

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Tannich

Untersuchung koinhibitorischer Rezeptoren in Leber- und Blutphase der humanen Malaria

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Hannes Otto Michelsen
aus Hamburg

Hamburg 2020

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: **01.04.2021**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **Prof. Dr. Marcus Altfeld**

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: **PD. Dr. Thomas Jacobs**

Persistent Identifier: urn:nbn:de:gbv:18-ediss-92004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Lebenszyklus	2
1.1.3	Klinik	3
1.2	Immunologie	4
1.2.1	Das adaptive Immunsystem	4
1.2.2	T-Lymphozyten	5
1.2.3	Periphere Toleranz	8
1.3	Koinhibitorische Moleküle	10
1.3.1	CTLA-4	11
1.3.2	PD-1	11
1.3.3	Tim-3	12
1.3.4	LAG-3	12
1.3.5	TIGIT	13
1.4	Malariaspezifische Immunologie	14
1.4.1	T-Zellen in der akuten humanen Malaria	14
1.4.2	Immunpathologie	15
1.4.3	Schutz vor (Re-) Infektionen	15
1.4.4	Koinhibitoren in der Malaria	16
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	17
2	Probanden, Material und Methoden	19
2.1	Probanden und Patienten	19
2.2	Ethik	19
2.3	Material	20
2.3.1	Labor Ausrüstung	20
2.3.2	Glas und Plastik Verbrauchsmaterialien	20
2.3.3	Chemikalien	21
2.3.4	Antikörper	21
2.4	Methoden	22
2.4.1	Färbung der Zellen	22
2.4.2	Antikörper Panels	23
2.4.3	Analyse im Durchflusszytometer	25
2.5	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	25
2.5.1	Lymphozyten	25

2.5.2	Monozyten	28
2.6	Statistische Auswertung und grafische Darstellung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Induktion von Koinhibitoren in der humanen Malaria	31
3.2	Vermehrte Koexpression von Koinhibitoren	32
3.3	Korrelationen von PD-1, CTLA-4 und LAG-3	33
3.4	Induktion von Granzym B und CD39	35
3.5	Korrelation von Koinhibitoren und Effektormolekülen	35
3.6	Zeitlicher Verlauf der Expressionen von Koinhibitoren und Effektormolekülen ...	37
3.7	Subklinischer Verlauf der Expression regulatorischer Moleküle in der Leberphase einer kontrollierten Malaria-Infektion	38
3.8	Koinhibitoren und deren Liganden	41
4	Diskussion	44
5	Zusammenfassung	50
6	Abkürzungen	52
7	Literaturverzeichnis	54
8	Danksagung	59
9	Lebenslauf	60
10	Eidesstattliche Versicherung	61

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Weltweite Verbreitung von Malaria-Infektionen	1
Abb. 2	Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> in <i>Anopheles</i> Mücke und Mensch	3
Abb. 3	Koinhibitorische Moleküle und deren Liganden	10
Abb. 4	Gating Strategie für CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten	27
Abb. 5	Gating Strategie für Monozyten	29
Abb. 6	Induktion von Koinhibitoren auf CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten bei Malaria-Patienten	31
Abb. 7.1	Expression von CTLA-4 und Koexpression mit weiteren Markern auf CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten bei Malaria-Patienten	32
Abb. 7.2	Expression von PD-1 und Koexpression mit weiteren Markern auf CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten bei Malaria-Patienten	33

Abb. 8	Korrelationen der Expressionen von Koinhibitoren auf CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten im Blut von Malaria-Patienten	34
Abb. 9	Induktion von Effektormolekülen auf CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten bei Malaria-Patienten	35
Abb. 10	Korrelationen der Expressionen von Koinhibitoren und Effektormolekülen auf CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten im Blut von Malaria-Patienten	36
Abb. 11	Expression von Koinhibitoren und Effektormolekülen auf CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten einer Malaria-Patientin im Verlauf mehrerer Tage	37
Abb. 12	Expression von Koinhibitoren und Effektormolekülen auf CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten in der Leberphase einer kontrollierten Malaria-Infektion	39
Abb. 13	Expression von Koinhibitoren und Effektormolekülen auf CD3 ⁺ CD8 ⁺ -Lymphozyten in der Leberphase einer kontrollierten Malaria-Infektion	40
Abb. 14	Erhöhte Expression von Koinhibitoren und teilweise derer Liganden auf CD3 ⁺ CD4 ⁺ -Lymphozyten bei Malaria-Patienten	41
Abb. 15	Erhöhte Expression von Koinhibitoren und teilweise derer Liganden auf CD3 ⁺ CD14 ⁺ -Monozyten bei Malaria-Patienten	43

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Laborausrüstung	20
Tab. 2	Glas und Kunststoff Verbrauchsmaterialien	20
Tab. 3	Chemikalien und Reagenzien	21
Tab. 4	Antikörper	21
Tab. 5	„Regulatorische Moleküle“-Panel	23
Tab. 6	„Liganden“-Panel	24
Tab. 7	„CD8“-Panel	24

1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Epidemiologie

Die Malaria ist eine Infektionskrankheit, die durch parasitäre Protozoen hervorgerufen wird und deren Erreger einen komplexen Lebenszyklus in ihrem Vektor, der *Anopheles*-Mücke, und ihrem Wirt, dem Menschen, durchlaufen. Nach Schätzung der WHO infizierten sich 2018 etwa 228 Millionen Menschen mit Malaria, was sie zur häufigsten Infektionskrankheit der Welt macht. Schätzungsweise 405 000 Menschen sind im Jahr 2018 an Malaria gestorben. Betroffen sind insbesondere Länder des subsaharischen Afrika, sowie Teile Süd- und Mittelamerikas und Südasiens (Abb. 1). In Nigeria und in der demokratischen Republik Kongo zusammen traten nach Schätzung der WHO 2018 35% der weltweiten Todesfälle auf.

Etwa 40% der Weltbevölkerung lebt in Malaria-Endemiegebieten. Auch im Umfeld von Flughäfen in Ländern ohne Malaria wird gelegentlich von Fällen berichtet, in denen vermutlich importierte, infizierte Mücken die Krankheit übertrugen.

Map of malaria case incidence rate (cases per 1000 population at risk) by country, 2018 Source: WHO estimates.

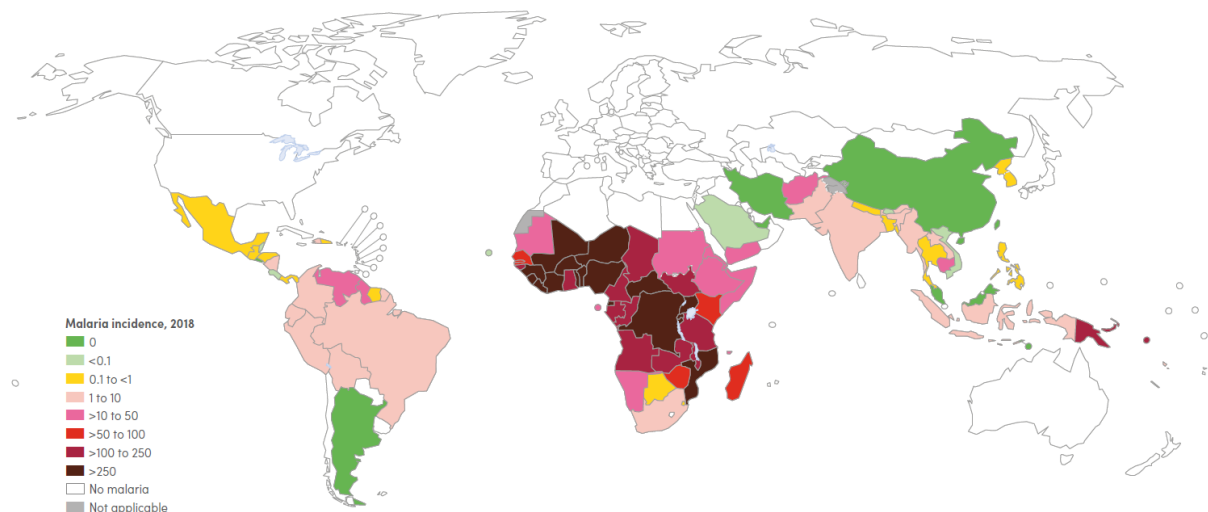


Abb. 1: Weltweite Verbreitung von Malaria-Infektionen

Die Malaria tritt in weiten Teilen der südlichen Hemisphäre auf, am schwersten betroffen sind die Menschen in Afrika, südlich der Sahara. Quelle: WHO Malaria Report 2019 S. 8

Die schwersten Symptome und die gravierendsten Krankheitsverläufe treten bei Kindern unter fünf Jahren auf. So waren 2018 weltweit 67% der Todesfälle, also 272.000 von 405.000, bei Kindern jünger als fünf Jahren zu vermelden.

1.1.2 Lebenszyklus

Es gibt fünf humanpathogene Erreger der Malaria; *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi* und *Plasmodium falciparum*. Wobei das letztgenannte die klinisch am schwersten verlaufende Malaria tropica verursacht. Es handelt sich bei den Erregern um einzellige Eukaryoten, welche den Menschen als Zwischenwirt nutzen, die Mücke hingegen als Endwirt.

Weibliche wie männliche Mücken der Gattung *Anopheles* ernähren sich von Pflanzensäften, jedoch benötigt das Weibchen nach der Befruchtung durch das Männchen mindestens eine tierische oder menschliche Blutmahlzeit, um sich mit Protein zu versorgen, damit die Entwicklung von Eiern stattfinden kann.

Sticht eine weibliche *Anopheles*-Mücke einen infizierten Menschen, in dessen Blut sich derzeit Gametozyten befinden, so nimmt sie diese in sich auf. Im Darm der Mücke verschmelzen nun männliche und weibliche Gametozyten zu einer Zygote und weiter zu einer Oozyste. Diese sexuelle Fortpflanzung definiert die Mücke als den Endwirt des Parasiten. In jeder Oozyste entstehen bis zu 1000 Sporozoiten, die erste infektiöse Form der Plasmodien. Diese Vermehrung findet nur bei Temperaturen über 15°C statt, was die geographische Verteilung der Erkrankung hinlänglich erklärt. Die Sporozoiten platzen aus der Oozyste und wandern in die Speicheldrüsen der Mücke. Nimmt die Mücke nun eine weitere Blutmahlzeit zu sich, sondert sie mit gerinnungshemmenden Stoffen und auch mit Sporozoiten versetzten Speichel ab. Die Sporozoiten gelangen mit dem Blutstrom zur Leber und dringen dort in Hepatozyten ein. Nach Durchwanderung mehrerer Hepatozyten beginnt innerhalb dieses Leberschizonten die asexuelle Replikation, welche in diesem Fall als exoerythrozytäre Schizogonie bezeichnet wird. Es entstehen im Falle von *P. falciparum* innerhalb von 8-16 Tagen viele tausend Merozoiten. Diese können bei Infektionen mit *P. ovale* oder *P. vivax* in ein Hypnozoiten-Stadium übergehen und Monate bis Jahre in der Leber inaktiv überdauern oder aber aus den Hepatozyten ausbrechen und in die Blutbahn gelangen. In der Blutbahn kann sich jeder einzelne Merozoit einem Erythrozyten anhaften und in einem komplexen Prozess in ihn eindringen. Im Erythrozyten reift der Merozoit zum Trophozoiten heran und erscheint in Siegelringform. Der Trophozoit reift weiter zum Schizonten und unterläuft dabei eine Reihe von asexuellen Zellteilungen. Diese reifen Schizonten enthalten um die 20 neue Merozoiten, welche nach Lyse des Erythrozyten in die Blutbahn gelangen. Diese zweite Freisetzung von Erregern korreliert mit den für die Erkrankung typischen Fieberschüben und hat eine je nach Spezies unterschiedliche Dauer. Im Falle von *P. falciparum*, *P. ovale* und *P. vivax* dauert ein Zyklus etwa 48 Stunden, im Falle von *P. malariae* etwa 72 Stunden. Dieser Zyklus der Replikation und Multiplikation läuft üblicherweise einige Male ab, bevor einzelne der Merozoiten in den roten Blutkörperchen beginnen, sich zu ihren geschlechtlichen Formen, den Gametozyten, weiterzuentwickeln. Die weiblichen Gametozyten bezeichnet man hierbei als Makrogametozyten, die männlichen als Mikrogametozyten. Werden die

Gametozyten nicht von einer Mücke aufgenommen, sterben sie nach einigen Tagen wieder ab, nimmt eine weitere Mücke ein Blutmahlzeit an dieser infizierten Person, beginnt der Zyklus von vorn (rezensiert in TUTEJA 2007).

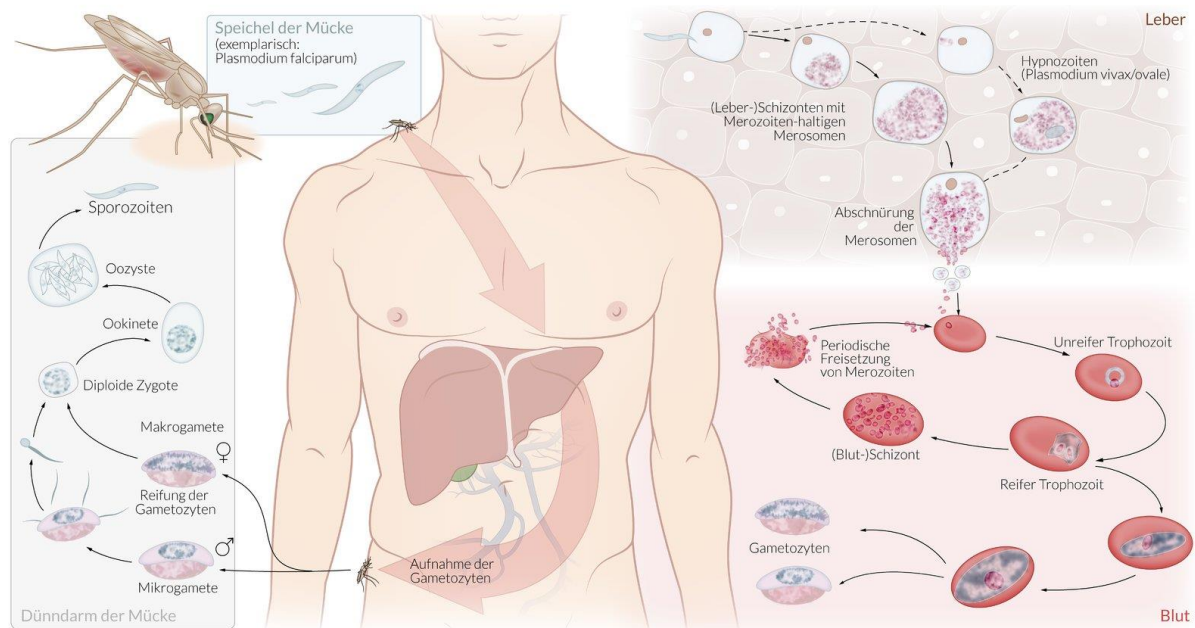


Abb. 2: Lebenszyklus von *P. falciparum* in *Anopheles* Mücke und Mensch

P. falciparum durchläuft einen komplexen Zyklus von geschlechtlicher Reproduktion in der Mücke und asexueller Reproduktion im Menschen. Die Reproduktion im Menschen findet initial im Gewebe der Leber und anschließend in der Blutbahn statt. Erst nach mehreren Zyklen beginnt die Reifung von geschlechtlichen Gametozyten. Quelle: MIAMED AMBOSS 2020 Stand: 28.04.2020

1.1.3 Klinik

Zu Beginn einer Malaria-Infektion steht die klinisch inapparente Inkubationszeit. Die Sporozoiten verbringen nur kurze Zeit in der Blutbahn, bevor sie sich in den Hepatozyten vor dem Immunsystem verbergen. Dies kann je nach Erreger 7-42 Tage dauern, somit ist ein vor Ablauf von sieben Tagen neu aufgetretenes Fieber in einem Malaria-Endemiegebiet mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf Malaria zurück zu führen. Tritt nach diesen sieben Tagen jedoch Fieber in Zusammenhang mit einer Reiseanamnese auf, sollte man in jedem Fall eine Malaria ausschließen, da die weiteren Symptome überaus vielfältig sein können.

Es gibt Allgemeinsymptome und organspezifische Symptome, die bei entsprechender Ausprägung eine Malaria zu einer schweren oder komplizierten Malaria machen können.

Das typischste Allgemeinsymptom ist wohl das Fieber, welches periodisch zu und abnehmen, jedoch auch kontinuierlich bestehen kann. Die Temperatur kann stark oder auch nur geringfügig erhöht sein. Die Patienten haben ein ausgeprägtes Krankheitsgefühl mit grippeähnlichen Symptomen, wie Kopf-

und Gliederschmerzen sowie Abgeschlagenheit. Es können Bauchschmerzen, Diarrhoen, Übelkeit und Erbrechen auftreten.

Da jeder Erythrozyt, der einmal infiziert wurde, im Verlauf platzt, ergibt sich außerdem eine hämolytische Anämie. Eine Thrombozytopenie mit Blutungsneigung, bis hin zur disseminierten intravasalen Koagulation (DIC) kann auftreten. Die Überreste der zahlreichen zerstörten Erythrozyten müssen in der Milz abgebaut werden, was zu einer Splenomegalie führt.

Die infizierten roten Blutkörperchen haften an verschiedenen Stellen des Körpers postkapillär dem Gefäßendothel an. Dies ist gut für die Parasiten, da sie so dem Abbau in der Milz entgehen, aber schlecht für die Patienten, da in den betroffenen Stromgebieten Gefäßverschlüsse und Hypoxie auftreten können. Besonders gefährdet sind hierdurch empfindliche Organsysteme mit feinen Gefäßen und hohem Sauerstoffbedarf. Bei zerebralem Befall können Verwirrtheit, Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma, Halluzinationen sowie Krampfanfälle auftreten. Ein Befall von Herz oder Lunge kann zu Herzinsuffizienz, Lungenödem oder Schock führen. Die Nieren werden durch Mikroinfarkte geschädigt und müssen zudem große Mengen Hämoglobin ausscheiden, sodass ein Nierenversagen mit Ödemen auftreten kann.

Unter adäquater Therapie ist die Malaria gut zu beherrschen, ist diese jedoch nicht verfügbar, erliegen gerade kleine Kinder bei Erstinfektion oft der Summe der Komplikationen.

Hat ein Patient eine Malaria-Infektion überstanden, besteht für eine gewisse Zeit eine Form der „Teil-Immunität“. Schwere Verläufe der Erkrankung kommen bei „Teil-Immunen“ deutlich seltener vor (rezensiert in TUTEJA 2007).

Das adaptive Immunsystem spielt eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung der Parasiten aber auch in der Entwicklung von Pathologie in der Malaria. Es folgt ein kurzer Teil zum adaptiven Immunsystem und den T-Lymphozyten. Anschließend wird noch einmal auf die immunologischen Besonderheiten in der Malaria eingegangen.

1.2 Immunologie

1.2.1 Das adaptive Immunsystem

Das Immunsystem wird üblicherweise in das angeborene oder unspezifische und das adaptive oder spezifische Immunsystem eingeteilt. Zum angeborenen Immunsystem zählen physikalische oder chemische Barrieren, wie verhorntes Epithel oder auch die Magensäure sowie biologische bzw. physiologische Mechanismen, wie die Ciliarfunktion der Atemwege oder der Hustenreiz. Auch viele verschiedene Zellen beteiligen sich an der ersten Abwehr von Pathogenen, die sie mit Hilfe bestimmter Mustererkennungsrezeptoren identifizieren und bekämpfen können. Diese erste Abwehr

ist schon von Geburt an verfügbar und entfaltet bei Pathogenkontakt sehr schnell ihre volle Wirkung. Für einige Pathogene reichen diese Mechanismen allerdings nicht aus und man benötigt eine spezifischere Immunantwort.

Im Zentrum dieser spezifischeren Immunantwort stehen die Lymphozyten. Die Lymphozyten werden nach dem Ort ihrer Reifung in T- und B-Lymphozyten eingeteilt, wobei T für den Thymus und B für das Knochenmark (=bone marrow) oder ursprünglich für die bei Vögeln vorhandene Bursa fabricius steht. Nach einem Zufallsprinzip am Anfang der Entwicklung der Lymphozyten, bildet jeder Lymphozyt einen Rezeptor aus, der nur ein spezifisches Antigen bindet.

Die B-Lymphozyten bilden in ihrer Entwicklung im Knochenmark den B-Zell-Rezeptor (BCR) aus, der strukturell einem in der Membran verankerten Immunglobulin entspricht. Rein rechnerisch wäre es der B-Zelle möglich, einen von 10^{13} denkbaren, antigenspezifischen Rezeptoren auszubilden. In der Natur treten nach Schätzungen wohl pro Individuum um die 10^7 unterschiedliche Spezifitäten auf, was aber auch schon eine enorme Vielfalt an Antikörpern bzw. BCR abbildet. Erkennt eine solche B-Zelle nun auf ihrem Weg durch den Körper – üblicherweise im Keimzentrum eines peripheren lymphatischen Organs – ihr spezifisches Antigen, so differenziert sie sich mit Hilfe einer T-Zelle, die auf dasselbe Antigen reagiert, zu einer Plasmazelle aus. Plasmazellen sind darauf spezialisiert große Mengen lösliche Antikörper zu sezernieren. Diese haben die gleiche Klasse und die gleiche Spezifität wie zuvor der BCR, nämlich initial IgM. Mit Unterstützung durch T-Zellen kann ein Antikörperklassenwechsel zu beispielsweise IgG oder IgE erfolgen.

Die Antikörper, die die Plasmazelle ausschüttet, erfüllen verschiedene Zwecke. Sie ermöglichen das Zusammenspiel von angeborenem und adaptivem Immunsystem, indem sie Pathogene für den Zugriff des Komplementsystems empfindlich machen. Sie binden beispielsweise an Viren und behindern allein durch ihre physische Anwesenheit ein Eindringen in Zellen oder andere Funktionen. Sie können es NK-Zellen oder anderen zytotoxischen Zellen ermöglichen, eine markierte Zelle mit ihren Effektorfunktionen zu töten und Makrophagen können opsonierte Zellen besser und schneller auffressen.

Nach abgelaufener Immunreaktion können langlebige Plasmazellen weiter im Blut persistieren und IgG-Antikörper produzieren, während manche B-Zellen auch ins Knochenmark wandern, um dort als Memory-B-Zellen Teil des immunologischen Gedächtnisses zu werden.

1.2.2 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten entstehen, wie die B-Lymphozyten, im Knochenmark aus lymphatischen Stammzellen. Diese Pro-T-Lymphozyten wandern durch die Blutbahn in den Thymus ein, wo sie in mehreren Schritten zu selbsttoleranten, immunkompetenten T-Lymphozyten ausdifferenzieren. Der

Prä-T-Lymphozyt in der Rinde des Thymus trägt zunächst weder CD4 noch CD8, dafür aber einen unreifen Prä-T-Zell-Rezeptor. Er befindet sich im Stadium der doppelten Negativität ($CD4^-/CD8^-$). Immer noch in der Rinde bilden sich nun durch somatische Rekombination ein funktionsfähiger T-Zell-Rezeptor (TCR), sowie CD3, CD4 und CD8 Oberflächenproteine. Dieser doppelt positive ($CD4^+/CD8^+$) T-Zell-Vorläufer begibt sich in die corticomedulläre Übergangszone, wo eine positive Selektion stattfindet. Es werden durch Thymusepithelzellen MHC-I und MHC-II Rezeptoren präsentiert. Interagiert der TCR mit diesen, überlebt die Zelle, andernfalls geht sie den Weg der Apoptose. In der corticomedullären Übergangszone und dem Mark wird anschließend, im Sinne einer negativen Selektion, die Selbsttoleranz der Zelle überprüft. Hier entsteht die zentrale Toleranz. Antigenpräsentierende Zellen präsentieren auf MHC-Rezeptoren beider Klassen körpereigene Antigene. Reagiert der TCR zu stark auf diese Auto-Antigene wird ebenfalls die Apoptose eingeleitet. Hat der TCR im Laufe dieser Entwicklung besser mit MHC-I-Rezeptoren interagiert, wird die CD4 Expression unterdrückt und es entsteht ein naiver $CD8^+$ -T-Lymphozyt. Erkennt der TCR MHC-II-Rezeptoren besser, wird CD8 herabreguliert und eine naive $CD4^+$ T-Helferzelle entsteht. In diesem Stadium der einfachen Positivität werden beide Klassen in die Blutbahn ausgeschwemmt und „patrouillieren“ durch den Körper auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen.

In den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz und Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT)) präsentieren dendritische Zellen (DC) Antigene aus der Körperperipherie auf MHC-Rezeptoren. Eine naive T-Zelle kommt täglich mit tausenden DC in Kontakt. Bindet nun der TCR den Komplex aus MHC-Rezeptor und dem spezifischen Antigen, wird die T-Zelle aktiviert. Ein zweites Signal, die Interaktion von CD28 auf der T-Zelle und einem Molekül der B7-Familie wie CD80 oder CD86 auf der DC, wird zusätzlich benötigt. Die nun nicht mehr naive T-Zelle kann dann, um eine effektive Immunantwort zu bewirken, proliferieren und sich differenzieren.

Dadurch, dass die TCR im Körper so vielseitig und unterschiedlich sind, gibt es für mögliche Pathogene jeweils nur eine überschaubare Anzahl an T-Zellen, die auf diese reagieren könnten. Damit trotzdem eine ausreichend potente Immunantwort erfolgen kann, müssen die wenigen aktivierten T-Zellen massiv proliferieren. Verschiedene chemische Signale, wie z.B. eine autokrine Stimulation mit Interleukin-2 (IL-2), befeuern diesen Vorgang.

Unter Stimulation durch verschiedene Zytokine differenzieren die T-Zellen zu $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -T-Effektorzellen oder T-Gedächtniszellen aus.

$CD4^+$ -T-Effektorzellen oder auch T-Helferzellen reifen in Abhängigkeit vom Zytokin-Milieu, das auf sie einwirkt, zu verschiedenen Subtypen heran, die auch unterschiedliche Funktionen erfüllen. Handelt es sich bei den dominanten Einflüssen um Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- γ (IFN- γ),

so entsteht eine T_H1 -Zelle. Diese unterstützt das Immunsystem bei der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, die z.B. Makrophagen befallen haben. Sie produziert IL-2, welches eine weitere Autostimulation bewirkt, sowie IFN- γ , welches die Ausreifung von weiteren T_H1 -Zellen unterstützt, überaus potent Makrophagen aktiviert und zudem die Reifung von T_H2 -Zellen hemmt. Sie fördert den Antikörperklassenwechsel der B-Zellen von IgM zu IgG und die Ausbildung von $CD8^+$ -T-Zellen und $CD8^+$ -T-Gedächtniszellen.

Überwiegt der Einfluss von Interleukin-4 (IL-4), so entstehen T_H2 -Zellen, die besonders in der Abwehr von extrazellulären Pathogenen, wie z.B. Würmern, aktiv werden. Die Zelle produziert noch mehr IL-4, welches verschiedene Effekte hat. Es stimuliert die T_H2 -Zelle selbst, es hemmt, zusammen mit IL-10, die Aktivität von T_H1 -Zellen, es stimuliert B-Zellen zur Proliferation und zur Differenzierung zu Plasmazellen und es befördert den Antikörperklassenwechsel von IgM zu IgE. Die T_H2 -Zelle produziert IL-5, welches eosinophile Granulozyten stimuliert und die Freisetzung von IgA-Antikörpern aus Plasmazellen steigert. Zudem wird IL-13 sezerniert, welches wichtige Funktionen in der Wundheilung unterstützt und die Darmmotilität steigert, um Parasiten besser und schneller auszuscheiden.

Unter Einfluss von TGF- β 1, IL-6 und IL-23 entstehen T_H17 -Zellen. Diese sind auf die Bekämpfung extrazellulärer Erreger spezialisiert. Sie sind nach ihrem Leit-Zytokin IL-17 benannt, welches Stromazellen stimuliert, die daraufhin G-CSF ausschütten, welches neutrophile Granulozyten rekrutiert und deren Ausreifung befördert. Zusätzlich können sie IL-22 sezernieren, welche Epithelzellen dazu bringt antimikrobielle Peptide auszuschütten.

Follikuläre T-Helfer-Zellen (T_{FH} -Zellen) interagieren in den Keimzentren sekundärer lymphatischer Organe mit B-Zellen. Sie können mit Hilfe ihres CXCR5-Rezeptors in die Keimzentren einwandern und dort, wenn sie denn das gleiche Antigen erkennen, unter anderem durch IL-21-Sekretion den B-Zellen helfen ihren Klassenwechsel durchzuführen und zu Plasmazellen auszudifferenzieren. Auch können sie Zytokine sezernieren, die ähnlich wie T_H1 -, T_H2 - oder T_H17 -Zellen Immunreaktionen in eine bestimmte Richtung lenken.

Neben den genannten können noch, unter Einfluss von IL-2 und TGF- β 1 regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen) entstehen. Ihre Funktion besteht darin, durch Regulation der $CD4^+$ -T-Zellen, das Ausmaß der Immunantwort zu beschränken, um überschießende Reaktionen und autoimmune Pathologien zu verhindern. Es gibt direkt aus dem Thymus stammende „natürliche“ tTregs oder nTregs und in der Peripherie, in einem tolerogenen Milieu entstandene, induzierte iTregs oder pTregs. Sie schütten beide vor allem die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β aus. Man kann sie meist an ihrem Transkriptionsfaktor FoxP3 identifizieren oder versuchen sie durch charakteristische Oberflächenmarker zu definieren. Die $CD4^+$ Typ 1 regulatorischen T-Zellen ($Tr1$ -

Zellen) entstehen in der Peripherie und können anhand der Koexpression von CD49b und LAG-3 erkannt werden (GAGLIANI et al. 2013). Tr1-Zellen tragen FoxP3 nur vorübergehend.

CD8⁺-T-Effektorzellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie tragen einen TCR und das Oberflächenmolekül CD8. CD8 interagiert mit MHC-I-Rezeptoren, welche auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers und Thrombozyten vorkommen. Präsentiert ein MHC-I-Rezeptor z.B. Partikel eines intrazellulären Pathogens oder abnorme Proteine einer entarteten Zelle und erkennt die CD8⁺-T-Zelle mit ihrem TCR dies als ihr spezifisches Antigen, wird die Zelle getötet. Dies kann durch die Ausschüttung von Effektormolekülen wie Granzym B oder Perforin geschehen, welche die Zellwand der Zielzelle öffnen, oder durch eine Interaktion des auf der zytotoxischen T-Zelle befindlichen FAS-Ligand mit dem auf der Zielzelle vorhandenen FAS-Rezeptor. Dieser „Todesrezeptor“ initiiert bei Aktivierung eine intrazelluläre Signalkaskade, welche zur kontrollierten Apoptose führt.

T-Zellen können nach erstem Antigenkontakt auch zu T-Gedächtniszellen werden. Diese können sich in den sekundären lymphatischen Organen, dem Blut oder peripheren Geweben aufhalten und im Falle einer erneuten Infektion mit einem schon bekannten Pathogen schneller und effektiver proliferieren und zu T-Effektorzellen ausdifferenzieren.

1.2.3 Periphere Toleranz

Im Thymus werden im Rahmen der negativen Selektion viele aber längst nicht alle möglichen Autoantigene präsentiert, weshalb in unseren Organismen zahlreiche potenziell autoreaktive T-Zellen vorhanden sind. Und auch wenn das Immunsystem tatsächlich körperfremde Stoffe erkannt hat, gibt es Fälle, in denen es wichtig ist, nicht zu stark zu reagieren oder eine einmal angelaufene Immunreaktion wieder herunter zu fahren. Den oben beschriebenen Mechanismen der zentralen Toleranz steht die periphere Toleranz zur Seite, die auf verschiedenen Wegen vermittelt werden kann. Erläutert werden die Ignoranz, die Deletion, die Anergie und die Suppression.

Einen Umstand, unter dem die periphere Toleranz gewahrt wird, stellt die Ignoranz dar. Viele der autoreaktiven T-Zellen treffen in ihrem Leben nie auf ihr Antigen, da es nur in immunprivilegierten Organen exprimiert wird oder zwar vorhanden ist aber von APC nur in sehr geringem Ausmaß präsentiert wird. Die T-Zelle, die nie ihr Antigen erkennt, bleibt naiv und nimmt keine Effektorfunktionen auf.

Ein anderer Mechanismus ist die Deletion. Ganz ähnlich wie in der negativen Selektion im Rahmen der T-Zell-Reifung im Thymus gehen T-Zellen, die einem sehr starken antigenen Reiz ausgesetzt sind, zu Grunde. Einen solchen starken Reiz könnte die wiederholte Präsentation des Antigens oft hintereinander oder die zeitgleiche Präsentation desselben in hoher Konzentration darstellen.

Weiter oben wurde beschrieben, wie T-Zellen durch TCR-Signal, kostimulatorisches Signal und umgebendes Zytokin-Milieu aktiviert werden. Erkennt eine T-Zelle ihr Antigen ohne, dass ein kostimulatorisches Signal auf sie einwirkt, wird die Zelle anerg. Anergie ist ein Zustand, in dem die Zelle zwar nicht stirbt, jedoch nicht mehr in der Lage ist auf folgende Signale, auch mit passendem kostimulatorischen Input, zu reagieren. Die Anergie kann für den Rest des Zelllebens anhalten oder unter bestimmten Einflüssen wieder aufgehoben werden. Beispiele hierfür wären eine ausgeprägte Lymphopenie oder eine starke Stimulation durch IL-2 (rezensiert in KALEKAR und MUELLER 2017).

Wo die Anergie sich nur in der Zelle selbst abspielt, ist die Suppression eine Funktion, die von der toleranten Zelle aus ins Mikromilieu oder auf andere Zellen einwirkt. Erhält eine T-Zelle ein passendes TCR-Signal, empfängt sie ein stimulatorisches zweites Signal und ist sie einem entsprechenden Zytokin-Milieu ausgesetzt, würde sie normalerweise proliferieren und ihre Effektorfunktionen aufnehmen. Unterliegt die Zelle währenddessen allerdings einer Suppression, so bleibt die Aktivierung aus und die T-Zelle zieht weiter. Sie wird nicht anerg und auch nicht aktiviert. Als Hauptakteure der Suppression sind die regulatorischen T-Zellen zu nennen. Sie sind CD4-positiv, zählen somit zu den T-Helferzellen und unterdrücken mit Hilfe von Zytokinen wie IL-10 und TGF- β oder Koinhibitoren die Immunantwort und Proliferation von Effektorzellen. T-Zellen, die im Rahmen ihrer Reifung im Thymus eine grenzwertig starke Reaktion auf MHC-Rezeptoren mit Autoantigen gezeigt haben, werden als tT_{reg} s in die Peripherie ausgeschwemmt und vermitteln periphere Toleranz. Erkennt eine naive $CD4^+$ -Zelle in der Peripherie, in einem tolerogenen Milieu ihr Antigen, so differenziert auch sie sich zu einer pT_{reg} aus und dämpft Entzündungen ab. Naiv gebliebene DC induzieren diese Art von T_{reg} s. Als Mittel der Kommunikation zwischen supprimierenden und supprimierten Zellen werden im Folgenden einige Koinhibitoren erläutert.

1.3 Koinhibitorische Moleküle

T-Zellen brauchen, um vollständig aktiviert zu werden, drei Signale. Das TCR-Signal, den stimulatorischen Einfluss von CD28 in Kontakt mit CD80/CD86 und Zytokine. Es gibt allerdings an der Stelle des zweiten Signals nicht nur stimulierende Einflüsse auf die Zellen, sondern auch eine Reihe von inhibitorischen Einflüssen, die für die immunologische Balance im Körper von großer Relevanz sind.

Es ist wichtig für den Organismus, dass die Bekämpfung von Pathogenen schnell und effizient stattfindet, jedoch ist eine solche Immunreaktion für den Körper mit hohem Energieaufwand und nicht zu unterschätzenden Kollateralschäden verbunden. Immunologische Effektorzellen haben häufig eine begrenzte Lebensdauer einprogrammiert und gehen, vor allem bei Abwesenheit des bekämpften Antigens, in die Apoptose. Die im Rahmen der Aktivierung massiv proliferierten, monoklonalen Effektorzellen sind in der Lage sich gegenseitig nach einer Weile über ihre FAS/FAS-L „Todesrezeptor“-Signalwege abzuschalten. Regulatorische T-Zellen, die während der Inflammation vermindert aktiv waren, nehmen ihre Arbeit wieder auf und dämpfen die Immunantwort ein. Einige dieser Effekte werden über koinhibitorische Moleküle wie CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIGIT und Tim-3 vermittelt, die hier im Folgenden vorgestellt werden.

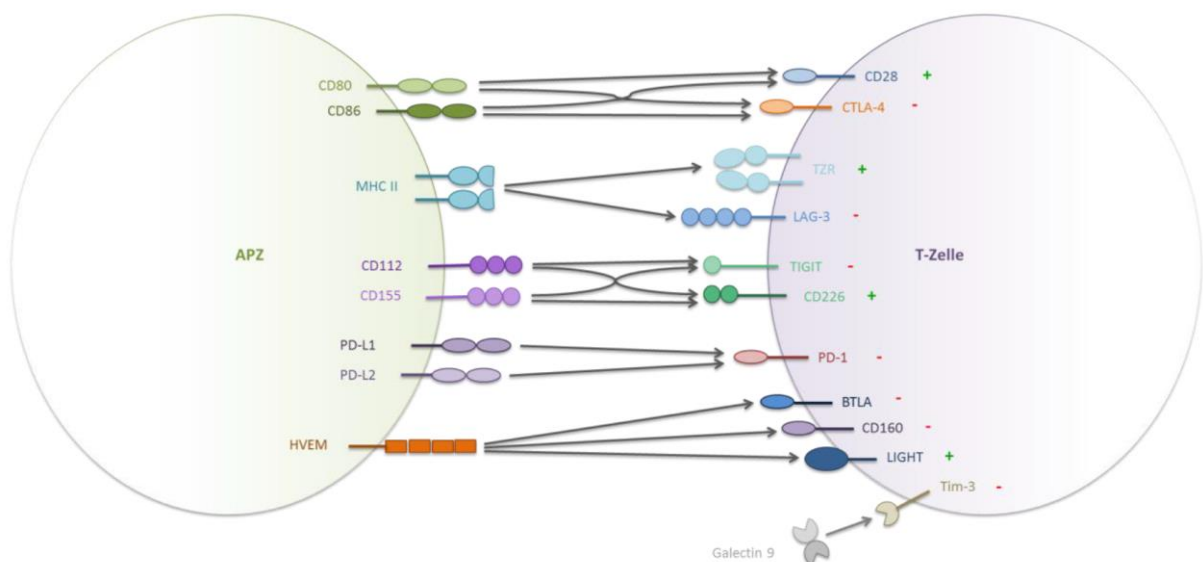


Abb. 3: Koinhibitorische Moleküle und deren Liganden

T-Lymphozyten exprimieren verschiedene stimulatorische und inhibitorische Moleküle. CTLA-4, LAG-3, TIGIT, PD-1 und Tim-3 werden in dieser Arbeit thematisiert. *Quelle: ABEL A, Untersuchung koinhibitorischer Moleküle in der humanen Malaria 2016 S. 6*

1.3.1 CTLA-4

Das „cytotoxic T-lymphocyte activation associated protein 4“ ist ein inhibitorischer Oberflächenrezeptor, der sich konstitutiv auf T_{reg}s findet, sowie von CD4⁺-T-Lymphozyten bei Aktivierung hochreguliert wird. CTLA-4 ist homolog zu CD28 und kompetitiert mit diesem um ihre gemeinsamen Liganden CD80 und CD86. CTLA-4 ist hierbei etwa um den Faktor 100 affiner als sein Konkurrent und somit in der Lage diesen wirksam an einer Bindung zu hindern. Das für eine Aktivierung notwendige zweite Signal bleibt somit der T-Zelle verwehrt und eine Immunsuppression ist die Folge. CTLA-4 ist wohl sogar in der Lage nach Bindung den Liganden CD80/CD86 aus der Antigen-präsentierenden Zelle herauszureißen, zu internalisieren und aufzulösen.

CTLA-4 wird durch Mutationen von einigen Krebszellpopulationen exprimiert, was ein lokal immuntolerantes Milieu erschafft und den Tumor vor effizientem Zugriff des Immunsystems schützt. Mit einer sogenannten *Checkpoint-Inhibition* mit monoklonalen Antikörpern gegen CTLA-4 ist es möglich, diesen *Escape*-Mechanismus der entarteten Zellen auszuhebeln und den Weg für eine effiziente Immunantwort frei zu machen. Diese neuen Therapieansätze haben die Prognosen vieler maligner Erkrankungen dramatisch verbessert (SHARMA und ALLISON 2015).

1.3.2 PD-1

Das „programmed cell death protein 1“ ist wie CTLA-4 strukturverwandt mit dem stimulatorischen Molekül CD28 und findet sich auf aktivierten T-Zellen. PD-1 bindet PD-L1 und PD-L2, welche auf verschiedensten Leukozyten, epithelialen und endothelialen Zellen sowie auf manchen Tumorzellen ähnlicher Herkunft zu finden sind. PD-1 wirkt nach Aktivierung zellintrinsisch hemmend, indem es die eventuell folgenden CD28 Signale innerhalb der Zelle abschwächt. PD-1 wird auch mit Zellerschöpfung bzw. *Exhaustion* assoziiert. Beispielsweise bei chronischen Infektionen treten PD-1⁺-T-Zellen auf, welche vermindert auf passende TCR-Signale reagieren. Dies kann einerseits ein Mechanismus des Körpers sein, um Homöostase zu erreichen und das Immunsystem zu supprimieren oder aber auch ein *Escape*-Mechanismus von Erregern oder Tumorzellen, die PD-1 induzieren oder PD-L1/PD-L2 exprimieren. Binden PD-L1 oder PD-L2 an PD-1 reduziert die Zelle ihre Zytokin-Produktion und ihre Proliferation wird gebremst. Die T-Zelle kann anerg werden oder die Apoptose einleiten (rezensiert in GIBBONS JOHNSON & DONG 2017).

Auch der Komplex aus PD-1 und PD-L1/PD-L2, als immunologischer *checkpoint*, konnte in neuen Therapien mit monoklonalen Antikörpern als *target* ausgemacht werden. Antikörper gegen PD-1, gerade in Kombination mit Antikörpern gegen CTLA-4, können *Escape*-Mechanismen von Tumoren umgehen und es dem Immunsystem wieder ermöglichen, den Krebs wirksam zu bekämpfen.

1.3.3 Tim-3

Ein weiteres koinhibitorisches Transmembranprotein ist Tim-3. Es lässt sich auf T_H1-, T_{reg}- und NK-Zellen, IFN- γ produzierenden CD8⁺-T-Zellen (T_C1-Zellen) sowie dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten nachweisen. Für Tim-3 wurden als Liganden Galectin-9 und Ceacam-1, sowie Phosphatidyl-Serin (PtdSer) und das High mobility group protein B1 (HMGB1) beschrieben. Es besitzt keine klassischen intrazellulären inhibitorischen Signal-Motive, jedoch fünf konservierte Tyrosin Reste.

Bindet Galectin-9 an Tim-3 auf T_H1 oder T_C1 Zellen, folgt der Zelltod (KANG et al. 2015). Ceacam-1 kann mit Tim-3 *cis*- und *trans*-Interaktionen eingehen und ist für die inhibitorischen Funktion vonnöten (HUANG 2015). Galectin-9 und Ceacam-1 binden an unterschiedlichen Stellen an Tim-3, bewirken intrazellulär aber die Phosphorylierung der zwei gleichen Tyrosin Reste. In Folge der Phosphorylierung wird das Bat3-Protein (HLA-B associated transcript 3) von Tim-3 gelöst und kann Src-Kinasen binden, welche das TCR-Signal inhibierend regulieren (rezensiert in JOLLER & KUCHAROO 2017).

Tim-3 scheint auf Zellen des angeborenen Immunsystems unterschiedliche Funktionen zu haben. Einerseits wurden hoch zytotoxische Tim-3⁺-NK-Zellen gefunden, welche IFN- γ ausschütten, andererseits scheinen hohe Expressionsniveaus bei Melanom Patienten charakteristisch für einen erschöpften Phänotyp der NK-Zellen und eine schlechte Prognose der Patienten zu sein (GLEASON et al. 2012; DA SILVA et al. 2014). Dendritische Zellen und Makrophagen werden durch Tim-3-Bindung gehemmt (CHIBA 2012; YANG 2013).

Eine Tim-3 Blockade exazerbiert im Mausmodell die experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE) und beschleunigte den Progress von Typ-1-Diabetes (MONNEY 2002; SANCHEZ-FUEYO 2003). Eine Zufuhr des Liganden Galectin-9 milderte die EAE ab (ZHU 2005).

Tim-3⁺-T_{reg}-Zellen zeigen in *in vitro suppression essays* eine stärkere inhibitorische Wirkung, exprimieren mehr koinhibitorische Moleküle und schütten mehr inhibierende Zytokine als ihre Tim-3- Gegenstücke aus (GUPTA 2012; GAUTRON 2014).

1.3.4 LAG-3

LAG-3 wird von verschiedenen T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und einigen NK-Zellen exprimiert. Es ähnelt strukturell dem CD4-Rezeptor und bindet ebenfalls, allerdings mit höherer Affinität, an MHC-II-Moleküle. Zusätzlich wurden LSECtin und Galectin-3 als Liganden beschrieben (rezensiert in GIBBONS JOHNSON & DONG 2017). In Interaktion mit CD3 und dem

TCR reguliert LAG-3, auf bisher nicht komplett verstandenem Wege, die Proliferation und Zytokin-Produktion herab (HANNIER 1998).

LAG-3-Blockade steigert die Zell-Proliferation und die Zytokin Ausschüttung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen (WORKMAN 2003; GROSSO 2007). Auch wird LAG-3 stark vermehrt auf CD8⁺-T-Zellen mit erschöpftem Phänotyp nachgewiesen (BLACKBURN 2009).

Auf FOXP3⁺-T_{reg}s und Tr1-Zellen konnte LAG-3 nachgewiesen werden. In Kombination mit CD49b konnte es sogar als definierender Marker für Tr1-Zellen etabliert werden (GAGLIANI 2013). LAG-3⁺-T_{reg}s aus Tumorgewebe produzierten große Mengen IL-10 und TGF-β (CAMISASCHI 2010). Zusätzlich hemmen LAG-3⁺-T_{reg}s bei Kontakt dendritische Zellen und wirken somit insgesamt immunsuppressiv (LIANG 2008).

Gerade in Kombination mit einer PD-1-Blockade, könnte die LAG-3-Blockade einen vielversprechenden Ansatz für zielgerichtete Krebstherapien bieten (WOO 2012).

1.3.5 TIGIT

Ein weiteres CD28 nicht unähnliches inhibitorisches Molekül ist TIGIT (T-Zell Immunglobulin mit ITIM), welches sich auf verschiedenen T-Zellen und NK-Zellen finden lässt. TIGIT konkurriert mit CD226, einem kostimulatorischen Rezeptor, um die Liganden CD155 und CD112, welche auf APC, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen zu finden sind. CD155 bindet dabei stärker an TIGIT als CD112 und TIGIT bindet stärker an beide Liganden als CD226 (rezensiert in JOLLER und KUCHROO 2017). TIGIT kann CD226 auch direkt in einer *cis*-Interaktion hemmen (JOHNSTON et al. 2014).

Bindet auf einer T-Effektor-Zelle lokalisiertes TIGIT seinen Liganden, hemmt es die Proliferation derselben, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und das TCR-Signal, zusätzlich fördert es die Ausschüttung von anti-apoptotischen Zytokinen und die Expression von Bcl-XL, was in einer verminderten Aktivität und einem längeren Überleben der Zelle resultiert (rezensiert in JOLLER und KUCHROO 2017).

TIGIT-Aktivierung auf T_{reg}s unterstützt deren suppressive Wirkung auf T_H1- und T_H17-Zellen (JOLLER et al. 2014). Auch die IL-10 Produktion korreliert mit der TIGIT Expression (BURTON et al. 2014). TIGIT kann, durch Interaktion mit CD155, dendritische Zellen beeinflussen, die daraufhin mehr IL-10 und weniger IL-12p40 produzieren (rezensiert in JOLLER und KUCHROO 2017).

Es konnte gezeigt werden, dass agonistische TIGIT-Antikörper im Mausmodell den Verlauf einer EAE abmildern konnten, während TIGIT Blockade, in Kombination mit PD-1 Blockade, ein längeres Überleben bei Mäusen mit Colon-Karzinomen bewirkte (DIXON 2018).

1.4 Malariaspezifische Immunologie

1.4.1 T-Zellen in der akuten humanen Malaria

Die T-Lymphozyten spielen in der humanen Malaria, sowohl was die Bekämpfung und Kontrolle der Infektion als auch was die Entstehung im Rahmen der Entzündung auftretender Kollateralschäden angeht, eine zentrale Rolle. Man kann die Infektion in die prä-erythrozytäre Phase und die erythrozytäre Phase einteilen. Zusätzlich kann man noch betrachten, was nach einer Infektion in einem Wirt verbleibt und eine vorübergehende „Teil-Immunität“ vermitteln kann.

Die Bekämpfung der Plasmodien während der Leberphase der Infektion ist unter anderem Aufgabe CD8⁺-T-Zellen. Diese sind in der Lage mit ihrem CD8- und T-Zell-Rezeptor auf MHC-I präsentierte Fragmente der Erreger zu erkennen und anschließend die befallene Zelle abzutöten. Es gelang sogar 2013 *in vivo* Aufnahmen dieses Vorgangs zu machen (COCKBURN et al. 2013). Die Möglichkeiten der Plasmodien, sich innerhalb der Leber zu replizieren, werden eingeschränkt und es können nur wenige in die Blutbahn ausschwemmen, um die Blut-Phase der Infektion einzuleiten (HOFFMAN & DOOLAN 2000; REYES-SANDOVAL et al. 2011). Unterdrückt man die CD8⁺-T-Zellen vormals immuner Primaten, so geht die Immunität verloren, kehrt aber mit Rückkehr der CD8⁺-T-Zellen wieder zurück (WEISS & JIANG 2012). Als Antigen der Schutz vermittelnden CD8⁺-T-Zellen konnten unter anderem das thrombospondin-related adhesion Protein (TRAP) und das circumsporozoite Protein (CS) identifiziert werden (rezensiert in SPENCE und LANGHORN 2012). Auch wenn die CD8⁺-T-Zellen den Schutz während der Leberphase vermitteln, benötigen sie Hilfe von CD4⁺-T-Zellen um ausreichend zu proliferieren (OVERSTREET et al. 2011).

Auch die Zytokine IFN- γ und TNF, die eine Inflammation vom Typ 1 steuern, spielen in der Leberphase eine Rolle, diese werden auch von T_H1-Zellen beigesteuert. Es wurden zytotoxische, für Malaria-Antigen spezifische CD4⁺-T-Zellen beschrieben, die auch infizierte Hepatozyten töten könnten (rezensiert in KURUP, BUTLER und HARTY 2019).

In der erythrozytären Phase der Malaria wird das Wachstum der Parasiten durch die Aktivität verschiedener Leukozyten begrenzt. In Milz oder Lymphknoten kommen naive T-Zellen mit ihrem Antigen in Kontakt und beginnen zu proliferieren. T_H1-Zellen entstehen und produzieren IFN- γ , welches Makrophagen stimuliert, die in der Lage sind die Erreger zu phagozytieren und mit Sauerstoff-Radikalen zu schädigen. Die T_H1-Zellen produzieren auch IL-2, welches NK-Zellen stimuliert, die in der Lage sind die Erreger direkt zu bekämpfen. T_{FH}-Zellen finden sich in Keimzentren mit B-Zellen zusammen, welche anschließend zu B-Memory-Zellen oder zu Plasmazellen, welche Antikörper produzieren, werden. Die Antikörper können die Sporoziten immobilisieren oder die Erreger bzw. die befallenen Erythrozyten opsonieren, damit andere Zellen sie phagozytieren können (rezensiert in KURUP, BUTLER und HARTY 2019).

In beiden Phasen der Infektion scheint, obwohl die Aktivität der einen Gruppe jeweils im Vordergrund steht, das Zusammenspiel von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen von großer Wichtigkeit zu sein (rezensiert in SPENCE und LANGHORNE 2012).

1.4.2 Immunpathologie

Die wohl schwerwiegendste Komplikation, die gerade bei sehr jungen Patienten in vielen Fällen für die Mortalität verantwortlich zu machen ist, ist die zerebrale Malaria (CM). Wo sie bei Erwachsenen eher im Kontext eines Multiorganversagens bei schweren Verläufen und hohen Parasitämien auftritt, ist sie bei Kindern deutlich häufiger und tritt schon in früheren Phasen der Erkrankung und bei geringerer parasitärer Last auf. Die Entwicklung der zerebralen Malaria hängt nicht allein von den Plasmodien ab. Es konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten in den Gehirnen von an ECM erkrankten Mäusen angereichert sind und dass CD4 und/oder CD8-defiziente Mäuse später oder gar nicht an ECM erkranken (CLASER et al. 2011, rezensiert in GHAZANFARI et al. 2018). Diese Mäuse sind jedoch nicht in der Lage, sich langfristig der Parasiten zu erwehren und sterben an hohen Parasitämien und Anämie. Auch in postmortalen Studien am Menschen wurden sequestrierte, infizierte Erythrozyten sowie Lymphozyten angereichert in den Gehirnen an CM verstorbener Patienten gefunden.

Eine Hypothese zur Pathophysiologie der CM formuliert, dass während der Blut-Phase der Infektion verschiedene Leukozyten TNF und IFN- γ sezernieren. Diese Zytokine stimulieren Endothelzellen im Gehirn dazu Oberflächenmoleküle wie VCAM-I oder ICAM-I auszubilden, an die die infizierten Erythrozyten binden und das Gefäßlumen verengen. Auch wird CXCL10 induziert, welches CD8⁺-T-Zellen binden, die daraufhin im Gehirn verbleiben. Die Endothelzellen präsentieren über MHC-I-Moleküle parasitäres Antigen, die folgende Immunreaktion schädigt den Zusammenhalt der tight junctions. Auch Thrombozyten sammeln sich im Gehirn und beginnen zu verklumpen. Die Gefäßverschlüsse, das geschädigte Endothel und der erhöhte intravasale Druck resultieren in einem Hirnödem, welches die Klinik der CM erklärt (rezensiert in GHAZANFARI et al. 2018).

Die Mechanismen, die eine CM vermitteln, wirken auch in anderen Organen wie der Niere oder der Lunge. Die Pathologie und klinische Manifestation der schweren Malaria geht somit nicht nur von den Parasiten, sondern auch von den Immunzellen aus.

1.4.3 Schutz vor (Re-) Infektionen

Erwachsene Menschen in Malaria Endemiegebieten entwickeln sehr geringe Parasitämien und kaum Symptome, nachdem sie ihr Leben lang unzählige infektiöse Insektenstiche durchgemacht haben.

Mit verschiedenen Impfschemata ist es sogar möglich sterile Immunität zu erreichen. Es ist wichtig zu identifizieren, welche Bestandteile des Immunsystems jeweils diesen Schutz vermitteln, um einen wirksamen Impfstoff zu entwickeln.

Im Blut von Erwachsenen aus Endemiegebieten und in verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass zahlreichen Zellreihen für den Schutz vor schwerer Malaria und hoher Parasitämie wichtig sind. Darunter sind DC, Gedächtnis-T-Zellen, CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen zu nennen. Regulatorische T-Zellen reduzieren Immunpathologien, können aber auch mit einer schlechteren Pathogen-Eradikation assoziiert werden (WALTHER et al. 2005). Auch könnten sie die Ausbildung eines Impferfolges behindern. Auch wenn generell angenommen wird, dass Immunität gegen die Blut-Phase der Malaria nicht langfristig anhält, gibt es Hinweise darauf, dass unter bestimmten Umständen ein gewisser Schutz auch länger erhalten bleiben kann (rezensiert in STANISIC und GOOD 2015).

In einer in der Natur vorkommenden Infektion wird eine geringe Anzahl Sporozoiten in die Haut eingebracht, die dann einige Hepatozyten infizieren. Es werden CD8⁺-T-Memory-Zellen induziert, diese schaffen es jedoch nicht, vor Ausbruch der Blut-Phase alle Erreger zu töten. Ein Impfansatz, der in der Lage ist sterile Immunität zu induzieren, appliziert große Mengen RAS (radiation attenuated sporozoites) und bewirkt somit die Ausbildung deutlich größerer Mengen CD8⁺-T-Memory-Zellen. Diese können mit Effektormolekülen wie Granzym B oder Perforin oder mit Zytokinen wie IFN γ oder TNF die Infektion stoppen (rezensiert in Van BRAECKEL-BUDIMIR, KURUP und HARTY 2016). Sterile Immunität kann erreicht werden. Auch Plasmodium-spezifische CD4⁺-T-Zellen korrelierten nach Impfung in einigen Studien mit dem absoluten Schutz vor Infektionen (MORDMÜLLER et al. 2017). RAS sind nicht in der Lage eine Blut-Phase auszulösen, es gibt Hinweise darauf, dass die während einer Blut-Phase induzierten CD8⁺-T-Zellen nicht so umfangreich und langfristig schützen, wie die, die vorher entstanden sind (rezensiert in Van BRAECKEL-BUDIMIR, KURUP und HARTY 2016). Generell induzieren ausgeprägte Entzündungen im Sinne der immunologischen Homöostase immunmodulierende Gegenreaktionen. Die Aktivität von T_{reg}s und die Ausbildung koinhibitorischer Rezeptoren und Liganden vermitteln dies. Es ist denkbar, dass, anders als in der Leber-Phase, während der intensiven Immunreaktion in der Blutphase, Mechanismen der Immunsuppression die Ausbildung einer Immunität behindern. Ein Verständnis dieser Abläufe könnte neue therapeutische oder präventive Möglichkeiten eröffnen.

1.4.4 Koinhibitoren in der Malaria

Die Konzepte von Blockade oder gezielter Stimulation koinhibitorischer Signalwege eröffneten ein Forschungsfeld, in dem sich zur Zeit viel tut. Man bewegt sich auf dem schmalen Grat, die Parasiten-*Clearance* und Immunantwort zu steigern, ohne Komplikationen zu provozieren. In der Therapie

einer bestehenden Infektion, wie auch in der Optimierung von Impfstrategien könnten Koinhibitoren eine Rolle spielen.

CTLA-4-Blockade in muriner Malaria verschärft die Entzündung, induziert CM und verkürzt das Überleben (JACOBS et al. 2002). In einem anderen Maus-Modell mit nicht tödlicher *P. yoelii* Infektion konnte aber auch gezeigt werden, dass CTLA-4-Blockade die Parasitämie begrenzt und dazu führt, dass die Maus die Parasiten schneller eradiziert (LEPENIES et al. 2007).

PD-1-defiziente Mäuse kontrollierten schneller *P. chabaudi* Infektionen und erreichten sterile Immunität (HORNE-DEBETS et al. 2016). Unter PD-1- oder PD-L1-Blockade, gerade in Kombination mit LAG-3-Blockade, konnten Infektionen schnell beherrscht werden. Es zeigte sich allerdings auch hier die Tendenz eine CM zu entwickeln (rezensiert in FALEIRO et al. 2018).

Tim-3 Blockade ist in der Lage im Mausmodell den erschöpften Phänotyp von Lymphozyten wieder aufzuheben. Symptome der CM wurden reduziert und die Parasiten schneller eradiziert (HOU et al. 2016).

Zu TIGIT und LAG-3 Blockade im Rahmen der Malaria liegen bis jetzt noch keine Studien vor.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die humane Malaria ist nach Schätzungen der WHO die häufigste Infektionskrankheit der Welt. Mit 405.000 Toten im Jahre 2018 zählt sie zudem zu den Erkrankungen mit den meisten Todesopfern. Ursächlich dafür, dass die Malaria ein solches globales Problem darstellt, ist unter anderem, dass sie unterschiedliche Phasen im Menschen durchläuft, in denen verschiedene Anforderungen an das Immunsystem gestellt werden, die an einigen Stellen nicht optimal erfüllt werden. Am Beginn der Infektion in der extraerythrozytären Leberphase scheint das Immunsystem nicht ausreichend aktiv zu sein und die Parasiten können sich in der Leber vermehren. Wenn dann die Parasiten in den folgenden Blutphasen immer mehr Erythrozyten befallen und große Mengen Antigen im Blutstrom zirkulieren, leidet der Körper unter der ausgeprägten Entzündung und eine etwas reduzierte Aktivität des Immunsystems wäre vermutlich von Vorteil. Gerade junge Patienten in Entwicklungsländern überstehen diese Phase oft nicht. Sind die schweren Blutphasen mit Fieber und hohen Parasitämien überstanden, kann die Malaria in einen chronischen Verlauf übergehen, in dem das Immunsystem wohl wieder zu schwach gegen die Parasiten vorgeht und diese über Jahre im Körper überdauern können.

Koinhibitorische Moleküle sind auf verschiedenen Leukozyten zu finden und regulieren die Aktivität des Immunsystems zellin- und extrinsisch. In Vorarbeiten wurde festgestellt, dass diese Koinhibitoren in der Malaria vermehrt exprimiert werden. Das Ziel dieser Arbeit ist es, diese

Koinhibitoren weiter zu untersuchen. Der Fokus in dieser Arbeit soll auf PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3 und TIGIT liegen. Es werden Vollblutproben von an Malaria erkrankten Patienten mit verschiedenen Antikörper-Panels gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Besondere Aufmerksamkeit erhalten hierbei die T-Helferzellen sowie die Monozyten, stellvertretend für die Gruppe der APC. Es werden Zellen im Hinblick auf Koexpression mehrerer Koinhibitoren untersucht. Es werden die Liganden der Koinhibitoren auf T-Zellen und Monozyten gefärbt und gemessen. Es wird die Expression der Effektormoleküle CD39 und Granzym B auf T-Zellen untersucht.

Die Leberphase der Malaria ist schwierig zu erforschen, da die Patienten sich in der Regel nicht krank fühlen und deshalb kein Kontakt zum Gesundheitssystem und eventuell daran angeschlossene Forschungseinrichtungen besteht. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Mordmüller vom Institut für Tropenmedizin Tübingen wird in dieser Arbeit die Leberphase der humanen Malaria untersucht. In Vorbereitung einer Impfstoff-Studie wird eine Kohorte gesunder malaria-naiver Erwachsener unter kontrollierten Bedingungen infiziert. In dieser überwachten Leberphase wird auch für diese Arbeit Blut gewonnen und es werden die Expressionsmuster der Koinhibitoren im Verlauf analysiert. In diese Untersuchungen werden auch die vermutlich am ehesten bereits aktivierten CD8⁺-T-Zellen eingeschlossen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es einen Beitrag zum Verständnis der komplexen immunologischen und immunregulatorischen Vorgänge in der Malaria zu leisten. In Zeiten, in denen die *checkpoint*-Inhibition in der Krebstherapie große Erfolge verbuchen kann, besteht die Hoffnung, dass das Verständnis und die dann möglicherweise folgende Modulation dieser Vorgänge, die Therapie und die Prävention der Malaria verändern kann.

2 Probanden, Material und Methoden

2.1 Probanden und Patienten

In dieser Arbeit werden Personengruppen, unabhängig von den Geschlechtern der in der Gruppe befindlichen Personen, aus Gründen der Praktikabilität, im männlichen Plural benannt.

Die Patienten, deren Blut im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, stammten aus der Ambulanz des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, beziehungsweise der Bernhard-Nocht-Klinik am Universitätsklinikum Eppendorf. Fast alle analysierten Patienten waren mit *P. falciparum* infiziert, einzelne mit *P. vivax*. Es wurde in der Auswertung zwischen diesen Gruppen kein Unterschied gemacht.

Als gesunde Kontrollen stellten sich Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Bernhard-Nocht-Instituts zur Verfügung. Zusätzlich wurden Malaria-naive gesunde Probanden aus der Gruppe der Tübinger, vor Kontakt mit den Sporozoiten, als Kontrollen miteingeschlossen.

2.2 Ethik

Eine ethische Genehmigung wurde durch die Ethikkommission Hamburg unter der Bearbeitungsnummer **PV4539** eingeholt. Die Probanden gaben eine schriftliche Zustimmung nach erfolgter medizinischer Aufklärung.

Die Probanden, die an der in Tübingen durchgeführten Versuchsreihe teilgenommen haben, wurden durch die dortige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Benjamin Mordmüller rekrutiert. Diese holte ebenfalls das notwendige Einverständnis der Ethik-Kommission ein. Die Blutproben, die für diese Arbeit untersucht wurden, wurden im Rahmen der in der Studie stattfindenden Blutentnahmen gewonnen.

2.3 Material

2.3.1 Laborausüstung

Tab. 1: Laborausüstung

Laborausüstung	Herkunft
Flow cytometer „LSR 2“	BD Bioscience, Heidelberg
Centrifuge 54215 C	Eppendorf, Hamburg
Vortex „MS1 Minishaker“	IKA Labortechnik, Staufen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Gilson, Middleton
Multifuge X3R	Heraeus, Hanau
Lamin air HB 2448	Heraeus, Hanau
Swift pet+	Abimed, Langenfeld
Inversmikroskop Wilovert Standard HF 20	Hund, Wetzlar

2.3.2 Glas und Kunststoff Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Glas und Kunststoff Verbrauchsmaterialien

Glas und Kunststoff Verbrauchsmaterialien	Herkunft
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Falkons 15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
FACS Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
SepMate-50	STEMCELL Technologies, Köln/Vancouver
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaspipetten	VWR, Radnor
Neubauer Zählkammer	Hecht, Sondheim/Rhön
Cellstar, Cell Culture Plate 96 Well	greiner bio-one, Kremsmünster

2.3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Herkunft
Permeabilization Buffer	eBioscience, Frankfurt
Fixation /Permeabilization Concentrate	eBioscience, Frankfurt
Fixation/Permeabilization Diluent	eBioscience, Frankfurt
DPBS Buffer	PAN Biotech, Aidenbach
RBC Lysis/Fixation Solution	Biolegend, San Diego
X-Vivo Medium	Lonza, Verviers Belgium
Ficoll Paque	GE Healthcare, Uppsala
LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Carlsbad California

2.3.4 Antikörper

Tab. 4: Antikörper

Antikörper	Farbe	Klon	Herkunft
CD49b	AF488	P1 E6-C5	Biolegend, San Diego
CTLA-4	PE	L3D10	Biolegend, San Diego
PD-1	PerCP/Cy5.5	EH12.2H7	Biolegend, San Diego
TIGIT	PE/Cy7	MBSA43	eBioscience, Frankfurt
LAG-3	APC	3DS223H	eBioscience, Frankfurt
Grz B	AF700	GB11	BD Bioscience, Heidelberg
CD39	PE /Dazzle	A1	Biolegend, San Diego
CD3	APC/Cy7	HIT3a	Biolegend, San Diego
Tim-3	BV421	F38-2E2	Biolegend, San Diego
CD4	BV510	OKT4	Biolegend, San Diego
Ki-67	AF488	Ki-67	Biolegend, San Diego
BTLA	BV421	MIH26	Biolegend, San Diego
CD8	AF700	RPA-T8	Biolegend, San Diego
CD69	FITC	FN50	Biolegend, San Diego
CD127	BV421	A019D9	Biolegend, San Diego
CD226	FITC	11A8	Biolegend, San Diego
PD-L1	APC	29 E.2A3	Biolegend, San Diego
CD14	AF700	HCD14	Biolegend, San Diego
CD155	PE/Dazzle	SKIL4	Biolegend, San Diego
CD80	BV421	2D10	Biolegend, San Diego

2.4 Methoden

2.4.1 Färbung der Zellen

Für eine genauere Analyse von T-Zellen und Antigen-präsentierenden-Zellen, wurden Koinhibitoren, Aktivierungsmarker und Effektormoleküle auf der Oberfläche und im Zellinneren mittels fluoreszierender Antikörper angefärbt. Anschließend konnte die Expression mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden.

Die Färbungen wurden an Vollblut der Patienten vorgenommen.

In jedes Röhrchen wurden 100µl Blut aus Heparin-Röhrchen pipettiert. Es wurden jeweils ein ungefärbtes Röhrchen, ein Röhrchen, in das nur Marker zur Klassifizierung der Zellen gegeben wurden (z.B. CD3 / CD4), mehrere „fluorescence minus one“ (FMO) Kontrollen (Vollständige Färbungen mit Ausnahme von 1-3 angegebenen Markern), ein Röhrchen mit dem vollständig gefärbten Blut der Probanden und – soweit verfügbar – eine gesunde Kontrolle angefertigt. Die FMO-Röhrchen wurden, soweit genug verfügbar war, mit dem Blut der Patienten bestückt, alternativ mit dem der Kontrolle.

Zu dem Blut wurden die oberflächlich färbenden Antikörper gegeben. Die Mengen, die dabei angewendet wurden, basierten auf Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe. Vor dem Einsatz der neuen Antikörper für CD155 und CD226 erfolgte eine Titration mit unterschiedlichen Konzentrationen, um eine geeignete Menge an Farbstoff zu ermitteln. Das Blut wurde mit den Antikörpern für 10 min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde, um später den Ausschluss toter Zellen zu ermöglichen, noch ein UV-Farbstoff hinzugefügt und der Ansatz für weitere 20 min im Kühlschrank gelagert.

Um die Erythrozyten aufzulösen, wurden sie für 10 min bei Raumtemperatur in „RBC Lysis/Fixation Solution“ von Biolegend lichtgeschützt stehen gelassen und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet aus kernhaltigen Zellen aufgebrochen und in kaltem PBS Puffer aufgelöst.

Die Färbung der Oberfläche wäre hiermit abgeschlossen. Um nun auch intrazelluläre Marker messbar zu machen musste die Zellwand aufgeschlossen werden. „Fixation/Permeabilization“-Lösung von eBioscience wurde tröpfchenweise unter Schwenken im Vortex zu den Zellen gegeben und der Ansatz 45 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit Waschpuffer gespült.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren, wurde Cohn II Reagenz hinzugefügt und für 10 min im Kühlschrank inkubiert. Cohn II Reagenz besteht hauptsächlich aus γ -Globulinen. An die so vorbereiteten Proben konnten nun die intrazellulär färbenden Antikörper sowie CD3 zugegeben werden. Diese Farbstoffe durften nochmals 30 min im dunklen Kühlschrank binden, es wurde noch zweimal gewaschen und die fertig gefärbten Zellen konnten am LSR 2 analysiert werden.

Die Zellen wurden in den meisten Fällen direkt nach der Färbung vermessen. Im Fall der in Tübingen angefertigten Färbungen lagen 1-5 Tage und ein Transport zwischen Färbung/Fixierung und Messung. Transportiert wurden die Proben in einer Kühlbox mit handelsüblichen Kühlpacks aus einem Eisfach.

2.4.2 Antikörper Panels

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit mit drei verschiedenen Panels gefärbt. Die Daten auf denen die Abbildungen 6-12 basieren, wurden mit Hilfe des „**Regulatorische Moleküle**“-Panels erhoben. Das „**Liganden**“-Panel wurde für die Erhebung der Daten für Abb. 14, sowie die Analyse von Monozyten in Abb. 15 verwendet.

Die Untersuchung der CD3⁺CD8⁺-Lymphozyten von Probanden, die in Tübingen mit experimenteller Malaria infiziert wurden, erfolgte mittels des „**CD8**“-Panels.

Die gewählten Farben, die Dosierungen und die Auswahl der FMO-Färbungen folgt.

Tab. 5: „Regulatorische Moleküle“-Panel

„Regulatorische Moleküle“-Panel

Marker	Farbstoff	Menge	Anwendungszeitpunkt
CD49b	AF488	3 µl	Oberfläche
PD-1	PerCP/Cy5.5	0,625 µl	Oberfläche
TIGIT	PE/Cy7	1 µl	Oberfläche
LAG-3	APC	5 µl	Oberfläche
CD39	PE/Dazzle	1 µl	Oberfläche
Tim-3	BV421	3 µl	Oberfläche
CD4	BV510	1 µl	Oberfläche
CTLA-4	PE	0,625 µl	intrazellulär
Grz B	AF700	2,5 µl	intrazellulär
CD3	APC/Cy7	1 µl	intrazellulär
Live/dead	UV	0,1 µl	Oberfläche nach 10 min
1. FMO:	PD1, CD39		
2. FMO:	CD49b, LAG-3		
3. FMO:	CTLA-4, Grz B		
4. FMO:	TIGIT, Tim-3		

Tab. 6: „Liganden“-Panel

„Liganden“-Panel

Marker	Farbstoff	Menge	Anwendungszeitpunkt
CD226	FITC	2 µl	Oberfläche
PD-1	PerCP/Cy5.5	0,625 µl	Oberfläche
TIGIT	PE/Cy7	1 µl	Oberfläche
PD-L1	APC	0,1 µl	Oberfläche
CD14	AF700	0,5 µl	Oberfläche
CD155	PE/Dazzle	4 µl	Oberfläche
CD80	BV421	1,25 µl	Oberfläche
CD4	BV510	1 µl	Oberfläche
CTLA-4	PE	0,625 µl	intrazellulär
CD3	APC/Cy7	1 µl	intrazellulär
Live/dead	UV	0,2 µl	Oberfläche nach 10 min

Klon: M1H1

1. FMO: CD226, TIGIT, CD155
2. FMO: CTLA-4, PDL1, CD80
3. FMO: PD1, CD14

Tab. 7: „CD8“-Panel

„CD8“-Panel

Marker	Farbstoff	Menge	Anwendungszeitpunkt
CD8	AF700	0,25 µl	Oberfläche
CD160	PE/Cy7	5 µl	Oberfläche
CD28	BV510	1 µl	Oberfläche
PD1	PerCP/Cy5.5	0,625 µl	Oberfläche
CD3	APC/Cy7	1 µl	intrazellulär
CTLA-4	PE	0,625 µl	intrazellulär
Grz B	AF647	1 µl	intrazellulär
Ki67	AF488	2,5 µl	intrazellulär
Perforin	BV421	5 µl	intrazellulär

1. FMO: CD160
2. FMO: PD-1, CD28
3. FMO: Grz B, Perforin
4. FMO: CTLA-4, Ki-67

2.4.3 Analyse im Durchflusszytometer

Nach der Färbung und Fixierung konnten die Zellen im Durchflusszytometer „LSR 2“ der Firma BD Bioscience untersucht werden. In diesem komplexen Gerät werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit schwimmend, einzeln, in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Messkammer hindurchgeführt. In dieser Kammer wird die Zelle oder das Zellfragment von einem Laserstrahl beleuchtet. Das Maß, in dem das Licht sich an der Zelle bricht, gibt Aufschluss über die Beschaffenheit derselben. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward-Scatter) hängt vom Volumen der Zelle ab, während das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side-Scatter) Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle zulässt. Das Durchflusszytometer ist zudem in der Lage Aussagen über die Farben bzw. die Fluoreszenzen zu treffen in denen eine Zelle leuchtet. Mit weiteren Lasern und Filtern können verschiedene Farbspektren erfasst werden. Wie zuvor beschrieben wurden fluoreszierende Antikörper an spezifische Strukturen der Zellen gebunden, welche auf diese Weise ebenfalls nachgewiesen werden können. So konnte man Zellen, in den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen, bis zu 13 verschiedene Eigenschaften zuschreiben.

2.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

2.5.1 Lymphozyten

Die Auswertung der im Durchflusszytometer erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe von „FlowJo“ (Version _v10.6.1). In diesem Programm können jeweils zwei Eigenschaften einer Zelle/eines Partikels einander gegenübergestellt werden und durch den Ein- oder Ausschluss von Teilmengen Schritt für Schritt die interessanten Zellen identifiziert werden.

Am häufigsten wird in dieser Arbeit die Rede von CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten sein, die als T-Helferzellen betrachtet wurden. Um diese Population ausfindig zu machen, wurde zuerst im FSC / SSC eine Gruppe von Zellen abgesteckt, die an Volumen etwas kleiner und deutlich weniger granulär als die große Gruppe der Granulozyten ist. Diese Gruppe wurde fortan als Lymphozyten betrachtet (Abb. 4.1).

In einem zweiten Schritt wurden Zellen, die zusammenklebten oder aus anderen Gründen gleichzeitig durch den Laser wanderten, ausgeschlossen. Dazu wurde der FSC-A (Forward-Scatter-Area) in Relation zum FSC-H (Forward-Scatter-Height) gesetzt. Eine einzelne Zelle müsste in beiden Betrachtungen ungefähr gleiche Werte haben und somit auf einer Diagonalen, die durch Null geht, liegen. Alle Messpunkte, die außerhalb dieses Bereiches lagen, wurden als Dubletten oder Multipletten interpretiert und ausgeschlossen (Abb. 4.2).

Die Membran von toten Zellen ist durchlässiger als die von lebendigen. Diesen Umstand macht sich der nächste Schritt zunutze. Ein LIVE/DEAD-Farbstoff der Firma Invitrogen, der an Aminosäuren

im Zellinneren und auf der Zelloberfläche bindet, wurde angewendet. Bei einer lebendigen Zelle, kann der Farbstoff nur an die wenigen, auf der Zelloberfläche befindlichen, Aminosäuren binden, während bei einer toten Zelle der Farbstoff in die Zelle eindringen kann und im Cytosol noch große Mengen weiterer Aminosäuren findet. Somit leuchtet eine tote Zelle deutlich intensiver als eine lebendige und konnte in diesem dritten Schritt ausgeschlossen werden (Abb. 4.3).

Das CD3-Antigen ist ein Proteinkomplex, der zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor auf kernhaltigen Zellen anzutreffen ist. Die Nachweisbarkeit von CD3 auf den vorselektierten Lymphozyten diente in dieser Arbeit als Parameter um eine Zelle als T-Zelle zu definieren. In einem vierten Schritt wurden demnach alle CD3 positiven (= CD3⁺) Zellen eingeschlossen (Abb. 4.4).

Als nächstes wurden aus den verbliebenen CD3⁺ T-Lymphozyten noch die Zellen herausselektiert, die in dieser Arbeit als T-Helferzellen betrachtet werden sollten. Zellen, die zusätzlich zur Erfüllung aller vorangegangenen Kriterien noch den CD4-Rezeptor trugen, wurden als T-Helferzellen interpretiert (Abb. 4.5).

Ob eine Zelle als positiv oder negativ für einen der weiterführenden Marker gewertet wurde, wurde mit Hilfe von FMOs bestimmt. Da die Farbstoffe in ihrem Lichtspektrum teilweise nah beieinander lagen und manche Zellen auch eine basale Eigenfluoreszenz zeigten, konnte nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob eine Zelle die in einer bestimmten Farbe leuchtete, den betreffenden Marker tatsächlich trug oder ob es sich um ein Artefakt handelte. Diese beiden Fehlerquellen traten jedoch unabhängig davon auf, ob der Antikörper der betreffenden Farbe mit angewendet wurde oder nicht. In Färbungen mit allen außer ein bis drei Antikörpern wurde gemessen wie stark Zellen in jenen Farben leuchteten ohne, dass es etwas mit besonderen Markern zu tun hatte. Jeder Farbausschlag, der über dieses „Grundleuchten“ hinaus ging, wurde so interpretiert, dass die Zelle diesen Marker trägt. In Abb. 4.6 ist ein Beispiel für eine vorselektierte Gruppe CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten mit nach FMO gesetzten Gates zu sehen.

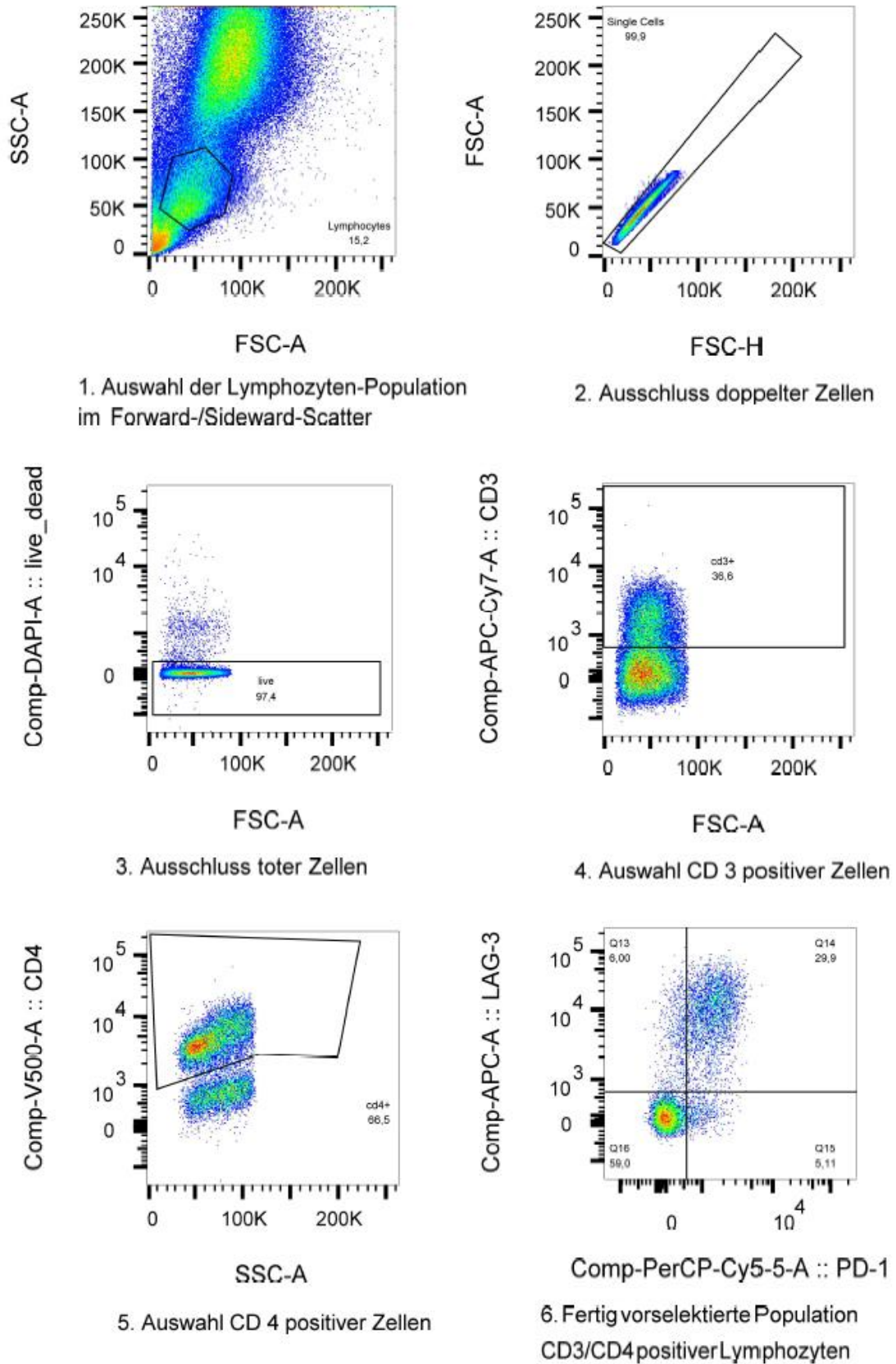
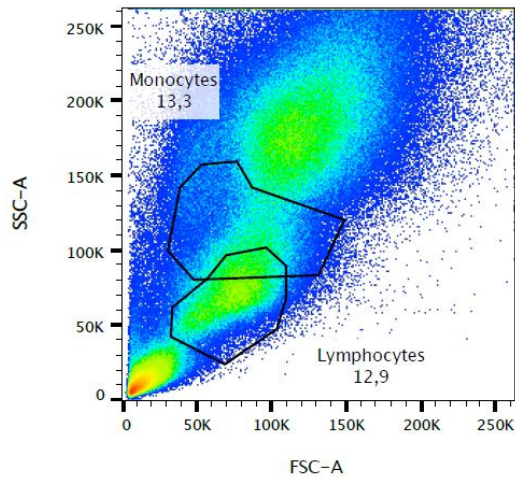


Abb. 4: Gating Strategie für CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten

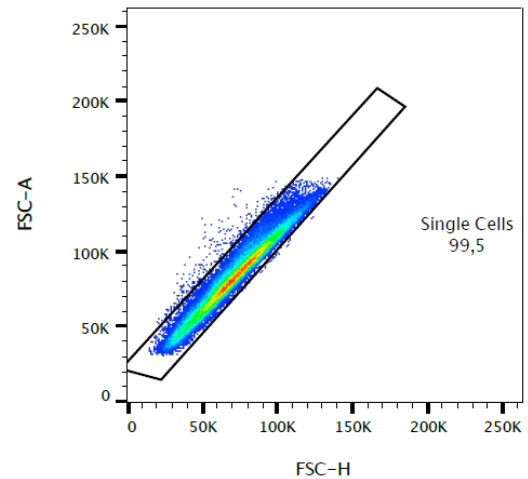
In „FlowJo“ (Version _v10.6.1) wurden in mehreren Schritten CD3⁺CD4⁺, lebendige, einzelne Lymphozyten ausgewählt.

2.5.2 Monozyten

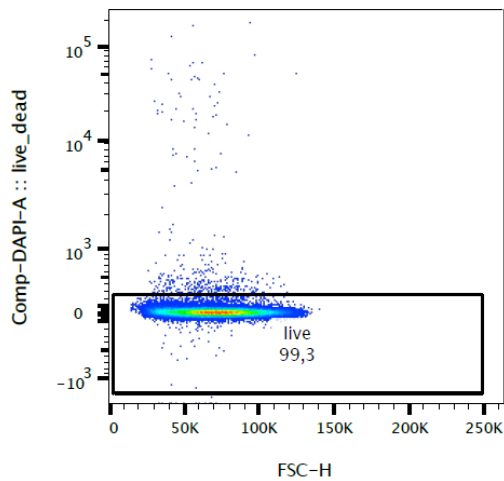
Es wurden in dieser Arbeit nicht nur Lymphozyten, sondern auch Monozyten untersucht. Bei Patienten, deren Blut mit dem „Liganden“-Panel gefärbt wurde, wurden einige Zellen als Monozyten definiert. Es wurde zuerst eine Population von Zellen, die in der Granularität und dem Volumen zwischen den Lymphozyten und den Granulozyten im FSC / SSC angesiedelt war, abgesteckt (Abb. 5.1). In oben beschriebener Weise wurden dann Dubletten und Multipletten ausgeschlossen (Abb. 5.2). In einem dritten Schritt wurden auch hier tote Zellen mittels LIVE/DEAD-Farbstoff aussortiert (Abb. 5.3). Jetzt wurden die CD14- und die CD4-Expression gegenübergestellt. Zellen, die eindeutig positiv für CD14 waren und mittlere Werte in der CD4 Expression zeigten, wurden ausgewählt und als Monozyten gewertet (Abb. 5.4). Zusätzlich waren diese Zellen CD3-negativ. Gates wurden mit Hilfe der angefertigten FMO-Färbungen gesetzt und die Expressionen von Liganden und Koinhibitoren der Monozyten ausgewertet (Abb. 5.5).



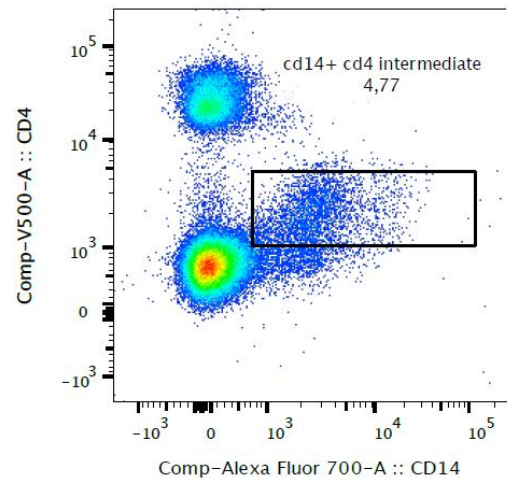
1. Zellen, die in Größe und Granularität zwischen Lymphozyten und Granulozyten liegen, wurden ausgewählt



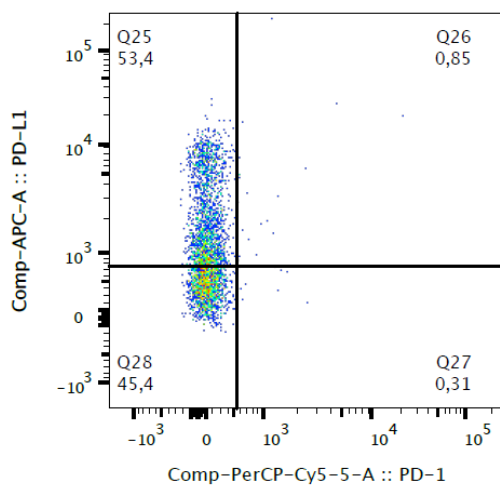
2. Dubletten und Multipletten wurden in der Forward- / Sideward - Scatter Ansicht ausgeschlossen



3. Tote Zellen wurden mit Hilfe eines LIVE/DEAD Farbstoffes ausgeschlossen



4. CD14 positive, CD4 intermediate Zellen wurden ausgewählt und werden als Monozyten betrachtet



5. Fertig vorselektierte Monozyten mit nach FMO gesetzten Gates für PD-1 und PD-L1

Abb. 5: Gating Strategie für Monozyten

Es wurde Vollblut von Patienten mit dem „Liganden“-Panel gefärbt. Auswertung mit Hilfe von „FlowJo_v10.6.1“.

2.6 Statistische Auswertung und grafische Darstellung

Die grafische Darstellung der erhobenen Daten sowie die statistischen Berechnungen von Signifikanzen oder Regressionen erfolgten mittels „GraphPad Prism Version 5.02“. Beim Vergleich zweier Gruppen fanden Student's t-Test oder der Mann-Whitney-Test Anwendung. Wurden mehrere Darstellungen aus dem gleichen Datensatz erhoben, wurden die p-Werte mittels Bonferroni's Methode angepasst. Zur Berechnung von Korrelationen wurde die Methode nach Spearman angewendet. Das Konfidenzintervall betrug in allen Fällen 95%. p-Werte wurden in vielen Fällen ausgeschrieben, falls abgekürzt wurde, bedeutete * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. p-Werte über 0,05 wurden als ns (nicht signifikant) angegeben. In Grafiken wurden, falls Balken dargestellt wurden, der Median sowie das obere und untere Viertel eingezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion von Koinhibitoren in der humanen Malaria

Um einen Überblick über die in der humanen Malaria exprimierten Koinhibitoren zu gewinnen, wurde Vollblut von Malaria-Patienten auf PD-1, LAG-3, TIGIT, Tim-3 und CTLA-4 gefärbt, durchflusszytometrisch untersucht und mit dem Blut von gesunden Kontrollen verglichen. Es wurden $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten analysiert. Es hat sich gezeigt, dass sich, mit Ausnahme von Tim-3, alle genannten Koinhibitoren in signifikant höherem Maße nachweisen ließen, als das bei gesunden Probanden der Fall war (Abb. 6). PD-1 und CTLA-4, welche auch bei Kontrollen in geringer Konzentration anzutreffen waren, waren bei Malaria-Patienten in nahezu allen Fällen deutlich über das Niveau der Kontrollgruppe hinaus exprimiert. LAG-3 und Tim-3, welche bei gesunden Probanden kaum oder gar nicht nachzuweisen waren, zeigten sich bei einigen Patienten nicht, bei anderen aber moderat oder sogar deutlich angereichert. TIGIT, welches auch bei Gesunden auf den untersuchten Zellen moderat exprimiert zu finden war, war ebenfalls deutlich erhöht und auf etwa einem Fünftel der Zellen zu finden.

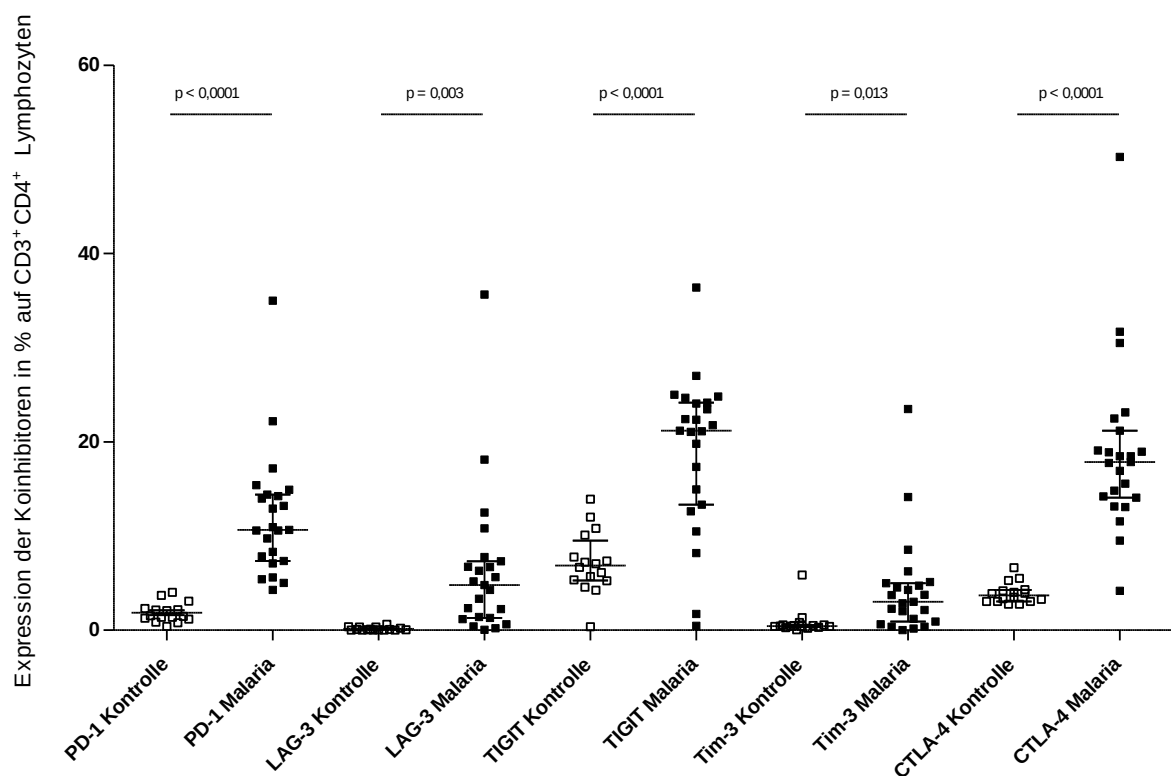


Abb. 6: Induktion von Koinhibitoren auf $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten bei Malaria-Patienten

Vollblut von gesunden Kontrollen sowie Patienten mit Malaria wurde oberflächlich auf CD49b, PD-1, TIGIT, LAG-3, CD39, Tim-3 und CD4 sowie intrazellulär auf CTLA-4, Grz B und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert ($n_{\text{Kontrolle}} = 16$, $n_{\text{Malaria}} = 22$). Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt. Nach Korrektur nach Bonferroni ergeben sich bei 95%-Konfidenzintervallen p-Wert Grenzwerte von $p < 0,00014 = ***$; $p < 0,0014 = **$; $p < 0,007 = *$; p-Werte über 0,007 müssen als statistisch nicht signifikant betrachtet werden.

3.2 Vermehrte Koexpression von Koinhibitoren

Sucht man im Blut von gesunden Probanden nach $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten, die mehrere Koinhibitoren gleichzeitig exprimieren, findet man sehr wenige. TIGIT und CTLA-4 zusammen ließen sich im Mittel auf 0,9% der Zellen nachweisen. TIGIT und PD-1 auf 0,8% und CTLA-4 und PD-1 auf nur 0,25%. Die ohnehin niedrig exprimierten Tim-3 und LAG-3 waren auch in Koexpression mit den oben genannten Koinhibitoren sehr selten (Abb. 7.1 & Abb. 7.2).

Anders war es bei Patienten mit Malaria. Im Durchschnitt waren ca. 21% der Zellen CTLA-4 positiv. Innerhalb dieser Gruppe fanden sich signifikant erhöhte Populationen von doppelt positiven Zellen. So ließen sich im Vollblut etwa 8% CTLA-4/PD-1 doppelt positive, 8% CTLA-4/TIGIT doppelt positive, 6% CTLA-4/LAG-3 doppelt positive und 3% CTLA-4/Tim-3 doppelt positive $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten nachweisen (Abb. 7.1). Es fällt auf, dass der Großteil der Zellen der LAG-3 exprimiert, zusätzlich CTLA-4 positiv ist.

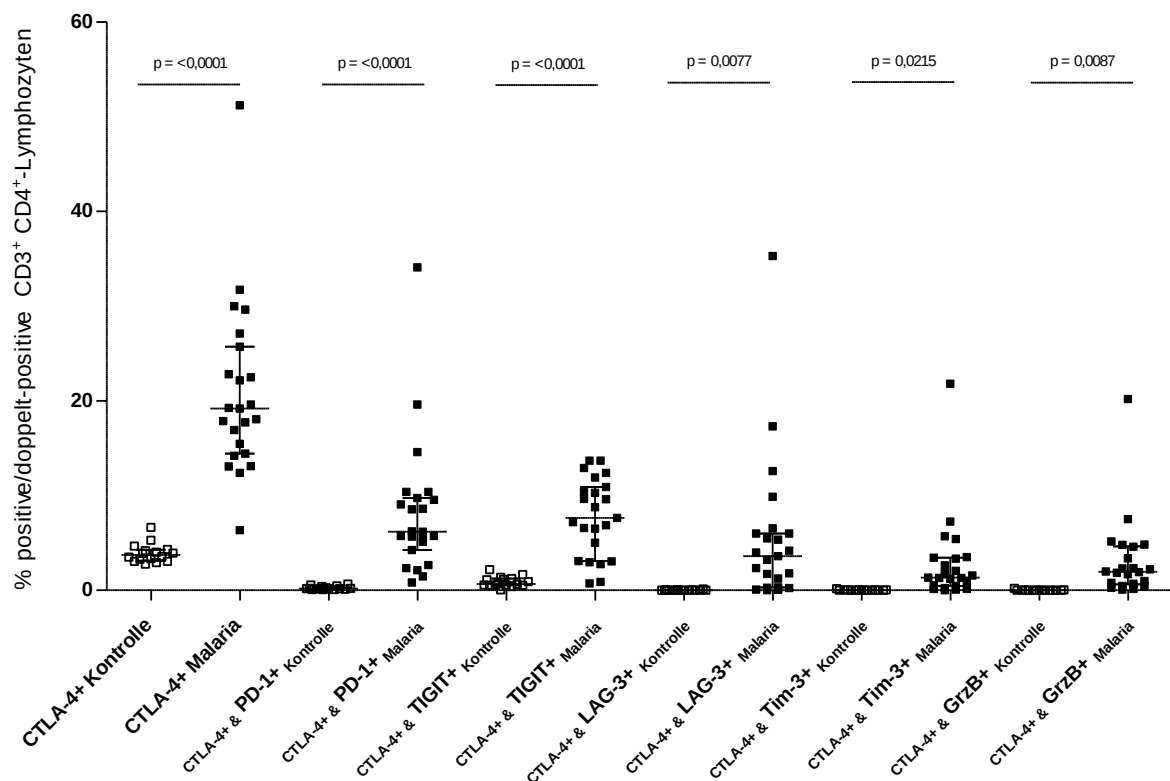


Abb. 7.1: Expression von CTLA-4 und Koexpression mit weiteren Markern auf $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten bei Malaria-Patienten

Vollblut von gesunden Kontrollen sowie Patienten mit Malaria wurde oberflächlich auf CD49b, PD-1, TIGIT, LAG-3, CD39, Tim-3 und CD4 sowie intrazellulär auf CTLA-4, Grz B und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert ($n_{\text{Kontrolle}} = 16$, $n_{\text{Malaria}} = 21-22$). Dargestellt ist der Anteil an positiven und doppelt positiven Zellen an der Gesamtheit der $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten der Probanden/Patienten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt. Nach Korrektur nach Bonferroni's Methode ergaben sich bei 95% Konfidenzintervallen angepasste p-Wert-Grenzen von *** = $p < 0,0002$; ** = $p < 0,002$; * = $p < 0,01$; p-Werte über 0,01 müssen als nicht signifikant angesehen werden.

Betrachtet man die im Schnitt 13% PD-1 positiven Zellen mit Blick auf weitere Koexpression so sieht man, dass etwa zwei Drittel davon zusätzlich CTLA-4 tragen. PD-1 und TIGIT zusammen fanden sich im Mittel auf 5,5% der Zellen, PD-1 und LAG-3 auf 4,5%. PD-1 und Tim-3 wurde noch von 2,5% der Zellen koexprimiert (Abb. 7.2). Wiederum sieht man, dass die Mehrheit der LAG-3 positiven Zellen doppelt (PD-1 und LAG-3) bzw. dann dreifach positiv (PD-1, CTLA-4 und LAG-3) war.

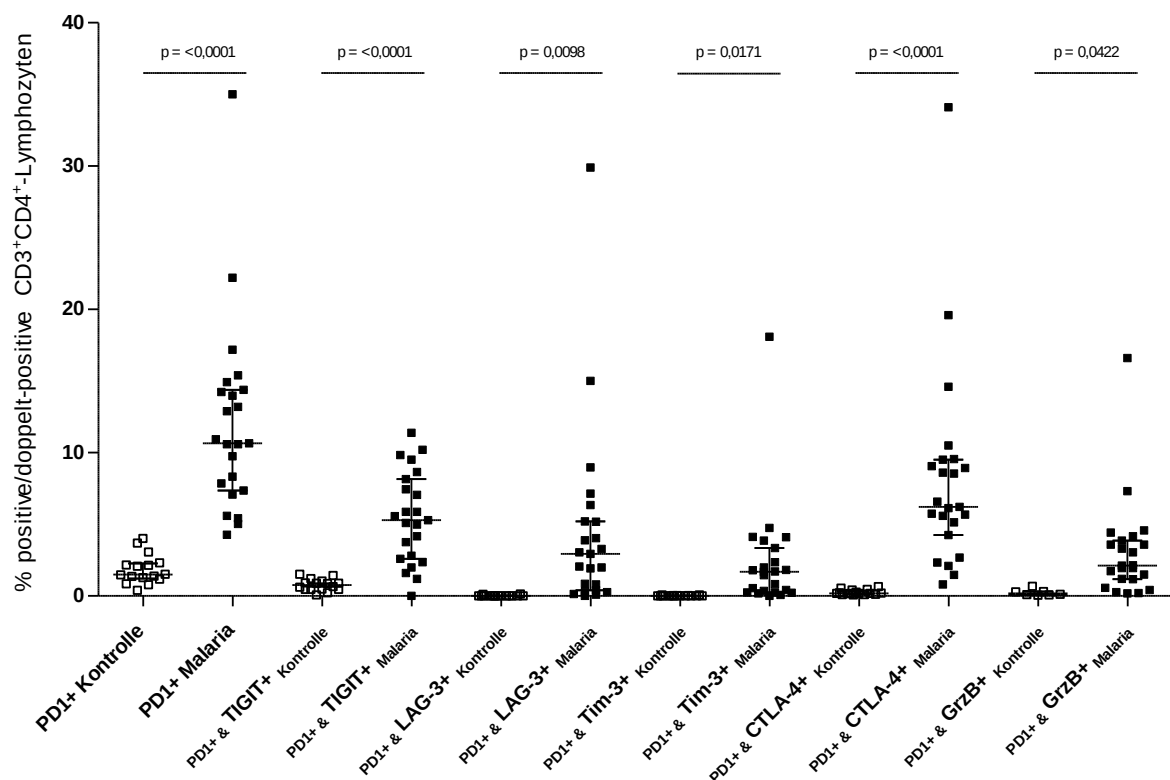


Abb. 7.2: Expression von PD-1 und Koexpression mit weiteren Markern auf CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten bei Malaria-Patienten

Vollblut von gesunden Kontrollen sowie Patienten mit Malaria wurde oberflächlich auf CD49b, PD-1, TIGIT, LAG-3, CD39, Tim-3 und CD4 sowie intrazellulär auf CTLA-4, Grz B und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert ($n_{\text{Kontrolle}} = 16$, $n_{\text{Malaria}} = 23-24$). Dargestellt ist der Anteil an positiven und doppelt positiven Zellen an der Gesamtheit der CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten der Probanden/Patienten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt. Nach Korrektur nach Bonferroni's Methode ergaben sich bei 95% Konfidenzintervallen angepasste p-Wert-Grenzen von *** = $p < 0,00025$; ** = $p < 0,0025$; * = $p < 0,013$; p-Werte über 0,013 müssen als nicht signifikant angesehen werden.

3.3 Korrelationen von PD-1, CTLA-4 und LAG-3

Von Mackroth und Kollegen wurde beschrieben, dass die Expression von PD-1 und CTLA-4 auf CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten in der akuten Malaria positiv korrelieren (MACKROTH et al. 2016). Auch in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchsreihe zeigte sich eine signifikante Korrelation der beiden Marker auf den genannten Zellen (Abb. 8 A). Auch fand sich bei Patienten, deren T-Helferzellen viel PD-1 exprimierten, vermehrt LAG-3 (Abb. 8 C). Die Vermutung, dass CTLA-4

und LAG-3 dann im Rückschluss auch positiv korrelieren, ließ sich nicht sicher bestätigen (Abb. 8 E). Zwischen den anderen untersuchten Koinhibitoren fanden sich keine Korrelationen (Abb. 8 B, D, F).

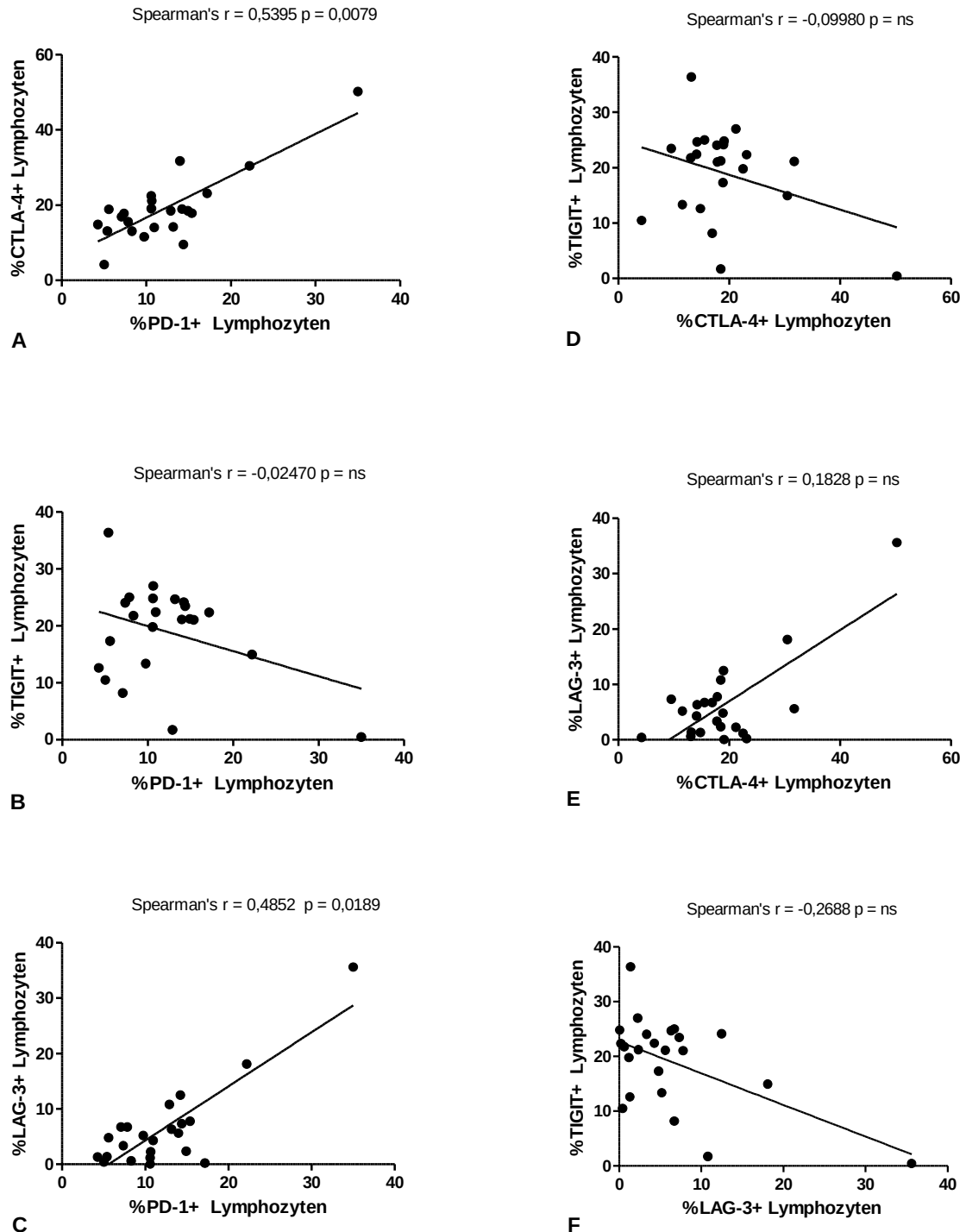


Abb. 8 A-F: Korrelationen der Expressionen von Koinhibitoren auf Lymphozyten im Blut von Malaria-Patienten

Vollblut von Malaria-Patienten wurde oberflächlich auf CD49b, PD-1, TIGIT, LAG-3, CD39, Tim-3 und CD4 sowie intrazellulär auf CTLA-4, Grz B und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht ($n=23$). Gegenübergestellt sind die prozentualen Expressionen der angegebenen Marker auf $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten für jeden einzelnen Patienten. Es wurden Spearman Korrelationen errechnet.

3.4 Induktion von Granzym B und CD39

Die untersuchten T-Helferzellen exprimierten nicht nur vermehrt Koinhibitoren, auch Effektormoleküle ließen sich angereichert nachweisen. Bei gesunden Kontrollen ließ sich Granzym B auf etwa einem von hundert $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten anfärben. Im Vollblut von Patienten mit Malaria waren durchschnittlich 8% der gleichen Zellen Granzym B positiv (Abb. 9 A). Auch steigerte sich die Expression der Ektonukleotidase CD39 im Rahmen der Infektion von durchschnittlich 3,5% auf 6,5% (Abb. 9 B).

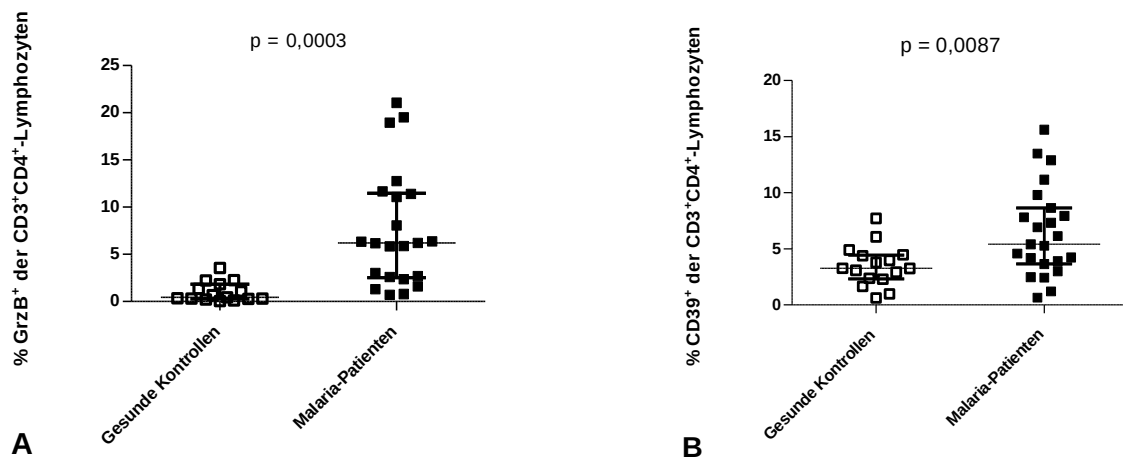


Abb. 9 A-B: Induktion von Effektormolekülen auf $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten bei Malaria-Patienten

Vollblut von gesunden Kontrollen sowie Patienten mit Malaria wurde oberflächlich auf CD49b, PD-1, TIGIT, LAG-3, CD39, Tim-3 und CD4 sowie intrazellulär auf CTLA-4, Grz B und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert ($n_{\text{Kontrolle}} = 16$, $n_{\text{Malaria}} = 22-23$). Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt. Nach Korrektur nach Bonferroni ergeben sich bei 95%-Konfidenzintervallen p-Wert Grenzwerte von $p < 0,00014 = ***$; $p < 0,0014 = **$; $p < 0,007 = *$; p-Werte über 0,0007 müssen als statistisch nicht signifikant betrachtet werden.

3.5 Korrelation von Koinhibitoren und Effektormolekülen

Nachdem gezeigt wurde, dass in der akuten Malaria-Infektion die Expression von Koinhibitoren und Effektormolekülen induziert wird (Abb. 6 & Abb. 9 A-B), wurde untersucht ob es Korrelationen zwischen den beiden Gruppen von Markern gibt. Die prozentualen Anteile der $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten, welche positiv für einen betreffenden Marker waren, wurden in Relation zueinander gesetzt und Spearman Korrelationen errechnet. Es zeigte sich, dass PD-1 schwach positiv mit Grz B korreliert ($r = 0,30$) und CTLA-4 ebenfalls schwach positiv mit Grz B korreliert ($r = 0,25$) (Abb. 10 A, C). Ein solcher Zusammenhang ließ sich zwischen CD39 und den Koinhibitoren nicht feststellen (Abb. 10 B, D, F). Ebenso wenig korrelierten die LAG-3- oder die TIGIT-Expression mit den Expressionen der beiden Effektormoleküle.

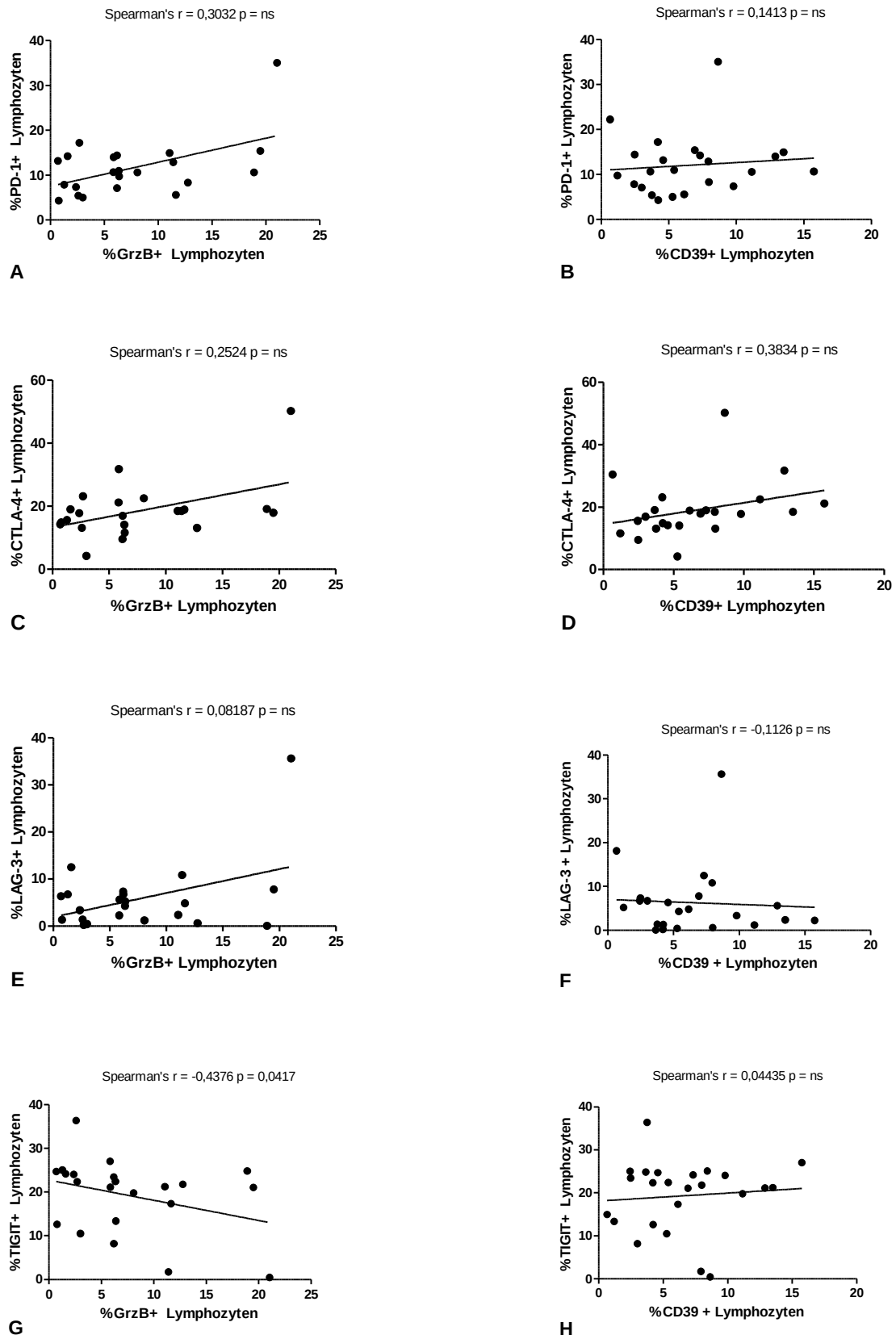


Abb. 10 A-H: Korrelation der Expression von Koinhibitoren und Effektormolekülen auf CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten im Blut von Malaria-Patienten

Vollblut von Malaria-Patienten wurde oberflächlich auf CD49b, PD-1, TIGIT, LAG-3, CD39, Tim-3 und CD4 sowie intrazellulär auf CTLA-4, Grz B und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (n=22-24). Gegenübergestellt sind die prozentualen Expressionen der angegebenen Marker auf CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten für jeden einzelnen Patienten. Es wurden Spearman Korrelationen errechnet.

3.6 Zeitlicher Verlauf der Expressionen von Koinhibitoren und Effektormolekülen

Es gelang Blutproben einer Patientin mit Malaria an fünf aufeinander folgenden Tagen zu untersuchen. Die Patientin wurde ab Tag 1 antiparasitär behandelt. Betrachtet werden $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten.

Das Niveau der Expression von CTLA-4, Tim-3 und CD39 war bei dieser Patientin überdurchschnittlich (Abb. 11 A-B vgl. Abb. 6 & Abb. 9 A-B). Die Expression von TIGIT, LAG-3, Grz B und PD-1 war für einen Malaria-Patienten eher durchschnittlich. Es fällt auf, dass am zweiten Tag sowohl die Kurven der Koinhibitoren als auch die Kurven der Effektormoleküle ihr Maximum erreichen. Der Anteil an CTLA-4 positiven und PD-1 positiven Zellen nimmt nach dem zweiten Tag kontinuierlich ab, ist an Tag 5 allerdings nach wie vor deutlich über dem Niveau, das wir bei gesunden Kontrollen finden (Abb. 6). Die TIGIT Expression nimmt nach Tag 2 ebenfalls wieder ab, bleibt aber im Vergleich zu Tag 1 doch recht konstant erhöht und insbesondere durchgehend deutlich höher als bei Gesunden. Tim-3 und LAG-3 waren zu Beginn moderat erhöht, stiegen dann beide deutlich an, normalisierten sich aber nach Tag 2 rasch wieder, sodass an Tag 5 Werte gemessen wurden, die wir auch bei gesunden Kontrollen vorfanden.

Auch das Effektormolekül Granzym B konnte schon an Tag 1 moderat erhöht nachgewiesen werden (Abb. 11 B). An Tag 2 erreichte die Expression ihr Maximum mit 13,5%, was oberhalb der durchschnittlichen Expression bei Malaria-Patienten liegt (Abb. 9 A). Im weiteren Verlauf verminderte sich das Ausmaß der Granzym B Expression wieder, erreichte an Tag 5 allerdings noch nicht die Werte, die für gesunde Probanden typisch wären.

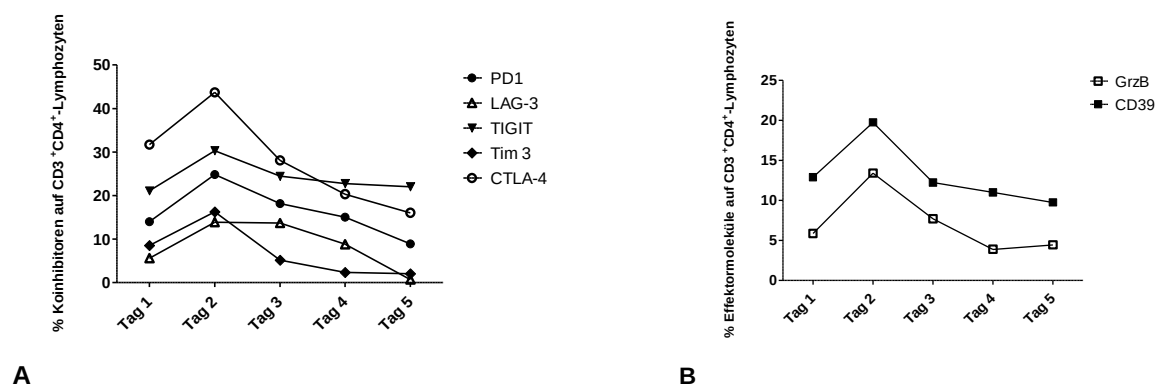


Abb. 11 A-B: Expressionen von Koinhibitoren und Effektormolekülen auf $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten einer Malaria-Patientin im Verlauf mehrerer Tage

An fünf aufeinander folgenden Tagen wurde Vollblut einer Patientin mit Malaria entnommen. Eine antiparasitäre Therapie wurde ab Tag 1 durchgeführt. Das Blut wurde oberflächlich auf CD49b, PD-1, TIGIT, LAG-3, CD39, Tim-3 und CD4 sowie intrazellulär auf CTLA-4, Grz B und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Auf den CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten dieser Patientin konnte schon am ersten Tag mehr CD39 nachgewiesen werden, als es bei gesunden Kontrollen oder auch anderen Malaria-Patienten der Fall war (Abb. 9 B). Auch die CD39-Expression erreichte am zweiten Tag ihr Maximum. Im Verlauf nahm sie wieder etwas ab, erreichte allerdings an Tag 5 noch nicht das Niveau von gesunden Probanden.

Zusammenfassend kann man beobachten, dass bei dieser Patientin schon an Tag 1 alle gemessenen Marker erhöht oder stark erhöht waren und alle Marker ihr Maximum an Tag 2 erreichten. Im Verlauf fällt auf, dass einige Marker (Tim-3, LAG-3) sich an Tag 5 bereits wieder normalisiert hatten, während andere (PD-1, CTLA-4, Grz B, CD39, TIGIT) weiterhin erhöht blieben.

3.7 Subklinischer Verlauf der Expression regulatorischer Moleküle in der Leberphase einer kontrollierten Malaria-Infektion

In der Leberphase der humanen Malaria haben die Patienten, obwohl die Parasiten sich schon im Körper aufhalten und vermehren, in der Regel keine Symptome. Ob sich im Immunsystem schon etwas verändert, bevor der Patient weiß, dass er krank ist, ist aus nachvollziehbaren Gründen im Normalfall kaum zu untersuchen. Im Rahmen der MAVACHE Studie wurden Malaria-naive, gesunde Probanden unter ärztlicher Beobachtung mit *Plasmodium falciparum* Sporozoiten (PfSPZ) infiziert. Die MAVACHE Studie fand am Institut für Tropenmedizin, Reisemedizin und Humanparasitologie (ITM) des Universitätsklinikums Tübingen statt und wurde mit dem Ziel durchgeführt, die optimale Dosis für eine PfSPZ-Impfung zu finden. Um die Effektivität einer vorangegangenen Impfung mit bestrahltem PfSPZ-Vaccine zu überprüfen, fand eine Challenge mit intravenös applizierten PfSPZ der Stämme NF54 oder 7G8 statt. Neben der Challenge dieser geimpften Probanden, fand etwa zeitgleich die kontrollierte Infektion einer Kontrollgruppe statt.

Wir hatten die Möglichkeit Blut von Probanden dieser Kontrollgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen. Sobald die Probanden Fieber entwickelten, wurden sie antiparasitär behandelt, sodass kein Blut von klinisch kranken Probanden untersucht wurde.

Es zeigte sich während der Leberphase der Infektion kein Anstieg der Expressionen von PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3, TIGIT, CD49b, CD39 oder Grz B auf CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten (Abb. 12 A-H). Das Niveau, auf dem die gesunden Kontrollen in diesen und anderen Messungen lagen, wurde während dieser frühen Phase der kontrollierten Infektion nicht überschritten.

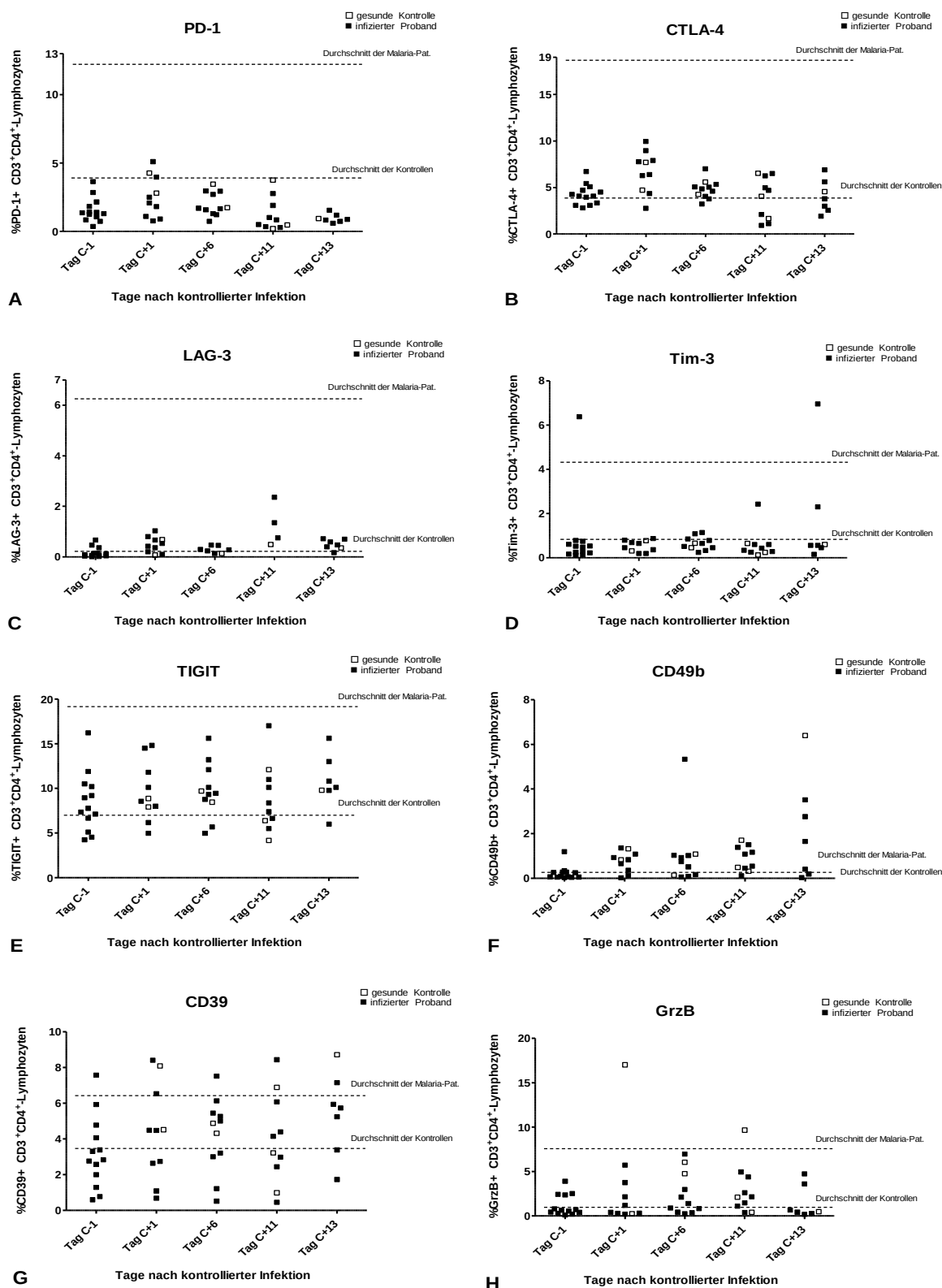


Abb. 12 A-H: Expression von Koinhibitoren und Effektormolekülen in der Leberphase einer kontrollierten Malaria-Infektion

Gesunde Probanden wurden an Tag C+0 kontrolliert mit *Pf*SPZ infiziert. An 5 Zeitpunkten vor und nach der Infektion wurde Vollblut entnommen, mit dem "Regulatorische Moleküle"-Panel gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Es werden die prozentualen Expressionen der gefärbten Marker auf CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten angegeben. Die Mittelwerte der Expressionen gesunder Kontrollen und klinisch manifester Malaria-Patienten aus Abb. 6 sind in den Grafiken hinterlegt. ($n_{\text{infizierte Probanden}}=6-12$; $n_{\text{Kontrollen}}=1-3$)

Auch $CD3^+CD8^+$ -Lymphozyten der Probanden, die mit dem „CD8-Panel“ angefärbt wurden, zeigten in der Expression von Ki-67, CTLA-4, PD-1, Perforin und Grz B keine merkliche Trennung von denen der gesunden Kontrollen (Abb. 13 A-E).

Gleiches zeigte sich bei den zusätzlich noch CD160 positiven $CD3^+CD8^+$ -Lymphozyten, die wir als besonders aktiv eingeschätzt hätten (Daten nicht grafisch dargestellt).

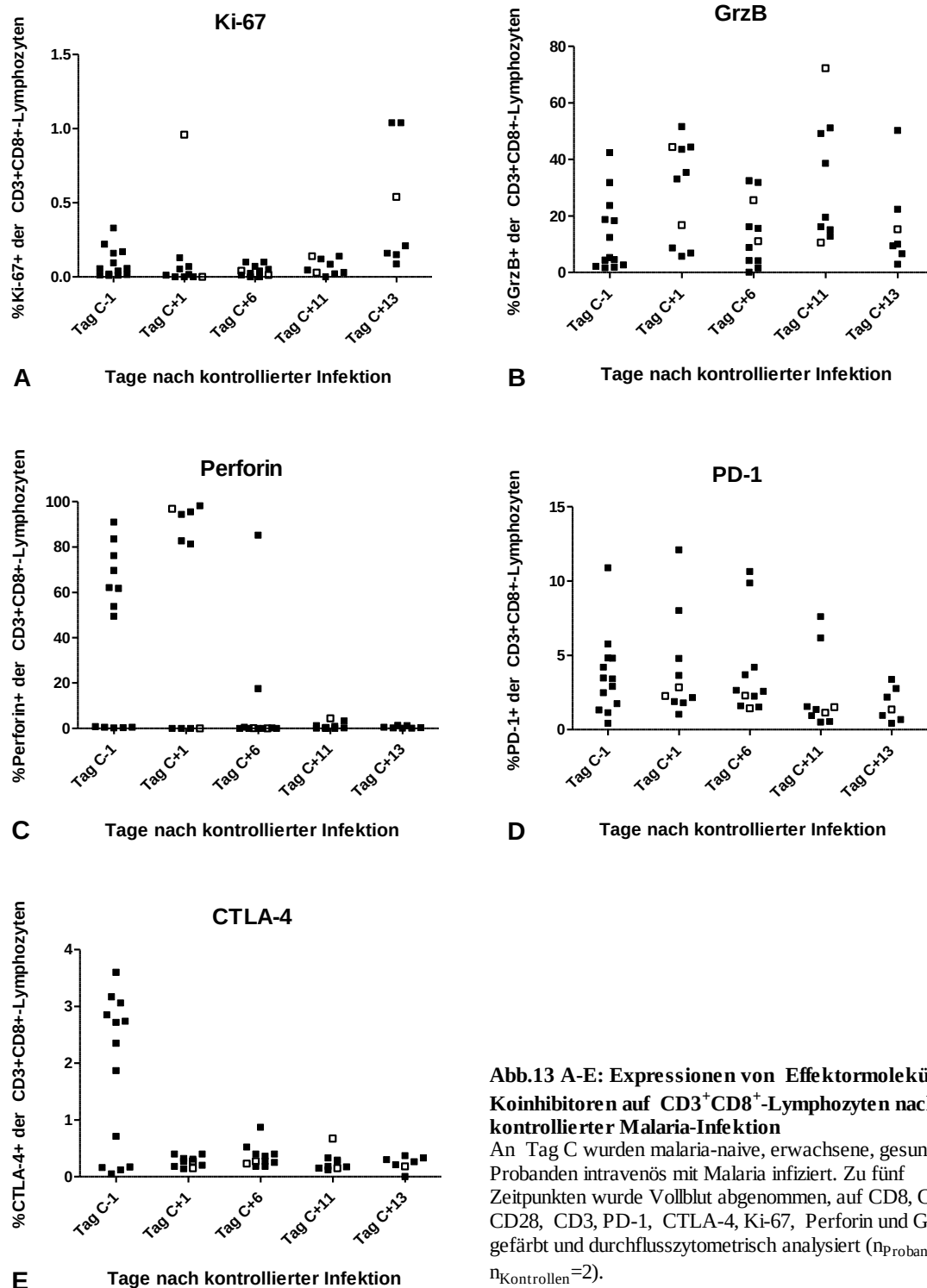


Abb.13 A-E: Expressionen von Effektormolekülen und Koinhibitoren auf $CD3^+CD8^+$ -Lymphozyten nach kontrollierter Malaria-Infektion

An Tag C wurden malaria-naive, erwachsene, gesunde Probanden intravenös mit Malaria infiziert. Zu fünf Zeitpunkten wurde Vollblut abgenommen, auf CD8, CD160, CD28, CD3, PD-1, CTLA-4, Ki-67, Perforin und GrzB gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert ($n_{\text{Probanden}}=12$; $n_{\text{Kontrollen}}=2$).

3.8 Koinhibitoren und deren Liganden

In dieser Arbeit wurden koinhibitorische Moleküle auf den Lymphozyten von Malaria-Patienten untersucht. In einem zweiten Schritt versuchten wir zu beschreiben, auf welchen Zellen und in welchem Ausmaß die Liganden dieser Moleküle im Rahmen der Malaria-Infektion nachzuweisen waren. Es wurden Monozyten und Lymphozyten untersucht. Als Ligand für PD-1 färbten wir PD-L1 an. Als Moleküle, die mit CD155 interagieren, färbten wir TIGIT und CD226. Für CTLA-4 suchten wir als Ligand nach CD80.

Es bestätigte sich erneut, dass die Koinhibitoren PD-1, TIGIT und CTLA-4 auf $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten in der Malaria signifikant vermehrt exprimiert werden (Abb. 14). Für die betreffenden Liganden konnte man dies nicht feststellen. Sie waren bei Patienten, wie auch bei gesunden Kontrollen, auf Lymphozyten nur in sehr geringen Mengen vorzufinden. Lediglich CD226 fand sich auf etwa 1% der Lymphozyten gesunder Kontrollen. Auch wenn die Expressionen von PD-L1 (0,1% Kontrolle zu 1,0% Malaria), CD155 (0,03% Kontrolle zu 0,3% Malaria), CD226 (1% Kontrolle zu 3,5% Malaria) und CD80 (0,1% Kontrolle zu 1% Malaria) bei Malaria-Patienten durchschnittlich minimal höher waren als es bei gesunden Kontrollen der Fall gewesen war, ließ sich, bis auf bei CD80, keine statistische Signifikanz feststellen.

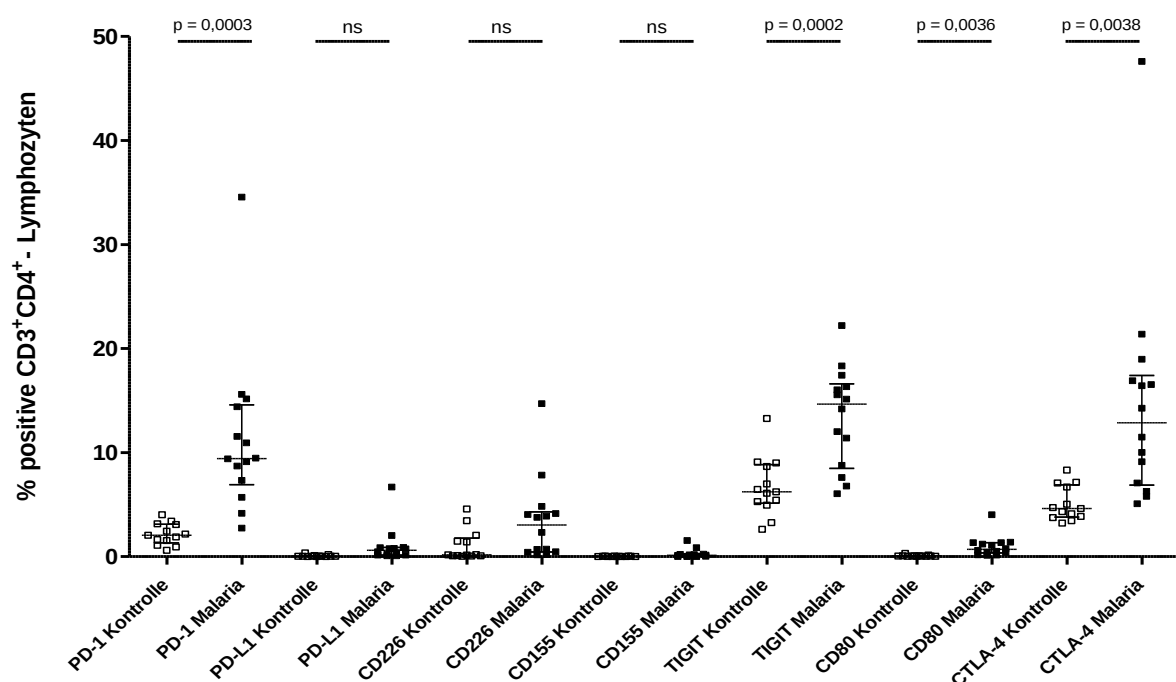


Abb. 14: Erhöhte Expression von Koinhibitoren und teilweise derer Liganden auf $CD3^+CD4^+$ -Lymphozyten bei Malaria-Patienten

Vollblut von Malaria-Patienten und gesunden Kontrollen wurde oberflächlich auf PD-1, PD-L1, CD226, CD155, TIGIT, CD80 und CD4 sowie intrazellulär auf CTLA-4 und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert ($n_{\text{Kontrolle}} = 13$; $n_{\text{Malaria}} = 15$). Statistische Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test ermittelt. Nach Korrektur nach Bonferroni ergeben sich bei 95%-Konfidenzintervallen p-Wert Grenzwerte von $p < 0,00014 = ***$; $p < 0,0014 = **$; $p < 0,007 = *$; p-Werte über 0,007 müssen als statistisch nicht signifikant betrachtet werden (ns).

Auf CD3⁺CD14⁺-Monozyten, die wie im Abschnitt „Methoden“ beschrieben, selektiert wurden, fanden sich die gesuchten Moleküle (Abb. 15). Wo im Mittel etwa 1% der Monozyten gesunder Probanden PD-L1 positiv waren, fand sich PD-L1 im Durchschnitt auf 15% der Monozyten von Malaria-Patienten. Hier muss angemerkt werden, dass sich hier eine ausgeprägte interindividuelle Varianz zeigte. Bei einem Patienten waren 0,5% der Monozyten PD-L1 positiv, während bei einem anderen 93% positiv waren. Es ließ sich hier bei den vorliegenden Fallzahlen keine statistische Signifikanz ermitteln. CD226 ließ sich sowohl bei Kontrollen (Mittelwert 7,7%) als auch bei Malaria-Patienten (Mittelwert 3,4%) im einstelligen Prozentbereich nachweisen, ohne dass sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigten. CD155, welches auch bei gesunden Kontrollen auf durchschnittlich 24% aller Monozyten anzufärben war, zeigte sich in der Malaria erhöht. 20% bis 80% aller Monozyten trugen in der Malaria CD155. CD80 fanden wir bei Gesunden auf etwa 1% der Monozyten bei Malaria-Patienten auf etwa 3,5%, wobei auch dies nicht statistisch signifikant war.

Die Koinhibitoren PD-1, TIGIT und CTLA-4, die wir auf Lymphozyten nachgewiesen haben, fanden wir in geringem Maße auch auf Monozyten. PD-1, welches bei gesunden Kontrollen nur auf etwa 1% der Monozyten zu finden war, fand sich im Mittel auf 3,5% der Monozyten von Malaria-Patienten, dies wohlgeachtet ohne statistische Signifikanz. Die TIGIT Expression verhielt sich ähnlich und ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich: durchschnittlich 1,3% aller Monozyten von gesunden Kontrollen trugen TIGIT, während bei Malaria-Patienten durchschnittlich 4% TIGIT positiv waren. CTLA-4 fand sich ohne signifikante Unterschiede auf 0,5%-1% der Monozyten beider Gruppen.

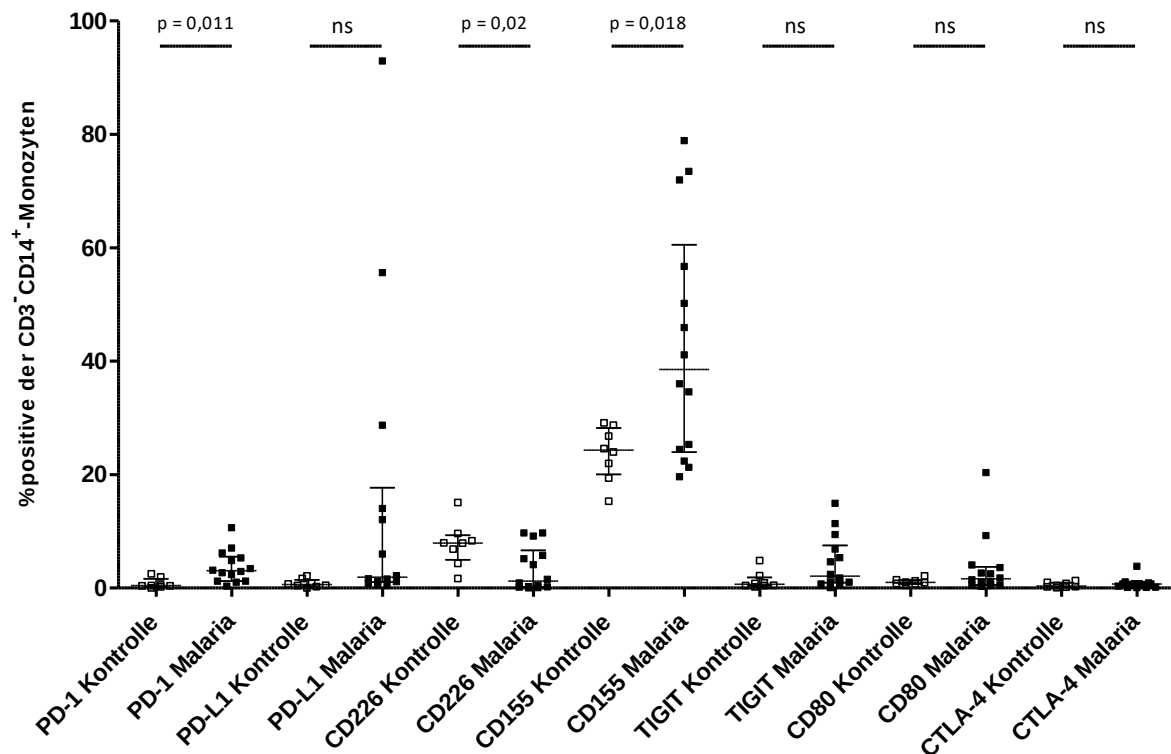


Abb. 15: Erhöhte Expression von Koinhibitoren und teilweise derer Liganden auf CD3⁺CD14⁺-Monozyten bei Malaria-Patienten

Vollblut von Malaria Patienten und gesunden Kontrollen wurde oberflächlich auf PD-1, PD-L1, CD226, CD155, TIGIT, CD80 und CD4 sowie intrazellulär auf CTLA-4 und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert ($n_{\text{Kontrolle}} = 13$; $n_{\text{Malaria}} = 14$). Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt. Nach Korrektur nach Bonferroni ergeben sich bei 95%-Konfidenzintervallen p-Wert Grenzwerte von $p < 0,00014 = ***$; $p < 0,0014 = **$; $p < 0,007 = *$. p-Werte über 0,007 müssen als statistisch nicht signifikant betrachtet werden (ns).

Wir untersuchten zusätzlich ob es Monozyten gibt, die sowohl das koinhibitorische Molekül als auch die dazugehörigen Liganden exprimierten. Es fanden sich solche Zellen bei sehr wenigen Probanden innerhalb der Kontrollgruppe. Bei wenigen Malaria-Patienten ließen sich solche doppelt positiven Monozyten im niedrigen einstelligen Bereich nachweisen. Statistische Signifikanz wurde nicht erreicht (Daten nicht grafisch dargestellt).

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der akuten Malaria koinhibitorische Moleküle auf T-Helferzellen induziert werden (Abb. 5). Dies deckt sich mit den Erkenntnissen dieser und anderer Arbeitsgruppen (ABEL et al. 2018; MACKROTH et al. 2016; COSTA et al. 2015). Ob vorrangig Wirt oder Parasit von dieser Induktion profitieren, steht zur Diskussion. *Plasmodium falciparum* hat sich an seine Wirte angepasst und beherrscht verschiedene Mechanismen und Strategien, dem Immunsystem in Haut, Leber und Blut zu entgehen (rezensiert in BELACHEW 2018). Es wäre denkbar, dass die Plasmodien koinhibitorische Signalwege des Immunsystem des Wirtes für ihre Zwecke nutzen. Im Rahmen verschiedener Krebserkrankungen werden die physiologischen koinhibitorischen Signalwege zum Nachteil des Wirtes aktiviert. Im veränderten Tumorgewebe sind die Effekte, die in einem gesunden Gewebe für den Gesamtorganismus vermutlich sinnvoll gewesen wären, schädlich. Tumoren unterschiedlicher Herkunft exprimieren beispielsweise PD-L1 (ZOU und CHEN 2008). In vielen Fällen ist die Prognose, falls PD-L1 vorliegt, deutlich schlechter, was darauf hindeuten kann, dass der Tumor lokal das Immunsystem unterdrückt (MCDERMOTT und ATKINS 2013). Ein so direkter Ansatz lässt sich im Falle der Plasmodien nicht nachweisen. Plasmodien exprimieren weder Koinhibitoren noch deren Liganden, trotzdem ist es denkbar, dass sie diese während einer Infektion direkt induzieren. Plasmodien, die in der Leber Kupffer-Zellen durchwandern oder auch nur Kontakt zu diesen haben, verändern deren Zytokin-Profil (KLOTZ und FREVERT 2008). Ob sie auch in der Lage sind T-Zellen in so einer direkten Weise zu verändern ist unklar. Es konnte festgestellt werden, dass Koinhibitoren in der Malaria auf T-Helferzellen signifikant hochreguliert werden und das auch deutlich höher als bei chronischen Erkrankungen (ABEL 2016). Ob diese ausgeprägte Induktion vom Wirt oder vom Parasiten ausgeht, ist schwierig zu überprüfen.

Wir konnten T-Helferzellen, die verschiedene Koinhibitoren exprimieren, nachweisen. Welchen Subgruppen sie zuzuordnen sind, ist aus den Daten nur eingeschränkt zu erheben. Bei der Konzeption des Panels „Koinhibitorische Moleküle“ wurde versucht Tr1-Zellen, wie sie von Gagliani und Kollegen 2013 beschrieben wurden, anzufärben. Wir mussten feststellen, dass sich LAG-3, nicht jedoch CD49b mit den von uns gewählten Reagenzien hinreichend darstellen ließ (Daten nicht abgebildet). Ob CD49b nicht vorhanden war oder ob es nur nicht angefärbt wurde, müsste mit anderen Reagenzien überprüft werden. Wir können somit von CD3⁺CD4⁺-T-Helferzellen sprechen, jedoch nicht exklusiv von Tr1-Zellen, wie Gagliani und Kollegen sie definierten. Man muss annehmen, dass es sich bei den hier untersuchten CD3⁺CD4⁺-Lymphozyten um eine gemischte Population aus pro- und antiinflammatorischen T-Helferzellen handelt. Mackroth und Kollegen haben in der humanen Malaria eine PD-1⁺CTLA-4⁺ Population von T-Helferzellen, die suppressive regulatorische Funktionen ausüben, beschrieben (MACKROTH et al. 2016). Es ist anzunehmen, dass wir diese doppelt positiven (PD-1⁺CTLA-4⁺) T-Zellen erneut dargestellt haben. Einige davon

exprimierten zusätzlich noch LAG-3 oder andere Koinhibitoren und waren drei- bis vierfach positiv. Die PD-1 Expression korrelierte deutlich mit derer von CTLA-4 (Abb. 8). Die Zellen die LAG-3 positiv gefärbt wurden, fanden sich fast vollständig in dieser doppelt, dann dreifach positiven Gruppe. Interessanterweise ließ sich, obwohl die Induktion der Effektormoleküle deutlich war (Abb. 9), nur eine schwache Korrelation zwischen diesen und den Koinhibitoren finden (Abb. 10). Man kann vermuten, dass die in dieser Arbeit angefärbten Effektormoleküle Granzym B und CD39 für die Ausübung der regulatorischen Funktion der PD-1⁺CTLA-4⁺-T-Helferzellen nicht im Vordergrund stehen.

Die angefärbten Koinhibitoren können Ausdruck verschiedener Konstitutionen der betreffenden Zelle sein. Es ist möglich, dass die T-Helferzellen einen erschöpften Phänotyp präsentieren. Langfristig bestehende PD-1-Expression wird mit *Exhaustion* assoziiert (BARBER et al. 2006). Eine T-Zell-*Exhaustion* könnte erklären, dass Malaria-Infektionen in vielen Fällen nur unzureichend vom Immunsystem beseitigt werden können und auch, dass sterile Immunität unter normalen Umständen nicht erreicht wird. Auch wenn der Begriff der „*Exhaustion*“ nicht mit abschließender Präzision definiert wurde, scheint es Einigkeit darüber zu geben, dass *exhaustete* T-Zellen weniger stark auf Antigen reagieren, als es vergleichbare nicht erschöpfte T-Effektorzellen tun (rezensiert in BLANK et al. 2019). Solche hyporesponsiven *exhausteten* T-Zellen gehen vermutlich weniger aggressiv gegen die Infektion vor als es klassische T-Gedächtnis-Zellen tun würden. Auch möglich wäre, dass die Koinhibitoren im Rahmen der Aktivierung der T-Zellen am Beginn der Erkrankung induziert wurden und dass die T-Helferzellen nicht erschöpft, sondern sehr aktiv sind. PD-1 wird bei Aktivierung von T-Helferzellen kurzfristig hochreguliert (DOE et al. 2016). Die aktivierten T-Zellen aus dieser Studie produzierten, obwohl sie PD-1⁺ und LAG-3⁺ waren, IFN- γ , waren also eher nicht *exhausted*. Eine Blockade von PD-1 bewirkte allerdings noch eine Steigerung der IFN- γ -Produktion. Diese Befunde legen nahe, dass PD-1 positive T-Zellen, zumindest zu Beginn einer Malaria-Infektion, durchaus aktiv sind. PD-1 scheint in diesem Beispiel eine feine Regulierung der überaus aktiven T-Zellen zu vermitteln. Die angesprochene Studie, wie auch die Daten aus dieser Arbeit, befassen sich mit den Anfängen von Infektionen Malaria-naiver Individuen. Inwieweit die aktivierten T-Zellen bei persistierender Infektion in einen erschöpften Phänotyp übergehen, ist schwierig zu beurteilen. Man hätte, um verlässliche Aussagen zur Funktionalität der T-Zellen machen zu können, weitere Versuche anschließen müssen. Interessant wäre hier eine Analyse ausgeschütteter pro- und antiinflammatorischer Zytokine. Auch könnte man weiter untersuchen, inwiefern die Zellen selbst unter Stimulation mit malaria-spezifischem Antigen proliferieren oder wie sie die Proliferation anderer Zellpopulationen beeinflussen. Viele dieser Untersuchungen wurden von Mackroth und Kollegen 2016 schon verwirklicht.

Bei der Patientin mit schwerer *Pf.* Malaria, deren Blut wir an fünf aufeinander folgenden Tagen untersuchen durften, zeigte sich am zweiten Tag, dem Tag der höchsten Parasitämie (48%), auch die

größte Menge an Koinhibitoren (Abb. 11). Die Patientin wurde in diesem Zeitraum stationär behandelt und erhielt antiparasitäre Medikation, weshalb der Verlauf nicht wirklich vergleichbar mit einer „natürlich“ ablaufenden Malaria-Infektion ist, doch ist bemerkenswert, dass die Patientin die Erkrankung ohne Folgeschäden überstanden hat. Man kann mutmaßen, dass eine ungebremsste T-Zell-vermittelte Immunreaktion gegen 48% der eigenen Erythrozyten einen Organismus überfordert hätte. Mit Abnahme der Parasitämie reduzierten sich auch die Expressionen der gefärbten Marker. Am letzten Tag, den wir untersuchen konnten, waren PD-1, CTLA-4 und TIGIT weiterhin deutlich erhöht. Ob sich ein Persistieren dieser Zellen, möglicherweise in einem erschöpften Zustand, an die Infektion anschloss, wäre interessant zu wissen gewesen.

Wahrscheinlich handelte es sich bei relevanten Anteilen der in dieser Arbeit angefärbten T-Helferzellen um regulatorische T-Zellen. Minigo und Kollegen konnten 2009 zeigen, dass die Anzahl der $\text{TNFR}_{II}^+\text{Foxp3}^+$ regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit schwerer Malaria mit der Höhe der Parasitämie korrelierte (MINIGO et al. 2009). Es ist schwierig, zu beurteilen was in dieser Konstellation Ursache und was Folge ist. Erhöhte regulatorische, anti-inflammatorische Einflüsse werden sicherlich die Immunantwort gegenüber den Parasiten einschränken und es somit ermöglichen, dass höhere Parasitämien erreicht werden. Andererseits ist es auch wichtig, gerade bei großer Erregerlast, nicht übermäßig zu reagieren, da der ohnehin schon belastete Organismus geschont werden muss. Man muss bei allen Eigenheiten und Besonderheiten durch spezifische Komplikationen der Malaria aber vor allem feststellen, dass es bemerkenswert ist, wie ineffektiv ansonsten kompetente Immunsysteme auf diese Erreger reagieren. Es gelingt den Parasiten an verschiedenen Stellen Bereiche, die vom Immunsystem weniger präzise überwacht werden, anzusteuern oder für den Gesamtorganismus notwendige Toleranzen für sich selbst auszunutzen. Hier sind besonders die immunprivilegierte Leber oder die Erythrozyten, die ja kein MHC exprimieren, zu nennen (rezensiert in BELACHEW 2018).

Schon eine geringe Menge Sporozoiten reicht aus, um eine Infektion zu verursachen. Die wenigen Parasiten, wandern aus der Haut mit dem Blutstrom zur Leber, durchwandern dort einige Hepatozyten und nisten sich in einem davon ein. Die Leber, als immunprivilegiertes Organ, ist der Ort, wo als erstes im neuen Wirt eine Vervielfachung der Pathogene stattfindet. Diese Leberphase gilt im Allgemeinen als klinisch inapparent. Die Frage, inwiefern der Körper auf diese frühe Phase der Infektion Einfluss nimmt und auch welche Effekte die Parasiten im Wirt hervorrufen, ist von großem wissenschaftlichem Interesse. Die ungewöhnliche Möglichkeit eine Gruppe von Menschen untersuchen zu können, die zum ersten Mal und zu einem bekannten Zeitpunkt mit Malaria infiziert wurden, haben wir genutzt, um Einblicke in diese spannende Phase der Erkrankung zu erlangen. Wir haben gesehen, dass keine Koinhibitoren induziert werden, bevor die Patienten symptomatisch wurden (Abb. 12). Dies passt im Grunde zu dem Verständnis, das wir von der Induktion von Koinhibitoren haben, nämlich, dass ein Anstieg vor allem auf erschöpften oder frisch aktivierten

Zellen zu erwarten ist. Erschöpfte T-Zellen, welche Koinhibitoren zeigen, wären eher in länger bestehenden Infektionen zu erwarten. Im Rahmen einer frühen Aktivierung von T-Zellen könnten Koinhibitoren mit induziert werden, jedoch ist der Anteil an aktivierten T-Zellen, passend zur ausbleibenden Klinik in der Leberphase, gering. Bei der vorliegenden Fallzahl ($n=6-12$) ließen sich eventuelle minimale Profiländerungen der T-Helferzellen nicht abbilden. Interessant wäre es, den Blick auf Malaria-Antigen-spezifische Zellen zu richten. Ob solche nach der kurzen Zeit bestehen und wie deren Phänotyp aussieht, wäre ausgesprochen interessant. Die Färbung von Vollblut ist zur Klärung dieser Frage wohl weniger geeignet.

Wenn das Immunsystem nun in der Leberphase aktiv wird, sind es vor allem die $CD8^+$ T-Zellen, die infizierte Hepatozyten und die Parasiten darin töten (COCKBURN et al. 2013). Auch wir haben $CD8^+$ -T-Zellen während der Leberphase untersucht. Man hätte erwarten können, dass sie Ki-67 als Aktivierungsmarker oder sogar Effektormoleküle hochregulieren. Ein solcher Effekt ließ sich jedoch nicht bestätigen (Abb. 13). Auch die Expression der Koinhibitoren PD-1 und CTLA-4 unterschied sich nicht von der der Kontrollen. Experimente aus unserer Arbeitsgruppe zur Leberphase der murinen Malaria decken sich mit diesen Befunden. Die Blutphase einer *P. yoelii* Infektion wurde durch Pyrimethamin-Gabe verhindert, sodass alle induzierten Zellen unter den Umständen der Leberphase entstanden sein müssten. Es zeigte sich eine geringe Induktion von $CD8^+$ T-Zellen. Diese trugen keine koinhibitorischen Moleküle auf ihren Oberflächen (persönliche Mitteilung Mathias RIEHN).

Wir haben die Expressionsmuster von Koinhibitoren auf T-Zellen beleuchtet. Um mehr über die Rolle, die diese in der Immunregulation spielen, herauszufinden ist es wichtig sich anzusehen, inwiefern deren Liganden von der Infektion beeinflusst werden. Die bekannten Liganden sind primär auf APC verortet. Wir haben uns auf im Vollblut zu findende Monozyten beschränkt. Auch interessant wären dendritische Zellen oder Gewebsmakrophagen gewesen. Die Auswahl der Monozyten gestaltete sich etwas schwieriger als die Selektion der T-Helferzellen. Scheinbar hat der Prozess des Färbens die Zellen in ihren Eigenschaften im FSC und SSC etwas verändert, sodass die klassische, abgrenzbare Monozyten-Zellpopulation nicht immer vorhanden war (vgl. Abb. 5). Mit CD3, CD4 und CD14 im Panel gelang es jedoch, wie wir glauben, verlässlich Monozyten auszuwählen. Wir fanden bei Malaria-Patienten vor allem erhöhte Expressionen von CD155 und bei manchen Patienten PD-L1 (Abb. 15). Interessant ist, dass sich CD226 und CD80 nicht wirklich veränderten, auch wenn wir zeigen konnten, dass deren Rezeptoren auf T-Zellen deutlich hochreguliert sind. CD226 wird auch schon bei Gesunden auf im Mittel 7,7% der Monozyten exprimiert und veränderte sich nicht in der Infektion (Abb. 15). CD155 auf Monozyten stieg deutlich an, war aber auf T-Zellen quasi gar nicht nachzuweisen (Abb. 14). Die deutliche Steigerung der TIGIT Expression auf T-Zellen konnte in Färbungen mit verschiedenen Panels nachgewiesen werden. All dies legt nahe, dass die Aktivität der Achse CD226/CD155/TIGIT in einem komplexen

Zusammenspiel der beiden sich gegenseitig beeinflussenden Zell-Populationen festgelegt wird. Die PD-1-Expression wurde deutlich auf T-Helferzellen und mäßig auf Monozyten gesteigert, die Expression des dazugehörigen Liganden PD-L1 erhöhte sich bei manchen Patienten deutlich. Eine leichte CD80 Induktion auf Monozyten konnte bei manchen Patienten gezeigt werden. Auf T-Helferzellen war diese sogar statistisch signifikant. CTLA-4 fand sich kaum auf Monozyten, allerdings durchaus prominent auf T-Zellen. Man kann formulieren, dass die regulatorischen Funktionen von PD-1/PD-L1 und CD80/CTLA-4 wahrscheinlich, auch in der Malaria, eine Rolle in der Kommunikation zwischen Monozyten und T-Zellen spielen. Wer wen in welchem Ausmaß beeinflusst, lässt sich anhand dieser Daten nicht beschreiben.

Zusätzlich zu den oben diskutierten *trans*-Interaktionen wurde unter anderem durch die Studie von Zhao und Kollegen 2019 die Aufmerksamkeit des Forschungsfeldes auf *cis*-Interaktionen gerichtet. Wir fanden bei Malaria-Patienten in den Fällen von PD-1/PD-L1, TIGIT/CD155 und CD80/CTLA-4 geringe Mengen (<1%) der T-Helferzellen, die sowohl den Rezeptor als auch den genannten Liganden trugen (Daten nicht grafisch dargestellt). Diese Zellen gab es in der Kontrollgruppe nicht. Auf Monozyten ließ sich dieses Expressionsmuster auch nachweisen, jedoch bestanden hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen Malaria-Patienten und Kontrollgruppe. Welche Eigenschaften aus dieser Koexpression resultieren und wie sie zu interpretieren ist, muss an dieser Stelle offenbleiben.

Inwiefern das Aufdecken der komplexen Prozesse der Immunregulation in der Malaria letztendlich den erkrankten oder den in Endemie-Gebieten lebenden exponierten Menschen hilft, ist eine Frage die sich klinisch interessierten Menschen aufdrängt. Das Immunsystem ist das Beste, was der Körper Pathogenen entgegen kann. Es ist viel präziser und in der Regel auch potenter als jedes Medikament. Dem Immunsystem zu helfen, seine Funktionen wieder uneingeschränkt wahrzunehmen, ist ein Ansatz der in der Onkologie große Erfolge zu verbuchen hat. Ob eine Blockade von koinhibitorischen Signalwegen in der Malaria für Patienten von Vorteil ist, gilt es zu erforschen. Ein Problem in diesem Kontext ist, dass es kein wirklich komplett passendes Mausmodell gibt. *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* und *P. vinckei* stehen für die Infektion von Nagetieren zur Verfügung. Die Infektion mit *P. berghei* stellt ein kontrovers diskutiertes aber verbreitetes Modell für die menschliche zerebrale Malaria dar (TORRE, LANGLAIS & GROS 2018; CRAIG et al. 2012). Viele Vakzine, die auf die Leberphase der Erkrankung abzielen, wurden ebenfalls in der *P. berghei* Infektion erprobt. *P. yoelii* Infektionen werden teilweise für Untersuchungen der Leberphase genutzt, unterscheiden sich aber in anderen Aspekten der Erkrankung von der menschlichen Malaria. *P. berghei* und *P. chabaudi* Infektionen gingen als einzige Modelle bei Mäusen bzw. Ratten in eine chronische Malaria über (rezensiert in CRAIG 2012). Fortschritte in der Forschung an humanisierten Mausmodellen könnten in Zukunft präzisere Einblicke ermöglichen (KAUSHANSKY 2014). Versuche an nicht menschlichen Primaten sind als Modell in vielen Fällen sicherlich etwas valider,

allerdings auch mit deutlich größerem Aufwand verbunden. Sie erfordern zudem eine sehr genaue ethische Abwägung, weshalb sie wohl weiterhin eher die Ausnahme bleiben werden (LANGHORNE et al. 2011).

Im Mausmodell mit *P. berghei* konnte schon in einer frühen Publikation der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Blockade von CTLA-4 zu schwerer CM und frühem Tod führte (JACOBS et al. 2002). Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass die Blockade in manchen milder verlaufenden Modellen von Vorteil für die Maus war (LEPENIES et al. 2007). Etablierte *P. yoelii* Infektionen konnten durch Blockade von PD-L1 und LAG-3 sehr effektiv kontrolliert werden (BUTLER et al. 2012). CTLA-4 oder PD-1/PD-L1 Blockaden führten in einem *P. berghei* Modell dazu, dass die Parasiten besser kontrolliert wurden aber auch die CM zunahm (HAFALLA et al. 2012). Tim-3 Blockade im Rahmen einer *P. berghei* Infektion verbesserte die zellvermittelte Immunität deutlich, ohne Nebenwirkungen zu verursachen (HOU et al. 2016). Die Blockade von Koinhibitoren kann in Zeiten sich ausbreitender medikamentenresistenter Plasmodien ein wichtiges Standbein der Therapie werden. Auch denkbar aber noch nicht hinreichend erforscht wäre die Verfestigung von Impferfolgen durch zeitgleiche Blockade koinhibitorischer Signalwege. Insgesamt stellt die Blockade von Koinhibitoren einen überaus interessanten Ansatz dar. Es ist schwierig die Erkenntnisse aus Modellen auf den Menschen zu übertragen und der Grat, auf dem man sich bewegt, wenn man Immunantworten verbessern möchte, ohne Komplikationen zu provozieren, ist schmal. Trotzdem darf man die Hoffnung haben, dass ein umfassendes Verständnis der immunologischen Abläufe in der Malaria, die Möglichkeiten betroffenen Menschen zu helfen, enorm erweitern wird.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen einer Malaria-Infektion wird der Organismus direkt durch die Aktivität der Parasiten, sowie durch eine überschießende Immunreaktion geschädigt. Koinhibitorische Signalwege werden in akuten und chronischen Malaria-Infektionen aktiviert und regulieren das Ausmaß der Immunantwort. Am Anfang einer Infektion, wenn in den ersten Blut-Phasen die Patienten symptomatisch werden, exprimieren aktivierte T-Zellen Koinhibitoren, die die starke Immunreaktion etwas dämpfen. In späteren Phasen der Erkrankung, wenn die Malaria unter Umständen chronisch geworden ist, finden sich ebenfalls T-Zellen mit Koinhibitoren, welche eine reduzierte Funktionalität zeigen. Die Koinhibitoren schützen den Körper vor übermäßigen Immunreaktionen, verhindern dabei aber auch, dass das Immunsystem die Parasiten optimal bekämpft. Die Expression von Koinhibitoren könnte daher dazu beitragen, dass weder sterile Immunität erreicht noch die Infektion vollständig eradiziert werden kann.

In dieser Arbeit wurden die Expressionen von Koinhibitoren und deren Liganden auf verschiedenen Zellpopulationen untersucht. Es wurden Vollblutproben von Patienten mit akuter Malaria gefärbt und die Expressionsmuster der Koinhibitoren auf T-Helferzellen und Monozyten analysiert. Die Koinhibitoren PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3 und TIGIT wurden deutlich vermehrt exprimiert. Bei den untersuchten Patienten fanden sich, anders als bei gesunden Kontrollen, viele Zellen die PD-1 bzw. CTLA-4 und noch einen weiteres koinhibitorisches Molekül koexprimierten. Auch fast 5% dreifach positive T-Helferzellen wurden nachgewiesen. Die Expression von Granzym B und CD39 war auf den T-Helferzellen der Patienten signifikant erhöht und korrelierte teilweise mit der Expression koinhibitorischer Moleküle. Die Liganden PD-L1 und CD155 konnten bei Malaria-Patienten auf Monozyten vermehrt nachgewiesen werden. PD-L1 und CD155 interagieren mit PD-1 und TIGIT, welche wir erhöht auf T-Helferzellen fanden. CD80 und CD226, die Liganden von CTLA-4 und CD155, zeigten sich leicht erhöht auf T-Helferzellen. Auf Monozyten wurden CD80 und CD226 zwar nicht vermehrt exprimiert, konnten jedoch bei Patienten und Kontrollen im niedrigen einstelligen Prozentbereich nachgewiesen werden. Man kann daraus herleiten, dass die Effekte der Koinhibitoren unter anderem an der Schnittstelle zwischen Monozyten und T-Zellen wirken könnten.

Im Rahmen der MAVACHE Studie des Instituts für Tropenmedizin Tübingen wurden Malaria-naive gesunde Erwachsene unter kontrollierten Bedingungen mit Malaria infiziert. Wir hatten die Möglichkeit, das Blut der Probanden in dieser Zeit ebenfalls zu untersuchen. In der klinisch inapparenten Leberphase änderte sich das Expressionsmuster der untersuchten Koinhibitoren auf T-Helferzellen nicht. Auch die CD8⁺-T-Zellen der Infizierten zeigten keine anderen Expressionen dieser Moleküle als die der gesunden Kontrollen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit den Beobachtungen dieser und anderer Arbeitsgruppen, die besagen, dass in der Malaria-Infektion koinhibitorische Moleküle induziert werden. Das Ausmaß dieser Expressionen und die Komposition von Koexpressionen, werden im Detail weiter beleuchtet. Auch die weit verbreitete Überzeugung, dass die Leberphase der Infektion nicht nur klinisch unauffällig ist, sondern auch weitgehend ohne effektiven Zugriff des Immunsystems abläuft, wird durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt. Die Beschreibung der Expressionsmuster von Koinhibitoren während der Leberphase einer humanen Malaria-Infektion ist unseres Wissens nach neu.

Summary / Abstract

In malaria the body is damaged by the activity of the parasites as well as the inflammation and strong immunologic reaction. Coinhibitory receptors are upregulated in acute and chronic malaria-infections. At the beginning of the infection, during the first blood-phases, when the patients are symptomatic, T-cells are activated and express coinhibitory receptors that dampen the immunologic reaction. T-cells with coinhibitory receptors are also found in later phases of the disease, when the malaria may have turned chronic. A reduced functionality can be attributed to these cells and the coinhibitory receptors may be in part responsible for neither clearing the infection completely nor achieving sterile protection. The coinhibitory pathways reduce immunopathology but in doing so also decrease the efficiency with which the immune system fights the parasite.

We have analyzed whole-blood-samples of patients with acute malaria and examined their T-helper-cells as well as their monocytes regarding expression of coinhibitory receptors and their ligands. We found the coinhibitory receptors PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3 and TIGIT to be overexpressed on T-helper cells, compared to healthy controls. Furthermore, just about none of the T-helper-cells of the controls expressed more than one coinhibitory receptor, while many of the patients' cells expressing PD-1 or CTLA-4 expressed one or more additional receptors. We found an average of about 5% triple-positive T-helper-cells in the malaria-patients and close to none in the control group. The expression of Granzyme B and CD39 was significantly increased and correlated positively with the expression of coinhibitory receptors in some cases. The ligands to PD-1 and TIGIT, PD-L1 and CD155 were found increased on malaria-patients' monocytes. The ligands to CTLA-4 and CD155, CD80 and CD226 were slightly increased on T-helper-cells during malaria-infection. We found CD80 and CD226 on 1-8% of monocytes as well but could not mark a difference between the controls and the patients. One could assume that the effects of the coinhibitory pathways in malaria are executed partially in between T-cells and monocytes.

The "Institut für Tropenmedizin Tübingen" performed controlled infections of malaria-naive, healthy adults during the MAVACHE-study. We had the opportunity to analyze the blood of these probands as well. During the liver-stages of these infections, the expression pattern of coinhibitory receptors on the probands T-helper-cells did not differ from what we found in healthy controls. The CD8⁺-T-cells, believed to be responsible for liver stage immunity, did not change their receptor-expression either. This early stage of the infection seemed not to induce changes in the coinhibitory pathways.

Our findings are in line with observations made in this and other working groups, stating that malaria induces coinhibitory receptors. We focused more on the details of this expression and described patterns of coexpression. The common held belief, that the liver-stage of malaria is barely recognized by the immune system, is supported by the analysis we did on the samples from Tübingen. However, the description of expression patterns of coinhibitory receptors during first time, human, liver-stage malaria is, as far as we know, new.

6 Abkürzungen

... ⁺	positiv für den genannten Marker
... ⁻	negativ für den genannten Marker
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APC	Antigen präsentierende Zelle
Bat3	HLA-B associated transcript 3
BCR	B-Zell-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CS	circumsporozoite Protein
CTLA-4	cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
et al.	et alii / und andere
FACS	Fluorescence activated cell scanning/sorting
FMO	Fluorescence minus one (Färbung mit allen außer 1-2 Farbstoffen)
FoxP3	Forkhead-Box-Protein-3
FSC	Forward–Scatter / Vorwärtsstreulicht
Grz B	Granzym B
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITIM	immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif
LAG-3	Lymphocyte activation gene 3
MALT	Mucosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
NK-Zellen	Natürliche-Killer-Zellen
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PD-1	Programmed cell death protein 1

PD-L1	Programmed cell death protein 1 – Ligand 1
<i>Pf</i> SPZ	<i>Plasmodium Falciparum</i> Sporozoiten
RAS	radiation attenuated sporozoites
RBC	Erythrozyt
SSC	Side–Scatter / Seitwärtsstreulicht
T _C 1	IFN- γ produzierende CD8 ⁺ -T-Zelle
T _{FH}	Follikuläre T-Zelle
T _H 1	T-Helferzelle Gruppe 1
T _{reg}	regulatorische T-Helferzelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming growth factor
TIGIT	T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
Tim-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAP	thrombospondin-related adhesion Protein
WHO	World Health Organisation

7 Literaturverzeichnis

- Abel, Annemieke (2016): Untersuchung koinhibitorischer Moleküle in der humanen Malaria
- Abel, Annemieke; Steeg, Christiane; Aminkiah, Francis; Addai-Mensah, Otchere; Addo, Marylyn; Gagliani, Nicola et al. (2018): Differential expression pattern of co-inhibitory molecules on CD4(+) T cells in uncomplicated versus complicated malaria. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 4789. DOI: 10.1038/s41598-018-22659-1.
- Barber, Daniel L.; Wherry, E. John; Masopust, David; Zhu, Baogong; Allison, James P.; Sharpe, Arlene H. et al. (2006): Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. In: *Nature* 439 (7077), S. 682–687. DOI: 10.1038/nature04444.
- Belachew, Esmael Besufikad (2018): Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. In: *Journal of immunology research* 2018, S. 6529681. DOI: 10.1155/2018/6529681.
- Blackburn, Shawn D.; Shin, Haina; Haining, W. Nicholas; Zou, Tao; Workman, Creg J.; Polley, Antonio et al. (2009): Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. In: *Nature immunology* 10 (1), S. 29–37. DOI: 10.1038/ni.1679.
- Blank, Christian U.; Haining, W. Nicholas; Held, Werner; Hogan, Patrick G.; Kallies, Axel; Lugli, Enrico et al. (2019): Defining 'T cell exhaustion'. In: *Nature reviews. Immunology* 19 (11), S. 665–674. DOI: 10.1038/s41577-019-0221-9.
- Burton, Bronwen R.; Britton, Graham J.; Fang, Hai; Verhagen, Johan; Smithers, Ben; Sabatos-Peyton, Catherine A. et al. (2014): Sequential transcriptional changes dictate safe and effective antigen-specific immunotherapy. In: *Nature communications* 5, S. 4741. DOI: 10.1038/ncomms5741.
- Butler Noah S; Jacqueline Moebius; Lecia L Pewe; Boubacar Traore; Ogobara K Doumbo; Lorraine T Tygrett et al. (2012): Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. In: *Nat Immunol* 13 (2), S. 188–195. DOI: 10.1038/ni.2180.
- Camisaschi, Chiara; Casati, Chiara; Rini, Francesca; Perego, Michela; Filippa, Annamaria de; Triebel, Frédéric et al. (2010): LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 184 (11), S. 6545–6551. DOI: 10.4049/jimmunol.0903879.
- Chiba, Shigeki; Baghdadi, Muhammad; Akiba, Hisaya; Yoshiyama, Hironori; Kinoshita, Ichiro; Dosaka-Akita, Hiroto et al. (2012): Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. In: *Nature immunology* 13 (9), S. 832–842. DOI: 10.1038/ni.2376.
- Claser, Carla; Malleret, Benoît; Gun, Sin Yee; Wong, Alicia Yoke Wei; Chang, Zi Wei; Teo, Pearline et al. (2011): CD8+ T cells and IFN- γ mediate the time-dependent accumulation of infected red blood cells in deep organs during experimental cerebral malaria. In: *PloS one* 6 (4), e18720. DOI: 10.1371/journal.pone.0018720.
- Cockburn, Ian A.; Amino, Rogerio; Kelemen, Reka K.; Kuo, Scot C.; Tse, Sze-Wah; Radtke, Andrea et al. (2013): In vivo imaging of CD8+ T cell-mediated elimination of malaria liver stages. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (22), S. 9090–9095. DOI: 10.1073/pnas.1303858110.
- Costa, Pedro A. C.; Leoratti, Fabiana M. S.; Figueiredo, Maria M.; Tada, Mauro S.; Pereira, Dhelio B.; Junqueira, Caroline et al. (2015): Induction of Inhibitory Receptors on T Cells During *Plasmodium vivax* Malaria Impairs Cytokine Production. In: *The Journal of infectious diseases* 212 (12), S. 1999–2010. DOI: 10.1093/infdis/jiv306.
- Costa, Pedro A. C.; Figueiredo, Maria M.; Diniz, Suelen Q.; Peixoto, Ana P M M; Maloy, Kevin J.; Teixeira-Carvalho, Andrea et al. (2018): *Plasmodium vivax* Infection Impairs Regulatory T-Cell Suppressive Function During Acute Malaria. In: *The Journal of infectious diseases* 218 (8), S. 1314–1323. DOI: 10.1093/infdis/jiy296.

- Craig, Alister G.; Grau, Georges E.; Janse, Chris; Kazura, James W.; Milner, Dan; Barnwell, John W. et al. (2012): The role of animal models for research on severe malaria. In: *PLoS pathogens* 8 (2), e1002401. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002401.
- da Silva, Ines Pires; Gallois, Anne; Jimenez-Baranda, Sonia; Khan, Shaukat; Anderson, Ana C.; Kuchroo, Vijay K. et al. (2014): Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. In: *Cancer immunology research* 2 (5), S. 410–422. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0171.
- Dixon, Karen O.; Schorer, Michelle; Nevin, James; Etminan, Yassaman; Amoozgar, Zohreh; Kondo, Takaaki et al. (2018): Functional Anti-TIGIT Antibodies Regulate Development of Autoimmunity and Antitumor Immunity. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 200 (8), S. 3000–3007. DOI: 10.4049/jimmunol.1700407.
- Doe, Henrietta T.; Kimura, Daisuke; Miyakoda, Mana; Kimura, Kazumi; Akbari, Masoud; Yui, Katsuyuki (2016): Expression of PD-1/LAG-3 and cytokine production by CD4(+) T cells during infection with Plasmodium parasites. In: *Microbiology and immunology* 60 (2), S. 121–131. DOI: 10.1111/1348-0421.12354.
- Faleiro, Rebecca; Karunarathne, Deshapriya S.; Horne-Debets, Joshua M.; Wykes, Michelle (2018): The Contribution of Co-signaling Pathways to Anti-malarial T Cell Immunity. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 2926. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02926.
- Gagliani, Nicola; Magnani, Chiara F.; Huber, Samuel; Gianolini, Monica E.; Pala, Mauro; Licona-Limon, Paula et al. (2013): Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. In: *Nature medicine* 19 (6), S. 739–746. DOI: 10.1038/nm.3179.
- Gautron, Anne-Sophie; Dominguez-Villar, Margarita; Marcken, Marine de; Hafler, David A. (2014): Enhanced suppressor function of TIM-3+ FoxP3+ regulatory T cells. In: *European journal of immunology* 44 (9), S. 2703–2711. DOI: 10.1002/eji.201344392.
- Ghazanfari, Nazanin; Mueller, Scott N.; Heath, William R. (2018): Cerebral Malaria in Mouse and Man. In: *Frontiers in immunology* 9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02016.
- Gibbons Johnson, Rachel M.; Dong, Haidong (2017): Functional Expression of Programmed Death-Ligand 1 (B7-H1) by Immune Cells and Tumor Cells. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 961. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00961.
- Gleason, Michelle K.; Lenvik, Todd R.; McCullar, Valarie; Felices, Martin; O'Brien, M. Shea; Cooley, Sarah A. et al. (2012): Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. In: *Blood* 119 (13), S. 3064–3072. DOI: 10.1182/blood-2011-06-360321.
- Grosso, Joseph F.; Kelleher, Cristin C.; Harris, Timothy J.; Maris, Charles H.; Hipkiss, Edward L.; Marzo, Angelo de et al. (2007): LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (11), S. 3383–3392. DOI: 10.1172/JCI31184.
- Gupta, Shipra; Thornley, Thomas B.; Gao, Wenda; Larocca, Rafael; Turka, Laurence A.; Kuchroo, Vijay K.; Strom, Terry B. (2012): Allograft rejection is restrained by short-lived TIM-3+PD-1+Foxp3+ Tregs. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (7), S. 2395–2404. DOI: 10.1172/JCI45138.
- Hafalla, Julius Clemence R.; Claser, Carla; Couper, Kevin N.; Grau, Georges Emile; Renia, Laurent; Souza, J. Brian de; Riley, Eleanor M. (2012): The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitory pathways independently regulate host resistance to Plasmodium-induced acute immune pathology. In: *PLoS pathogens* 8 (2), e1002504. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002504.
- Hannier, S.; Tournier, M.; Bismuth, G.; Triebel, F. (1998): CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 161 (8), S. 4058–4065.
- Hoffman, S. L.; Doolan, D. L. (2000): Malaria vaccines-targeting infected hepatocytes. In: *Nature medicine* 6 (11), S. 1218–1219. DOI: 10.1038/81315.
- Horne-Debets, Joshua M.; Karunarathne, Deshapriya S.; Faleiro, Rebecca J.; Poh, Chek Meng; Renia, Laurent; Wykes, Michelle N. (2016): Mice lacking Programmed cell death-1 show a role for CD8(+) T

- cells in long-term immunity against blood-stage malaria. In: *Scientific reports* 6, S. 26210. DOI: 10.1038/srep26210.
- Hou, Nan; Zou, Yang; Piao, Xianyu; Liu, Shuai; Wang, Lei; Li, Shanshan; Chen, Qijun (2016): T-Cell Immunoglobulin- and Mucin-Domain-Containing Molecule 3 Signaling Blockade Improves Cell-Mediated Immunity Against Malaria. In: *The Journal of infectious diseases* 214 (10), S. 1547–1556. DOI: 10.1093/infdis/jiw428.
- Huang, Yu-Hwa; Zhu, Chen; Kondo, Yasuyuki; Anderson, Ana C.; Gandhi, Amit; Russell, Andrew et al. (2015): CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. In: *Nature* 517 (7534), S. 386–390. DOI: 10.1038/nature13848.
- Jacobs, Thomas; Graefe, Sebastian E. B.; Niknafs, Sonja; Gaworski, Iris; Fleischer, Bernhard (2002): Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 169 (5), S. 2323–2329. DOI: 10.4049/jimmunol.169.5.2323.
- Joller, Nicole; Lozano, Ester; Burkett, Patrick R.; Patel, Bonny; Xiao, Sheng; Zhu, Chen et al. (2014): Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. In: *Immunity* 40 (4), S. 569–581. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.02.012.
- Joller, Nicole; Kuchroo, Vijay K. (2017): Tim-3, Lag-3, and TIGIT. In: *Current topics in microbiology and immunology* 410, S. 127–156. DOI: 10.1007/82_2017_62.
- Johnston, Robert J.; Comps-Agrar, Laetitia; Hackney, Jason; Yu, Xin; Huseni, Mahrukh; Yang, Yagai et al. (2014): The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. In: *Cancer cell* 26 (6), S. 923–937. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.10.018.
- Kaushansky, Alexis; Mikolajczak, Sebastian A.; Vignali, Marissa; Kappe, Stefan H. I. (2014): Of men in mice: the success and promise of humanized mouse models for human malaria parasite infections. In: *Cellular microbiology* 16 (5), S. 602–611. DOI: 10.1111/cmi.12277.
- Kalekar, Lokesh A.; Mueller, Daniel L. (2017): Relationship between CD4 Regulatory T Cells and Anergy In Vivo. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 198 (7), S. 2527–2533. DOI: 10.4049/jimmunol.1602031.
- Kang, Chiao-Wen; Dutta, Avijit; Chang, Li-Yuan; Mahalingam, Jayashri; Lin, Yung-Chang; Chiang, Jy-Ming et al. (2015): Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3+CD8+ T cells in colon cancer. In: *Scientific reports* 5, S. 15659. DOI: 10.1038/srep15659.
- Klotz, Christian; Frevert, Ute (2008): *Plasmodium yoelii* sporozoites modulate cytokine profile and induce apoptosis in murine Kupffer cells. In: *International journal for parasitology* 38 (14), S. 1639–1650. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.05.018.
- Kurup, Samarchith P.; Butler, Noah S.; Harty, John T. (2019): T cell-mediated immunity to malaria. In: *Nature reviews. Immunology* 19 (7), S. 457–471. DOI: 10.1038/s41577-019-0158-z.
- Langhorne, Jean; Buffet, Pierre; Galinski, Mary; Good, Michael; Harty, John; Leroy, Didier et al. (2011): The relevance of non-human primate and rodent malaria models for humans. In: *Malaria journal* 10, S. 23. DOI: 10.1186/1475-2875-10-23.
- Lepenies, Bernd; Gaworski, Iris; Tartz, Susanne; Langhorne, Jean; Fleischer, Bernhard; Jacobs, Thomas (2007): CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal *Plasmodium yoelii* infections. In: *Microbes and infection* 9 (6), S. 687–694. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.02.013.
- Liang, Bitao; Workman, Craig; Lee, Janine; Chew, Claude; Dale, Benjamin M.; Colonna, Lucrezia et al. (2008): Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 180 (9), S. 5916–5926. DOI: 10.4049/jimmunol.180.9.5916.
- Mackroth, Maria Sophia; Abel, Annemieke; Steeg, Christiane; Zur Schulze Wiesch, Julian; Jacobs, Thomas (2016): Acute Malaria Induces PD1+CTLA4+ Effector T Cells with Cell-Extrinsic Suppressor Function. In: *PLoS pathogens* 12 (11), e1005909. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005909.
- McDermott, David F.; Atkins, Michael B. (2013): PD-1 as a potential target in cancer therapy. In: *Cancer medicine* 2 (5), S. 662–673. DOI: 10.1002/cam4.106.

MIAMED, AMBOSS 2020, <https://www.amboss.com/de/wissen/Malaria> Stand: 28.04.2020

- Minigo, Gabriela; Woodberry, Tonia; Piera, Kim A.; Salwati, Ervi; Tjitra, Emiliana; Kenangalem, Enny et al. (2009): Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. In: *PLoS pathogens* 5 (4), e1000402. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000402.
- Monney, Laurent; Sabatos, Catherine A.; Gaglia, Jason L.; Ryu, Akemi; Waldner, Hanspeter; Chernova, Tatyana et al. (2002): Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. In: *Nature* 415 (6871), S. 536–541. DOI: 10.1038/415536a.
- Mordmüller, Benjamin; Surat, Güzin; Lagler, Heimo; Chakravarty, Sumana; Ishizuka, Andrew S.; Lalremruata, Albert et al. (2017): Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. In: *Nature* 542 (7642), S. 445–449. DOI: 10.1038/nature21060.
- Overstreet, Michael G.; Chen, Yun-Chi; Cockburn, Ian A.; Tse, Sze-Wah; Zavala, Fidel (2011): CD4+ T cells modulate expansion and survival but not functional properties of effector and memory CD8+ T cells induced by malaria sporozoites. In: *PloS one* 6 (1), e15948. DOI: 10.1371/journal.pone.0015948.
- Reyes-Sandoval, Arturo; Wyllie, David H.; Bauza, Karolis; Milicic, Anita; Forbes, Emily K.; Rollier, Christine S.; Hill, Adrian V. S. (2011): CD8+ T effector memory cells protect against liver-stage malaria. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 187 (3), S. 1347–1357. DOI: 10.4049/jimmunol.1100302.
- Sánchez-Fueyo, Alberto; Tian, Jane; Picarella, Dominic; Domenig, Christoph; Zheng, Xin Xiao; Sabatos, Catherine A. et al. (2003): Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. In: *Nature immunology* 4 (11), S. 1093–1101. DOI: 10.1038/ni987.
- Sharma, Padmanee; Allison, James P. (2015): The future of immune checkpoint therapy. In: *Science (New York, N.Y.)* 348 (6230), S. 56–61. DOI: 10.1126/science.aaa8172.
- Spence, Philip J.; Langhorne, Jean (2012): T cell control of malaria pathogenesis. In: *Current opinion in immunology* 24 (4), S. 444–448. DOI: 10.1016/j.coi.2012.05.003.
- Stanisic, Danielle I.; Good, Michael F. (2015): Whole organism blood stage vaccines against malaria. In: *Vaccine* 33 (52), S. 7469–7475. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.09.057.
- Torre, Sabrina; Langlais, David; Gros, Philippe (2018): Genetic analysis of cerebral malaria in the mouse model infected with *Plasmodium berghei*. In: *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society* 29 (7-8), S. 488–506. DOI: 10.1007/s00335-018-9752-9.
- Tuteja, Renu (2007): Malaria - an overview. In: *The FEBS journal* 274 (18), S. 4670–4679. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x.
- van Braeckel-Budimir, Natalija; Kurup, Samarchith P.; Harty, John T. (2016): Regulatory issues in immunity to liver and blood-stage malaria. In: *Current opinion in immunology* 42, S. 91–97. DOI: 10.1016/j.coi.2016.06.008.
- Walther, Michael; Tongren, Jon Eric; Andrews, Laura; Korbel, Daniel; King, Elizabeth; Fletcher, Helen et al. (2005): Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. In: *Immunity* 23 (3), S. 287–296. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.08.006.
- Weiss, Walter R.; Jiang, Chengyong George (2012): Protective CD8+ T lymphocytes in primates immunized with malaria sporozoites. In: *PloS one* 7 (2), e31247. DOI: 10.1371/journal.pone.0031247.
- Woo, Seng-Ryong; Turnis, Meghan E.; Goldberg, Monica V.; Bankoti, Jaishree; Selby, Mark; Nirschl, Christopher J. et al. (2012): Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. In: *Cancer research* 72 (4), S. 917–927. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1620.
- Workman, Creg J.; Vignali, Dario A. A. (2003): The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. In: *European journal of immunology* 33 (4), S. 970–979. DOI: 10.1002/eji.200323382.
- World Health Organization: World malaria report 2019.

- Yang, Xiaomei; Jiang, Xingwei; Chen, Guojiang; Xiao, Yan; Geng, Shaoxia; Kang, Chunyan et al. (2013): T cell Ig mucin-3 promotes homeostasis of sepsis by negatively regulating the TLR response. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 190 (5), S. 2068–2079. DOI: 10.4049/jimmunol.1202661.
- Zhu, Chen; Anderson, Ana C.; Schubart, Anna; Xiong, Huabao; Imitola, Jaime; Khoury, Samia J. et al. (2005): The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. In: *Nature immunology* 6 (12), S. 1245–1252. DOI: 10.1038/ni1271.
- Zhao, Yunlong; Lee, Calvin K.; Lin, Chia-Hao; Gassen, Rodrigo B.; Xu, Xiaozheng; Huang, Zhe et al. (2019): PD-L1:CD80 Cis-Heterodimer Triggers the Co-stimulatory Receptor CD28 While Repressing the Inhibitory PD-1 and CTLA-4 Pathways. In: *Immunity* 51 (6), 1059-1073.e9. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.11.003.
- Zou, Weiping; Chen, Lieping (2008): Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (6), S. 467–477. DOI: 10.1038/nri2326.

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei PD Dr. Thomas Jacobs für die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Nicht nur hat er die Mittel, die Räumlichkeiten und die interessante Fragestellung zur Verfügung gestellt, sondern ist auch mir und meinen Fragen jederzeit mit großer Geduld und Offenheit begegnet. Ich habe die fachlichen Gespräche als überaus bereichernd und anregend empfunden und bin sehr dankbar dafür. Auch hat er, als Leiter der Arbeitsgruppe, eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen in der freundschaftlicher wie fachlicher Austausch florierten. Vielen Dank für die großartige Unterstützung.

Ich möchte auch Dr. Maria Mackroth und Dr. Annemieke Abel dafür danken, dass sie mich in die Laborarbeit eingearbeitet haben und mir das notwendige Handwerkszeug vermittelt haben, diese Arbeit zu verfassen. Vielen Dank auch an Vera Brackrock, Rosa Grote-Galvez, Birgit Hüsing, Bastian Kruse, Imke Liebold, Dr. Franziska Muscate, Ulricke Richardt, Dr. Mathias Riehn, Christiane Steeg und Nadine Stetter die aus dem BNI so einen großartigen Arbeitsplatz gemacht haben.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Benjamin Mordmüller und seiner gesamten Arbeitsgruppe. Ich bin sehr dankbar dafür, die Möglichkeit bekommen zu haben, einen Teil meiner Daten in Tübingen zu sammeln. Diese Kooperation hat mich sehr bereichert und diese Arbeit um spannende Aspekte erweitert.

Ganz besonders möchte ich allen Probanden, Probandinnen, Patienten und Patientinnen danken, ohne deren Bereitschaft sich einzubringen diese Forschung nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank auch an Ki, die mich in der Zeit des Schreibens unterstützt und begleitet hat.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meiner Familie und insbesondere meinen Eltern Ursula Michelsen und Dr. Klaus Michelsen, die mich jederzeit emotional wie finanziell unterstützt haben und mir so diesen langen Bildungsweg ermöglicht haben. Vielen Dank!

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: