunehmen, sind noch weitere Studien in verschiedenen immunologischen Modellen nötig. In ihrer Arbeit konnte die Gruppe eine Koexpression von LAG-3, CD49b und CD226 beobachten. CD226 wäre auch aus anderen Gründen ein interessanter Oberflächenmarker für weitere Untersuchungen als Ergänzung zur vorliegenden Arbeit. Vergleichbar mit dem Netzwerk aus CD28/CTLA-4/CD80/CD86 gibt es ein weiteres Netzwerk, das aus TIGIT/CD226/CD115/CD112 besteht und ähnliche Aufgaben besitzt. TIGIT übernimmt dabei die koinhibitorische Funktion von

Diskussion

CTLA-4 ein, CD226 ist dabei sein kostimulatorischer Gegenspieler. CD115 und CD112 stellen die Liganden für beide Moleküle dar. Eine Integration von CD226 in das Panel anstelle von CD49b wäre eine Möglichkeit die Rolle von Tr1 Zellen in der *Pf* Malaria weiter zu untersuchen. Auch aufgrund der beobachteten Expression von TIGIT in der Infektion und der Koexpression von PD-1 und TIGIT wäre die weitere Analyse dieses Netzwerkes in der *Pf* Malaria von Interesse.

Ein weiterer Untersuchungspunkt dieser Arbeit sollte in weiterführenden Experimenten behandelt werden. Der Mechanismus hinter der suppressiven Wirkung CTLA-4⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen, die im Verlauf der *Pf* Malaria entstehen, konnte auch in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die Ghana Studie aber auch die Ergebnisse aus Hamburg deuten auf einen potentiellen Einfluss von Granzym B aber auch von CD39 hin. Dieses könnte zum Beispiel über eine Inhibition der beiden Enzyme in einem funktionellen Experiment wie es bereits beschrieben wurde erfolgen. Darüber hinaus könnte der Grad an Apoptose in der Ziel-Zell-Population, vermutlich ausgelöst durch Granzym B, untersucht werden.

In Zusammenhang mit der beobachteten Zweiteilung der Koinhibitoren in der Studie, die in Ghana durchgeführt wurde, wäre eine weitere Studie zur Aufklärung der Gründe für die erhöhte Anzahl von LAG-3⁺ und Tim-3⁺ CD4⁺ T-Zellen in Infektionen mit milderem Symptomen im Vergleich zu Infektionen mit schwereren Symptomen sehr interessant. Einerseits könnten tatsächlich Tr1 Zellen Grund für die bessere Immunbalance sein. Andererseits könnten die beiden Koinhibitoren auch eine andere Funktion besitzen. Darüber hinaus stellt sich die Frage des Einflusses von CD39 und Granzym B in die Immunregulation der mildereren Krankheitsverläufe.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten einen Beitrag zu der Entwicklung effektiver Vakzine leisten. Die Erforschung von Vakzinen, die T-Effektorzellen und dessen regulatorische Funktion modulieren, könnte basierend auf dieser Arbeit und den untersuchten Biomarkern vorangetrieben werden. Eine potentielle Strategie wäre die Induktion von LAG-3 auf CD4⁺ T-Zellen, die ihre regulatorische Funktion auf das Immunsystem ausüben können.

6 Literatur

- AKDIS, M., VERHAGEN, J., TAYLOR, A., KARAMLOO, F., KARAGIANNIDIS, C., CRAMERI, R., THUNBERG, S., DENIZ, G., VALENTA, R., FIEBIG, H., KEGEL, C., DISCH, R., SCHMIDT-WEBER, C. B., BLASER, K., UND AKDIS, C. A. (2004): Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells. *J Exp Med*, 199(11):1567-1575.
- ANDERSON, A., JOLLER, N., AND KUCHROO, V. (2016): Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity*, 44:989-1004.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K., TONGREN, J. E., UND RILEY, E. M. (2003): The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol*, 133:145-152.
- ASHLEY, E. A., DHORDA, M., FAIRHURST, R. M., AMARATUNGA, C., LIM, P., SUON, S., SRENG, S., ANDERSON, J. M., MAO, S., SAM, B., SOPHA, C., CHUOR, C. M., NGUON, C., SOVANNAROTH, S., PUKRITTAYAKAMEE, S., JITTAMALA, P., CHOTIVANICH, K., CHUTASMIT, K., SUCHATSOONTHORN, C., RUNCHAROEN, R., HIEN, T. T., THUY-NHIEN, N. T., THANH, N. V., PHU, N. H., HTUT, Y., HAN, K.-T., AYE, K. H., MOKUOLU, O. A., OLAOSEBIKAN, R. R., FOLARANMI, O. O., MAYXAY, M., KHANTHAVONG, M., HONGVANTHONG, B., NEWTON, P. N., ONYAMBOKO, M.A., FANELLO, C. I., TSHEFU, A. K., MISHRA, N., VALECHA, N., PHYO, A. P., NOSTEN, F., YI, P., TRIPURA, R., BORRMANN, S., BASHRAHEIL, M., PESHU, J., FAIZ, M. A., GHOSE, A., HOSSAIN, M. A., SAMAD, R., RAHMAN, M. R., HASAN, M. M., ISLAM, A., MIOTTO, O., AMATO, R., MACINNIS, B., STALKER, J., KWIATKOWSKI, D. P., BOZDECH, Z., JEEYAPANT, A., CHEAH, P. Y., SAKULTHAEW, T., CHALK, J., INTHARABUT, B., SILAMUT, K., LEE, S. J., VIHOKHERN, B., KUNASOL, C., IMWONG, M., TARNING, J., TAYLOR, W. J., YEUNG, S., WOODROW, C. J., FLEGG, J. A., DAS, D., SMITH, J., VENKATESAN, M., PLOWE, C. V., STEPNIIEWSKA, K., GUERIN, P. J., DONDORP, A. M., DAY, N. P., AND WHITE, N. J., FOR THE TRACKING RESISTANCE TO ARTEMISININ COLLABORATION (TRAC) (2014): Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med*, 317(5):411-423.
- BACCHETTA, R., BIGLER, M., TOURAINE, J.-L., PARKMAN, R., TOVO, P.-A., ABRAMS, J., DE WAAL MALEFYT, R., DE VRIES, J. E., UND RONCAROLO, M.-G. (1994): High Levels of Interleukin 10 Production In Vivo Are Associated with Tolerance in SCID Patients Transplanted with HLA Mismatched Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med*, 179:493-502.
- BACCHETTA, R., SARTIRANA, C., LEVINGS, M. K., BORDIGNON, C., NARULA, S., UND RONCAROLO, M. G. (2002): Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol*, 32:2237-2245.

Literatur

- BERTOLINO, P., UND BOWEN, D. G. (2015): Malaria and the Liver: immunological hide-and seek or subversion of immunity from within. *Front Microbiol*, 6:41.
- BLINK, E. J., TRAPANI, J. A., UND JANS, D. A. (1999): Perforin-dependent nuclear targeting of granzymes: A central role in the nuclear events of granule-exocytosis-mediated apoptosis? *Immunol Cell Biol*, 77(3):206-15.
- BONI, C., FISICARO, P., VALDATTA, C., AMADEI, B., DI VINCENZO, P., GIUBERTI, T., LACCABUE, D., ZERBINI, A., CAVALLI, A., MISSALE, G., BERTOLETTI, A., UND FERRARI, C. (2007): Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *J Virol*, 81(8):4215-4225.
- BONO, M. R., FERNÁNDEZ, D., FLORES-SANTIBÁÑEZ, F., ROSEMBLATT, M., UND SAUMA, D. (2015): CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett*, 589(22):3454-60.
- BUTLER, N. S., MOEBIUS, J., PEWE, L. L., TRAORE, B., DUOMBO, O. K., TYGRET, L. T., WALDSCHMIDT, T. J., CROPMTON, P. D., UND HARTY, J. T. (2012): Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nature Immunol*, 13(2):188-195.
- CLEMENTE, A. M., FADIGATI, G., CAPORALE, R., MARCHESE, D. G., CASTRONOVO, G., SANNELLA, A. R., SEVERINI, C., VERRA, F., GARACI, E., COZZOLINO, F., UND TORCIA, M. G. (2013): Modulation of the Immune and Inflammatory Responses by *Plasmodium falciparum* Schizont Extracts: Role of Myeloid Dendritic Cells in Effector and Regulatory Functions of CD4+ Lymphocytes. *Infect Immun*, 81(5):1842-1851.
- COUPER, K. N., BLOUNT, D. G., WILSON, M. S., HAFALLA, J. C., BELKAID, Y., KAMANAKA, M., FLAVELL, R. A., DE SOUZA, J. B., UND RILEY, E. M. (2008): IL-10 from CD4+CD25-Foxp3-CD127- adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *Plos Pathog*, 4(2):e1000004.
- COSTA, P. A. C., LEORATTI, F. M. S., FIGUEIREDO, M. M., TADA, M. S., PEREIRA, D. B., JUNQUEIRA, C., SOARES, I. S., BARBER, D. L., GAZZINELLI, R. T., UND ANTONELLI, L. R. (2015): Induction of inhibitory receptors on T cells during *Plasmodium vivax* malaria impairs cytokine production. *J Infect Dis*, 212(12):1999-2010.
- DAY, C. L., KAUFMANN, D. E., KIEPIELA, P., BROWN, J. A., MOODLEY, E. S., REDDY, S., MACKEY, E. W., MILLER, J. D., LESLIE, A. J., DEPIERRES, C., MNCUBE, Z., DURAIWAMY, J., ZHU, B., EICHBAUM, Q., ALTFELD, M., WHERRY, E. J., COOVADIA, H. M., GOULDER, P. J. R., KLENERMAN, P., AHMED, R., FREEMAN, G. J., UND WALKER, B. D. (2006): PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443:350-354.

Literatur

- DONDORP, A. M., DESAKORN, V., PONGTAVORNPINYO, W., SAHASSANANDA, D., SILAMUT, K., CHOTIVANICH, K., NEWTON, P. N., PITISUTTITHUM, P., SMITHYMAN, A. M., WHITE, N. J., DAY, N. P. J. (2005): Estimation of the Total Parasite Biomass in Acute *Falciparum* Malaria from Plasma PfHRP2. PLOS Med, 2(8):e204.
- DURHAM, N. M., NIRSCHE, C., JACKSON, C. M., ELIAS, J., KOCHER, C. M., ANDERS, R. A., UND DRAKE, C. G. (2014): Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T cells to be suppressed *in vivo*. PLoS ONE 9(11): e109080.
- FACCIOTTI, F., GAGLIANI, N., HÄRINGER, B., ALFEN, J.S., PENATTI, A., MAGLIE, S., PARONI, M., ISEPPO, A., MORO, M., CROSTI, M.C., STÖLZEL, K., ROMAGNANI, C., MORONI, G., INGEGNOLI, F., TORRETTA, S., PIGNATARO, L., ANNONI, A., RUSSO, F., PAGANI, M., ABRIGNANI, S., MERONI, P., FLAVELL, R., UND GEGINAT, J. (2016): IL-10-producing forkhead box protein 3-negative regulatory T cells inhibit B-cell responses and are involved in systemic lupus erythematosus. J Allergy Clin Immunol, 137(1):318-321.
- FREEMAN, G. J., LONG, A. J., IWAI, Y., BOURQUE, K., CHERNOVA, T., NISHIMURA, H., FRITZ, L. J., MALENKOVICH, N., OKAZAKI, T., BYRNE, M. C., HORTON, H. F., FOUSER, L., CARTER, L., LING, V., BOWMAN, M. R., CARRENO, B. M., COLLINS, M., WOOD, C. R. UND HONJO, T. (2000): Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. J Exp Med, 192(7), 1027-1034.
- FROMENTIN, R., BAKEMAN, W., LAWANI, M.B., DAFONSECA, S., KILLIAN, M., EPLING, L., HOH, R., SINCLAIR, E., HECHT, F.M., BACCHETTI, P., DEEKS, S.G., LEWIN, S.R., SEKALY, R.-P., AND CHOMONT, N. (2016): CD4+ T cells expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 contribute to HIV persistence during ART. PLoS Pathog, 12(7): e1005761.
- GAGLIANI, N., MAGNANI, C. F., HUBER, S., GIANOLINI, M. E., PALA, M., LICONA-LIMON, P., GUO, B., HERBERT, D. R., BULFONE, A., TRENTINI, F., DI SERIO, C., BACCHETTA, R., ANDREANI, M., BROCKMANN, L., GREGORI, S., FLAVELL, R. A., UND RONCAROLO, M. G. (2013): Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. Nat Med, 19(6): 739-46.
- GOLDEN-MASON, L., PALMER, B. E., KASSAM, N., TOWNSHEND-BULSON, L., LIVINGSTON, S., MCMAHON, B. J., CASTELBLANCO, N., KUCHROO, V., GRETCH, D. R., UND ROSEN, H. R. (2009): Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. J Virol, 83(18):9122-30.
- GOUBARD, A., LOÏEZ, C., ABE, J., FICHEL, C., HERWEGH, S., FAVEEUW, C., PORTE, R., CAYET, D., SEBBANE, F., PENET, S., FOLIGNÉ, B., DESREUMAUX, P., SAITO, H., SIRARD, J. C., SIMONET, M., UND CARNOY, C. (2015): Superantigenic *Yersinia pseudotuberculosis* induces the expression of granzymes and perforin by CD4+ T cells. Infect Immun, 83(5):2053-64.
- GRAY, D. (2000): Thanks for the memory. Nat Immunol, 1(1), 11-12.

Literatur

- GROUX, H., O'GARRA, A., BIGLER, M., ROULEAU, M., ANTONENKO, S., DE VRIES, J., UND RONCAROLO, M. G. (1997): A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389:737-742.
- GROSSMAN, W. J., VERBSKY, J. W., TOLLEFSEN, B. L., KEMPER, C., ATKINSON, J. P., UND LEY, T. J. (2004): Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104(9):2840-2848.
- HAFALLA, J. C. R., CLASER, C., COUPER, K. N., GRAU, G. E., RENIA, L., DE SOUZA, J. B., UND RILEY, E. M. (2012): The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitory pathways independently regulate host resistance to *Plasmodium* induced acute immune pathology. *PLoS Pathog*, 8(2):e1002504.
- HAMID, O., ROBERT, C., DAUD, A., HODI, F. S., HWU, W.-J., KEFFORD, R., WOLCHOK, J. D., HERSEY, P., JOSEPH, R. W., WEBER, J. S., DRONCA, R., GANGADHAR, T. C., PATNAIK, A., ZAROUB, H., JOSHUA, A. M., GERGICH, K., ELASSAISS-SCHAAP, J., ALGAZI, A., MATEUS, C., BOASBERG, P., TUMEH, P. C., CHMIELOWSKI, B., EBBINGHAUS, S. W., LI, X. N., KANG, S. P., UND RIBAS, A. (2013): Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N Engl J Med*, 369(2):134-144.
- HAN, P., GOULARTE, O. D., RUFNER, K., WILKINSON, B. UND KAYE, J. (2004): An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J Immunol*, 172, 5931-5939.
- HAN, G., CHEN, G., SHEN, B., UND LI, Y. (2013): Tim-3: an activation marker and activation limiter of innate immune cells. *Front Immunol*, 4:449. doi: 10.3389.
- HASTINGS, W. D., ANDERSON, D. E., KASSAM, N., KOGUCHI, K., GREENFIELD, E. A., KENT, S. C., ZHENG, X. X., STROM, T. B., HAFLER, D. A., UND KUCHROO, V. K. (2009): Tim-3 is Expressed on Activated Human CD4⁺ T Cells and Regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol.*, 39(9):2492-2501.
- HATHCOCK, K. S., LASZLO, G., PUCILLO, C., LINSLEY, P. & HODES, R. J. (1994): Comparative Analysis of B7-1 and B7-2 Costimulatory Ligands: Expression and Function. *J Exp Med*, 180, 631-640.
- HERMSEN, C. C., KONIJNENBERG, Y., MULDER, L., LOE, C., VAN DEUREN, M., VAN DER MEER, J. W. M., VAN MIERLOS, G.J., ELING, W. M. C., HACK, C. E., UND SAUERWEIN, R. W. (2003): Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmosium falciparum* infections. *Clin Exp Immunol*, 132:467-472.
- HISEADA, H., MAEKAWA, Y., IWAKAWA, D., OKADA, H., HIMENO, K., KISHIHARA, K., TSUKUMO, S.-I., UND YASUTOMO, K. (2004): Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med*, 10(1):29-30.
- HO, M. & WHITE, N. J. (1999): Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol*, 276: C1231-C1242.

Literatur

- HOMBACH, A., KÖHLER, H., RAPPL, G., UND ABKEN, H. (2006): Human CD4⁺ T cells lyse target cells via granzyme/perforin upon circumvention of MHC class II restriction by an antibody-like immunoreceptor. *J Immunol*, 177(8):5668-75.
- HUA, L., YAO, S., PHAM, D., JIANG, L., WRIGHT, J., SAWANT, D., DENT, A. L., BRACIALE, T. J., KAPLAN, M. H., UND SUN, J. (2013): Cytokine-dependent induction of CD4⁺ T cells with cytotoxic potential during influenza virus infection. *J Virol*, 87(21):11884-93.
- HUANG, B., HUANG, S., LIU, M., CHEN, Y., WU, B., GUO, H., SU, X.-Z., UND LU, F. (2013): T cell Ig and mucin-1 and -3 in *Plasmodium berghei* ANKA infection. *Parasitol Res*, 112(7):2713-2719.
- HURCHLA, M. A., SEDY, J. R. UND MURPHY, K.M. (2007): Unexpected Role of B and T Lymphocyte Attenuator in Sustaining Cell Survival during Chronic Allostimulation. *J Immunol*, 178, 6073-6082.
- HÄRINGER, B., LOZZA, L., STECKEL, B., UND GEGINAT, J. (2009): Identification and characterization of IL-10/IFN- γ -producing effector-like T cells with regulatory function in human blood. *JEM*, 206(5):1009-1017.
- ILLINGWORTH, J., BUTLER, N. S., ROETNYCK, S., MWACHARO, J., PIERCE, S. K., BEJON, P., CROMPTON, P. D., MARSH, K., UND NDUNGU, F. M. (2013): Chronic exposure to *Plasmodium falciparum* is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. *J Immunol*, 190:1038-1047.
- ISHIDA, M., IWAI, Y., TANAKA, Y., OKAZAKI, T., FREEMAN, G. J., MINATO, N. UND HONJO, T. (2002): Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett*, 84(1), 57-62.
- IWATA, A., WATANABE, N., OYA, Y., OWADA, T., IKEDA, K., SUTO, A., KAGAMI, S.-I., HIROSE, K., KANARI, H., KAWASHIMA, S., NAKAYAMA, T., TANIGUCHI, M., IWAMOTO, I., UND NAKAJIMA, H. (2010): Protective Roles of B and T Lymphocyte Attenuator in NKT Cell-Mediated Experimental Hepatitis. *J Immunol*, 184, 127-133
- JACOBS, T., GRAEFE, S. E. B., NIKNAFS, S., GAWORSKI, I., UND FLEISCHER, B. (2002): Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. *J Immunol*, 169:2323-2329.
- JANGPATARAPONGSA, K., CHOOTONG, P., SATTABONGKOT, J., CHOTIVANICH, K., SIRICHAISINTHOP, J., TUNGPRADABKUL, S., HISAEDA, H., TROYE-BLOMBERG, M., CUI, L., UND UDOMSANGPETCH, R. (2008): *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 38(10):2697-2705.
- JANKOVIC, D., KULLBERG, M. C., FENG, C. G., GOLDSZMID, R. S., COLLAZO, C. M., WILSON, M., WYNN, T. A., KAMANAKA, M., FLAVELL, R. A., UND ALAN SHER (2007): Conventional T-bet⁺Foxp3⁻Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med*, 204(2):273-283.

Literatur

- JIN, H.-T., ANDERSON, A. C., TAN, W. G., WEST, E. E., HA, S.-J., ARAKI, K., FREEMAN, G. J., KUCHROO, V. K., UND AHMED, R. (2010): Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *PNAS*, 107(33):14733-14738.
- KASLOW, D. C. & BIERNAUX, S. (2015): RTS,S: Toward a first landmark on the Malaria Vaccine Technology Roadmap. *Vaccine*, 33:7425-7432.
- KEIR, M. E., BUTTE, M. J., FREEMAN, G. J., UND SHARPE, A. H. (2008): PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 26:677:704.
- KITANI, A., CHUA, K., NAKAMURA, K., UND STROBER, W. (2000): Activated Self-MHC-Reactive T Cells Have the Cytokine Phenotype of Th3/T Regulatory Cell 1 T Cells. *J Immunol*, 165:691-702.
- KRIEG, C., HAN, P., STONE, R., GOULARTE, O.D., UND KAYE, J. (2005): Functional Analysis of B and T Lymphocyte Attenuator Engagement on CD4 and CD8 T Cells. *J Immunol*, 175:6420-6427.
- KRISHNEGOWDA, G., HAJJAR, A. M., ZHU, J., DOUGLASS, E. J., UEMATSU, S., AKIRA, S., WOODS, A. S., UND GOWDA, D. C. (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. *J Biol Chem*, 280(9):8606-8616.
- KURTZ, J. (2004): Memory in the innate and adaptive immune system. *Microbes Infect*, 6, 1410-1417.
- LEPENIES, B., PFEFFER, K., HURCHLA, M. A., MURPHY, T. L., MURPHY, K. M., OETZEL, J., FLEISCHER, B., UND JACOBS, T. (2007): Ligation of B and T Lymphocyte Attenuator Prevents the Genesis of Experimental Cerebral Malaria. *J Immunol*, 179,4093-4100.
- LEVIN, S. D., TAFT, D. W., BRANDT, C. S., BUCHER, C., HOWARD, E. D., CHADWICK, E. M., JOHNSTON, J., HAMMOND, A., BONTADELLI, K., ARDOUREL, D., HEBB, L., WOLF, A., BUKOWSKI, T. R., RIXON, M., W., KUIJPER, J. L., OSTRANDER, C. D., WEST, J. W., BILSBOROUGH, J., FOX, B., GAO, Z., XU, W., RAMSDELL, F., BLAZAR, B. R., UND LEWIS, K. E. (2011): Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur J Immunol*, 41:902-915.
- LIANG, S. C., LATCHMAN, Y. E., BUHLMANN, J. E., TOMCZAK, M. F., HORWITZ, B. H., FREEMAN, G. J. UND SHARPE, A. H. (2003): Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J Immunol*, 33, 2706-2716.
- LIAO, W., LIN, J. X., UND LEONARD, W. J. (2013): Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*, 38(1):13-25.
- LINSLEY, P. S., BRADSHAW, J., GREENE, J., PEACH, R., BENNETT, K. L., UND MITTLER, R. S. (1996): Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*, 4(6):535-43.

Literatur

- LOZANO, E., DOMINGUEZ-VILLAR, M., KUCHROO, V., UND HAFLER, D. A. (2012): The TIGIT/CD226 Axis regulates human T cell function. *J Immunol*, 188:3869-3875.
- MALAGUARMERA, L., UND MUSUMECI, S. (2002): The immune response to *Plasmosium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis*, 2:472-478.
- MCMAHAN, R. H., GOLDEN-MASON, L., NISHIMURA, M. I., MCMAHON, B. J., KEMPER, M., ALLEN, T. M., GRETCH, D. R., UND ROSEN, H. R. (2010): Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest*, 120(12):4546-4557.
- MONNEY, L., SABATOS, C. A., GAGLIA, J. L., RYU, A., WALDNER, H., CHERNOVA, T., MANNING, S., GREENFIELD, E. A., COYLE, A. J., SOBEL, R. A., FREEMAN, G. J., UND KUCHROO, V. K. (2002): Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, 415(6871):536-41.
- MOTA, M. M., PRADEL, G., VANDERBERG, J. P., HAFALLA, J. C. R., FREVERT, U., NUSSENZWEIG, R. S., NUSSENZWEIG, V., UND RODRIGUEZ, A. (2001): Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells before Infection. *Science*, 291:141-144.
- MURPHY, K. M., NELSON, C. A. & SEDY, J. R. (2006): Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat Rev Immunol*, 6, 671-681.
- NEBBIA, G., PEPPA, D., SCHURICH, A., KHANNA, P., SINGH, H. D., CHENG, Y., ROSENBERG, W., DUSHEIKO, G., GILSON, R., CHINALEONG, J., KENNEDY, P., UND MAINI, M. K. (2012): Upregulation of the Tim-3/galectin-9 pathway of T cell exhaustion in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS One*, 7(10):e47648.
- OKAZAKI, T., OKAZAKI, I.-M., WANG, J., SUGIURA, D., NAKAKI, F., YOSHIDA, T., KATO, Y., FAGARASAN, S., MURAMATSU, M., ETO, T., HIOKI, K., UND HONJO, T. (2011): PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. *J Exp Med*, 208(2):395-407.
- PARROCHE, P., LAUW, F. N., GOUTAGNY, N., LATZ, E., MONKS, B. G., VISINTIN, A., HALMEN, K. A., LAMPHIER, M., OLIVIER, M., BARTHOLOMEU, D. C., GAZZINELLI, R. T., UND GOLENBOCK, D. T. (2007): Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *PNAS*, 104(6):1919-1924.
- PENNA, A., PILLI, M., ZERBINI, A., ORLANDINI, A., MEZZADRI, S., SACCHELLI, L., MISSALE, G., UND FERRARI, C. (2007): Dysfunction and Functional Restoration of HCV-Specific CD8 Responses in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology*, 45(3):588-601.
- PLEBANSKI, M., FLANAGAN, K.L., LEE, E.A.M., REECE, W.H.H., HART, K., GELDER, C., GILLESPIE, G., PINDER, M., UND HILL, A.V.S. (1999): Interleukin 10-mediated immunosuppression by a variant CD4 T cell eitope of *Plasmodium falciparum*. *Immunity*, 10: 651-660.
- RAMASAMY, R. (1998): Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochim Biophys Acta*, 1406(1):10-27.

Literatur

- RUIBAL, P., OESTEREICH, L., LÜDTKE, A., BECKER-ZIAJA, B., WOZNIAK, D. M., KERBER, R., KORVA, M., CABEZA-CABRERIZO, M., BORE, J. A., KOUNDOUNO, F. R., DURAFFOUR, S., WELLER, R., THORENZ, A., CIMINI, E., VIOLA, D., AGRATI, C., REPITS, J., AFROUGH, B., COWLEY, L. A., NGABO, D., HINZMANN, J., MERTENS, M., VITORIANO, I., LOGUE, C. H., BOETTCHER, J. P., PALLASCH, E., SACHSE, A., BAH, A., NITZSCHE, K., KUISMA, E., MICHEL, J., HOLM, T., ZEKENG, E. G., GARCÍA-DORIVAL, I., WÖLFEL, R., STOECKER, K., FLEISCHMANN, E., STRECKER, T., DI CARO, A., AVŠIČ-ŽUPANC, T., KURTH, A., MESCHI, S., MÉLY, S., NEWMAN, E., BOCQUIN, A., KIS, Z., KELTERBAUM, A., MOLKENTHIN, P., CARLETTI, F., PORTMANN, J., WOLFF, S., CASTILLETI, C., SCHUDT, G., FIZET, A., OTTOWELL, L. J., HERKER, E., JACOBS, T., KRETSCHMER, B., SEVERI, E., OUEDRAOGO, N., LAGO, M., NEGREDO, A., FRANCO, L., ANDA, P., SCHMIEDEL, S., KREUELS, B., WICHMANN, D., ADDO, M. M., LOHSE, A. W., DE CLERCK, H., NANCLARES, C., JONCKHEERE, S., VAN HERP, M., SPRECHER, A., XIAOJIANG, G., CARRINGTON, M., MIRANDA, O., CASTRO, C. M., GABRIEL, M., DRURY, P., FORMENTY, P., DIALLO, B., KOIVOGUI, L., MAGASSOUBA, N., CARROLL, M. W., GÜNTHER, S., MUÑOZ-FONTELA C. (2016): Unique human immune signature of Ebola virus disease in Guinea. *Nature*, 533(7601):100-104.
- RYG-CORNEJO, V., LY, A., UND HANSEN, D. S. (2015): Immunological processes underlying the slow acquisition of humoral immunity to malaria. *Parasitology*, 143:199–207.
- SCHLOTMANN, T., WAASE, I., JÜLCH, C., KLAUENBERG, U., MÜLLER-MYHSOK, B., DIETRICH, M., FLEISCHER, B., UND BRÖKER, B. M. (2000): CD4 $\alpha\beta$ T lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. *J Infect Dis*, 182:367-70.
- SCHOLZEN, T., UND GERDES, J. (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3):311-22.
- SCHULER, P. J., SAZE, Z., HONG, C.-S., MULLER, L., GILLESPIE, D. G., CHENG, D., HARASYMCZUK, M., MANDAPATHIL, M., LANG, S., JACKSON, E. K., UND WHITESIDE, T. L. (2014): Human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin Exp Immunol*, 177: 531–543.
- SCHÜTT, C. & BRÖKER, B. (2011): *Grundwissen Immunologie*, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 268 S.
- SEBASTIANI, S., ALLAVENA, P., ALBANESI, C., NASORRI, F., BIANCHI, G., TRAILL, C., SOZZANI, S., GIROLOMONI, G., UND CAVANI, A. (2001): Chemokine Receptor Expression and Function in CD4+ T Lymphocytes with Regulatory Activity. *J Immunol*, 166: 996-1002.
- SHARPE, A. H. UND FREEMAN, G. J. (2002): The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2(2):116-126.
- SHEN, T., ZHENG, J., XU, C., LIU, J., ZHANG, W., LU, F., UND ZHUANG, H. (2010): PD-1 expression on peripheral CD8+ TEM/TEMRA subsets closely correlated with HCV viral load in chronic hepatitis C patients. *Virol J*, 7:310.

Literatur

- SUN, J., MADAN, R., KARP, C. L., UND BRACIALE, T. J. (2009): Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med*, 15(3):277-284.
- SURH, C. D., BOYMAN, O., PURTON, J. F., UND SPRENT, J. (2006): Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev*, 211:154-63.
- TAO, R., WANG, L., HAN, R., WANG, T., YE, Q., HONJO, T., MURPHY, T. L., MURPHY, K. M. UND HANCOCK, W. W. (2005): Differential Effects of B and T Lymphocyte Attenuator and Programmed Death-1 on Acceptance of Partially versus Fully MHC-Mismatched Cardiac Allografts. *J Immunol*, 175, 5774-5782.
- TEFT, W. A., CHAU, T. A., MADRENAS, J. (2009): Structure-Function analysis of the CTLA-4 interaction with PP2A. *BMC Immunol*. 10:23. doi: 10.1186/1471-2172-10-23.
- TOPALIAN, S. L., SZNOL, M., MCDERMOTT, D. F., KLUGER, H. M., CARVAJAL, R. D., SHARFMAN, W. H., BRAHMER, J. R., LAWRENCE, D. P., ATKINS, M. B., POWDERLY, J. D., LEMING, P. D., LIPSON, E. J., PUZANOV, I., SMITH, D. C., TAUBE, J. M., WIGGINTON, J. M., KOLLIA, G., D., GUPTA, A., PARDOLL, D. M., SOSMAN, J. A., UND HODI, F. S. (2014): Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivoluma. *J Clin Oncol*, 32(10):1020-1030.
- TRIEBEL, F., JITSUKAWA, S., BAIXERAS, E., ROMAN-ROMAN, S., GENEVEE, C., VIEGAS-PEQUIGNOT, E., UND HERCAND, T. (1990): LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*, 171(5):1393-1405.
- TUTEJA, R. (2007): Malaria- an overview. *FEBS J*, 274(18):4670-4679.
- VEIGA-FERNANDES, H., WALTER, U., BOURGEOIS, C., MCLEAN, A. & ROCHE B. (2000): Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation *in vivo*. *Nat Immunol*, 1(1): 47-53.
- VELU, V., SHETTY, R. D., LARSSON, M., UND SHANKAR, E. M. (2015): Role of PD-1 co-inhibitory pathways in HIV infection and potential therapeutic options. *Retrovirology*, 12(14).
- VIBHAKAR, R., JUAN, G., TRAGANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z. UND FINGER, L. R. (1997): Activation Induced Expression of Human Programmed Death-1 Gene in T Lymphocytes. *Exp Cell Res*, 232(1): 25-28.
- WALTHER, M., TONGREN, J. E., ANDREWS, L., KORBEL, D., KING, E., FLETCHER, H., ANDERSEN, R. F., BEJON, P., THOMPSON, F., DUNACHIE, S. J., EDELE, F., DE SOUZA, J. B., SINDEN, R. E, GILBERT, S. C., RILEY, E. M., UND HILL, A. V. S. (2005): Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*, 23:287-296.

Literatur

- WALTHER, M., JEFFRIES, D., FINNEY, O. C., NJIE, M., EBONYI, A., DEININGER, S., LAWRENCE, E., NGWA AMAMBUA, A., JAYASOORIYA, S., CHEESEMAN, I. H., GOMEZ-ESCOBAR, N., OKEBE, J., CONWAY, D. J., UND RILEY, E. M. (2009): Distinct roles for FOXP3+ and FOXP3- CD4+ T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. PLoS Pathogens, 5(4):e1000364.
- WALUNAS, T. L., LENSCHOW, D. J., BAKKER, C. Y., LINSLEY, P. S., FREEMAN, G. J., GREEN, J. M., THOMPSON, C. B. & BLUESTONE, J. A. (1994): CTLA-4 Can Function as a Negative Regulator of T Cell Activation. Immunity, 1, 405-413.
- WALUNAS, T. L., BAKKER, C. Y. & BLUESTONE, J. A. (1996): CTLA-4 Ligation Blocks CD28 dependent T Cell Activation. J Exp Med, 183, 2541-2550.
- WATANABE, N., GAVRIELI, M., SEDYL, J. R., YANG, J., FALLARINO, F., LOFTIN, S. K., HURCHLA, M. A., ZIMMERMANN, N., SIM, J., ZANG, X., MURPHY, T. L., RUSSEL, J. H., ALLISON, J. P. & MURPHY, K. M. (2003): BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. Nat Immunol, 4(7), 670-679.
- WHO (2016): World Malaria Report 2015. 280 Seiten. ISBN 978 92 4 156515 8.
- WOLCHOK, J. D., KLUGER, H., CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A., RIZVI, N. A., LESOKHIN, A. M., SEGAL, N. H., ARIYAN, C. E., GORDON, R.-A., REED, K., BURKE, M. M., CALDWELL, A., KRONENBERG, S. A., AGUNWAMBA, B. U., ZHANG, X., LOWY, I., INZUNZA, H. D., FEELY, W., HORAK, C. E., HONG, Q., KORMAN, A. J., WIGGINTON, J. M., GUPTA, A., UND SZNOL, M. (2013): Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med, 369:122-133.
- WORKMAN, C. J., DUGGER, K. J., UND VIGNALI, D. A. A. (2002): Cutting Edge: Molecular Analysis of the Negative Regulatory Function of Lymphocyte Activation Gene-3. J Immunol, 169:5392-5395.
- ZHANG, Z., ZHANG, J.Y., WHERRY, E. J., JIN, B., XU, B., ZOU, Z.-S., ZHANG, S.-Y., LI, B.-S., WANG, H.-F., WU, H., LAU, G. K. K., FU, Y.-X., UND WANG, F.-S. (2008): Dynamic Programmed Death 1 Expression by Virus-Specific CD8 T Cells Correlates With the Outcome of Acute Hepatitis B. Gastroenterology, 134:1938-1949.

7 Anhang

7.1 Zusammenfassung

Eine Feinabstimmung des Immunsystems während *Plasmodium falciparum* (*Pf*) Malaria ist von großer Bedeutung. Wird diese Feinabstimmung gestört, kann eine schwere Pathologie entstehen. Diese Feinabstimmung kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. Einer dieser möglichen Faktoren ist die richtige Balance zwischen kostimulatorischen und koinhibitorischen Signalen. In chronischen viralen Infektion sorgen kostimulatorische Moleküle wie CTLA-4, PD-1, LAG-3, Tim-3, BTLA und TIGIT für eine Inhibition der T-Zell-Antwort und die T-Zellen nehmen einen erschöpften Phänotyp an. Die vorliegende Arbeit befasst sich aus diesem Grund mit der Expression und Funktion von koinhibitorischen Molekülen auf CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria. Dabei wurde eine Induktion von CTLA-4, PD-1, LAG-3, Tim-3 und TIGIT während der *Pf* Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollen beobachtet. Außerdem konnte eine größere Anzahl CTLA-4⁺ und PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen bei Infektionen mit schwereren Symptomen als bei Infektionen mit milden Symptomen festgestellt werden. Dagegen liegt bei Infektionen mit milden Symptomen eine größere Anzahl LAG-3⁺ und Tim-3⁺ CD4⁺ T-Zellen vor als bei Infektionen mit schwereren Symptomen. In *Pf* Malaria mit schwereren Symptomen konnte darüber hinaus auch ein größerer Grad an Koexpression von koinhibitorischen Molekülen festgestellt werden als bei Infektionen mit mildereren Symptomen oder gesunden Kontrollen. Neben diesen Koinhibitoren exprimieren CD4⁺ T-Zellen in der *Pf* Malaria auch Aktivierungsmarker und Effektormoleküle wie Ki-67, CD69, CD127, CD39, Granzym B und Perforin. Darüber hinaus korreliert die Anzahl von PD-1⁺ und CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen mit der Parasitämie von *Pf* Malaria Patienten aus einem endemischen Gebiet. Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit beschreibt den suppressiven Charakter CTLA-4⁺PD-1⁺ CD4⁺ T-Zellen von *Pf* Malaria Patienten auf autologe CD4⁺ T-Zellen *in vitro*, der auf den Phänotyp von Tr1 Zellen hindeutet oder aber durch die zytotoxischen Eigenschaften dieser Zellen hervorgerufen wird.

7.2 Summary

During *Plasmodium falciparum* (*Pf*) malaria, a fine tuning of the immune system is essential. When this fine tuning is disturbed, severe pathology can develop. Fine tuning is realized by several factors. The right balance between costimulatory and coinhibitory signals to CD4⁺ T cells is one of these factors. In chronic viral infections, costimulatory molecules like CTLA-4, PD-1, LAG-3, Tim-3, BTLA, and TIGIT are thought to be responsible for the exhausted phenotype of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. In this study, expression and function of coinhibitory molecules expressed by CD4⁺ T cells during *Pf* malaria were investigated. In comparison to healthy controls, CD4⁺ T cells of *Pf* malaria patients express more CTLA-4, PD-1, LAG-3, Tim-3, and TIGIT. In addition, there are more CTLA-4⁺ and PD-1⁺ CD4⁺ T cells in infections with severer symptoms than in mild infections, whereas there are more LAG-3⁺ and Tim-3⁺ CD4⁺ T cells in infections with milder symptoms than in severer infections. Furthermore, in *Pf* infections with severer symptoms, a higher degree of CD4⁺ T cells coexpressing several coinhibitory molecules could be observed than in infections with milder symptoms. Besides coinhibitory molecules, CD4⁺ T cells also express activation markers as well as effector molecules like Ki-67, CD69, CD127, CD39, Granzyme B und Perforin. Furthermore, in *Pf* malaria with severer symptoms, there was a correlation between percentages of CTLA-4⁺ and PD-1⁺ CD4⁺ T cells and parasitemia of patients in an endemic region. Another observation of this study is a suppressive character of CTLA-4⁺PD-1⁺ CD4⁺ T cells facing autologous CD4⁺ T cells *in vitro*. This observation may plead for the phenotype of Tr1 cells or for cytotoxic properties of this cell population.